



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

ADRIENE DAMASCENO SEABRA

O BLOQUEIO DA ATIVIDADE NITRÉRGICA NO TENDÃO DE RATOS SUBMETIDOS À TENOTOMIA COM SUTURA ACELERA A REGENERAÇÃO MUSCULAR.

Belém
2012

ADRIENE DAMASCENO SEABRA

O BLOQUEIO DA ATIVIDADE NITRÉRGICA NO TENDÃO DE RATOS SUBMETIDOS À TENOTOMIA COM SUTURA ACELERA A REGENERAÇÃO MUSCULAR.

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

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

Belém

2012

O BLOQUEIO DA ATIVIDADE NITRÉRGICA NO TENDÃO DE RATOS SUBMETIDOS À TENOTOMIA COM SUTURA ACELERA A REGENERAÇÃO MUSCULAR.

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

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

Banca Examinadora:

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

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

Prof^a. Dra. Karen Renata Oliveira – 2º Avaliador
ICB - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Evander Batista – Suplente
NMT - Universidade Federal do Pará

Belém

2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação do Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

A vocês que me incentivaram a lutar pelos meus objetivos e compartilharam de toda a angústia e alegrias, **Kátia e Aline Seabra**.

À sua presença sempre constante e proteção, onde quer que você esteja, **Eduardo Seabra**.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Anderson Manoel Herculano** pelo apoio profissional e pessoal concedido durante todo o decorrer da pesquisa. Pela sua compreensão e paciência.

Ao Prof. Dr. **Evander Batista** por sua colaboração e pelas palavras de apoio sempre constantes.

Aos **colegas** do laboratório de Neuroendocrinologia por toda a colaboração, ensinamentos e momentos de descontração. Em especial, **Daniele Braga, Luana Leão e Suzanne Suely**.

Ao Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental, de responsabilidade do Prof. Dr. **Walace Gomes Leal**, por todo auxílio e apoio nos momentos difíceis através de seus alunos **Marius, Igor, Otávio, Soanne, Celice, Rosana, Elane, Marcelo e Enio**.

As amigas **Keuri Eleutério, Suellen Moraes e Tarcyane Garcia**, por todos os ensinamentos, por toda a disponibilidade, pelos sucos, cafés e por todo o prazer em compartilhar o sucesso, muito obrigada!

Aos funcionários do Biotério, em especial **Amarildo e Marcelo**, por toda a disponibilidade durante a pesquisa.

À Prof. Dr. **Karen Renata Oliveira** por toda sua preocupação com relação a mim e a pesquisa durante esses dois anos.

À **UFPA**, seus servidores e ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular – **PPNBC**. Ao **CNPq** e **CAPES** que tornaram este trabalho financeiramente viável.

Aos meus tios e tias (especialmente **Márcia, Alberto e Cristina**), primos e primas (principalmente **Luana**) e meus avós - **Família Damasceno** que nunca

mediram esforços para auxiliar, apoiar e comemorar minhas conquistas. Em especial minha mãe, **Kátia Seabra**, que sempre foi um exemplo de força. Minha irmã, **Aline Seabra**, meu espelho para iniciar na pesquisa. E mais especial ainda, ao **Deus** que sempre anda ao meu lado.

Ao meu “cunhado” **Mauro Campos**, pela sua solicitude sempre presente.

Aos meus amigos, em especial **Carla Magalhães, Danusa Neves, Gerlane Noronha, Ingrid Bergma, Juliana Seligmann, Mônica Maués, Shirley Albuquerque, Silvia Rozatti e Sirleide Braga** por todo o incentivo.

À **Maria José Ribeiro Maués** por sempre torcer e comemorar minhas vitórias.

A uma força maior que eu creio que esteja sempre me protegendo, meu pai **Eduardo Seabra**.

E, não menos importante, **Daniel Araújo** pelo ombro amigo, pelo incentivo, pela paciência e pelo abraço sereno na hora mais necessária.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A atrofia é uma resposta imediata do músculo em situações de tensão e carga reduzida e caracteriza-se por mudanças morfológicas, aumento da proteólise muscular, perda de massa e redução da área da fibra que estão implicadas em déficits funcionais, afetando assim a qualidade de vida dos indivíduos. Rupturas tendíneas ocasionam atrofia muscular devido à intrínseca relação funcional existente entre ambas as estruturas, músculos-tendões. Considerando a injúria tendínea, trabalho prévio do nosso grupo identificou que a inibição da síntese de óxido nítrico localmente a injúria acelerou a recuperação histológica no tendão e a melhora funcional em animais tenotomizados. Desta forma, a proposta do trabalho é avaliar os efeitos da inibição nitrérgica local no tendão em relação ao padrão de regeneração muscular. Portanto, para gerar atrofia muscular esquelética, o trabalho utiliza o modelo experimental de ruptura do tendão calcâneo com posterior sutura. Os grupos foram divididos em controle, ruptura, ruptura+veículo (Salina 0,9%) e ruptura+L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME, 5mM). As amostras foram coletadas 14 e 21 dias seguintes ao procedimento cirúrgico experimental. Objetivando avaliar a dosagem de proteínas, o método de Bradford foi utilizado. As amostras também foram reservadas para processamento histológico qualitativo e quantitativo da área da fibra muscular e presença de lesões de núcleo central. Assim como no trabalho prévio de nosso grupo, acreditamos que a ação da droga restringiu-se ao local, pois não ocasionou fortes influências em relação ao peso corporal dos animais, que foi medido nos dias 0, 7, 14 e 21. O grupo tratado com L-NAME apresentou diminuição significativa no número de lesões de núcleo central no 14º dia pós-operatório e aumento nos níveis de proteína e área da fibra no 21º dia. Em conjunto, nossos resultados sugerem que houve efeito benéfico da inibição local da NOS após a ruptura com relação à atenuação da atrofia, contribuindo para acelerar a regeneração muscular.

Palavras-chave: óxido nítrico; regeneração muscular; atrofia; tendão.

ABSTRACT

Muscle atrophy is an immediate response of muscle under both situations of reduced tension and unloading. It is characterized by morphological changes, increase in muscular proteolysis, loss of mass and decrease in fiber area which are implicated in functional deficits, affecting the life quality of individuals. Tendon ruptures induce muscle atrophy due to intrinsic functional connection between both structures. Our previous work has shown that local inhibition of nitric oxide synthesis accelerated histological recovery in tendon and functional improvement in tenotomized animals. The present study was undertaken in order to evaluate the effects of local nitrenergic inhibition on pattern of skeletal muscle regeneration after tenotomy. Skeletal muscle atrophy was induced by experimental rupture of the calcaneal tendon followed by suture. Animals were divided in the following groups, control, rupture, rupture + vehicle (0.9 % Saline) and rupture + L-nitroarginine methyl ester (5 mM L-NAME). Muscle samples were obtained 14 and 21 days after experimental surgical procedure. Total protein was measured by Bradford method. Samples were also used to qualitative and quantitative histological processing to determination of muscle fiber area and central core lesion. Animals were weighed at 0, 7, 14 and 21 days after surgery. Animals showed no significant differences in body weights, suggesting that drug had a local action. Group treated with L-NAME showed significant decrease in number of central core lesions at 14th postoperative day and increase in protein levels and fiber area at 21th day. Taken together our results suggest that local NOS inhibition had a beneficial effect after tendon rupture with regard to attenuation of atrophy, contributing for acceleration of muscle regeneration.

Key-words: nitric oxide; muscle regeneration; atrophy; tendon

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Páginas
Figura 1: Ruptura total do tendão de Aquiles	15
Figura 2: Organização do tecido conectivo e sua disposição no tecido muscular esquelético.	18
Figura 3: Organização estrutural da unidade contrátil na miofibrila.	20
Figura 4: Células satélites durante diversos estágios, desde a quiescência até maturação e formação de nova fibra muscular.	23
Figura 5: Esquema da reação de inibição da síntese de óxido nítrico.	28
Figura 6: Representação esquemática do desenho experimental do trabalho	36
Figura 7: Ganho de massa corporal 14 dias (A) e 21 dias (B) após o procedimento cirúrgico.	41
Figura 8: Diminuição do peso úmido muscular em 14 dias (A) e 21 dias (B) da ruptura tendínea.	42
Figura 9: Níveis de proteína total no músculo em 14 (A) e 21 dias (B) após a tenotomia experimental.	44
Figura 10: Caracterização histológica da presença de lesões de núcleo central	47
Figura 11: Quantificação de fibras apresentando lesões de núcleo central.	48
Figura 12: Morfologia da fibra muscular após 21 dias de lesão e tratamento local.	51
Figura 13: Quantificação da área da fibra muscular	52

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 MÚSCULO	17
2.2 LESÃO TENDÍNEA	24
2.2.1 LESÃO TENDÍNEA X ÓXIDO NITRICO	24
2.3 CARACTERISTICA DA ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA POR RUPTURA TENDÍNEA	29
2.3.1 BASE MOLECULAR DA ATROFIA	29
2.3.2 CARACTERISTICAS HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais	34
4.2 Tenotomia Experimental	34
4.3 Grupos Experimentais	35
4.4 Dosagem de Proteína Total	37
4.5 Processamento Histológico	37
4.5.1. – Processamento e corte das amostras	37
4.5.2 - Hematoxilina Eosina	38
4.5.3 - Análise morfológica quantitativa e qualitativa	38
4.6 Análise Estatística	39
5 – RESULTADOS	40
5.1 – Massa corporal dos animais submetidos ao tratamento com L-NAME.	40
5.2 - Modelo de tenotomia provocou alteração no peso úmido do músculo.	40
5.3 - O uso de L-NAME alterou o nível de proteína total no músculo sóleo dos animais.	43
5.4 - Tratamento com L-NAME reduziu o aparecimento de lesões de núcleo central.	45

5.5 - Inibição da síntese de óxido nítrico aumentou a área da fibra muscular.	49
6 - DISCUSSÃO	53
7 - CONCLUSÃO	59
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

A atrofia muscular esquelética constitui como importante objeto de pesquisa, uma vez que se encontra relacionada a uma gama de patologias como a insuficiência renal, diabetes e câncer (LECKER *et al.*, 2004; BIALEK *et al.*, 2011). Também é relatado que processos de atrofia muscular estão secundariamente associados à imobilização, envelhecimento e rupturas tendíneas (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; BIALEK *et al.*, 2011).

O processo atrófico constitui uma resposta imediata do tecido muscular em situações de tensão e/ou carga mecânica reduzida. Essa alteração possivelmente encontra-se relacionada à manutenção do funcionamento eficaz muscular de acordo com as novas exigências funcionais (BAEWER *et al.*, 2008).

Independente da causa, a resposta atrófica se caracteriza por inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas nos músculos esqueléticos, relacionadas com o aumento da proteólise muscular, perda de massa e diminuição da força, as quais posteriormente acarretam déficits funcionais (JAMALI *et al.*, 2000; JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

Desta forma, os casos de atrofia muscular secundários à ruptura tendínea merecem atenção especial, pois acometem a integridade do complexo músculo-tendão, acarretando alterações particulares que repercutirão em ambos os tecidos, já que os mesmos atuam de forma coordenada e intrínseca para eficácia do aparelho locomotor (KJAER, 2004).

Estudos revelam que nos dias que se seguem à ruptura tendínea, a falta de carga muscular e o encurtamento das fibras são os principais determinantes para a degeneração do músculo (BAEWER *et al.*, 2008).

Diversos exemplos de lesões tendíneas podem ser utilizados para ilustrar a degeneração muscular. Estes incluem, principalmente nos desportos, as rupturas do tendão calcâneo, conhecido também como de Aquiles e formado pelos tendões dos músculos gastrocnêmio medial, lateral e sóleo (JAMALI *et al.*, 2000; RILEY, 2008) (Figura 1).

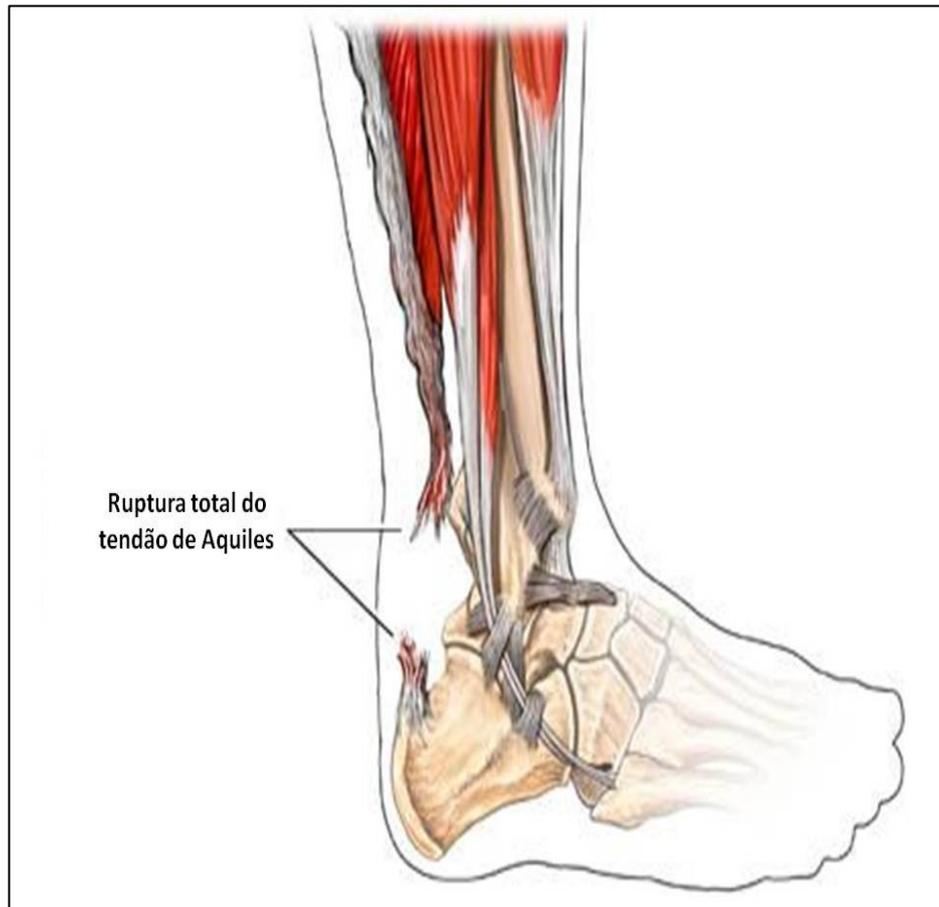


Figura 1: Tendão de Aquiles humano. Frequentemente acometido por lesões traumáticas relacionadas aos esportes. Fonte: Nucleus Medical Media Inc, 2012. Disponível em <http://www.patientedlibrary.com/generateexhibit.php?ID=30898>

Nos últimos anos, diversas pesquisas focaram-se nas alterações bioquímicas e estruturais e, principalmente, no reparo cicatricial dos tendões após tenotomia traumática. No entanto, ainda há escassez sobre a resposta muscular, tanto no decurso da doença quanto na regeneração (JAMALI *et al.*, 2000).

Nessa óptica, dada a relevância e implicação clínica da lesão tendínea com relação às mudanças morfológicas, bioquímicas e funcionais musculares, torna-se importante a realização de estudos que por meio da ação na injúria tendínea, avaliem a fisiopatologia muscular. Isto contribui com um conhecimento mais aprofundado sobre a complexidade muscular em resposta à lesão, a reabilitação e as pesquisas que visem minimizar o impacto sobre a qualidade de vida do indivíduo.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

O adequado desempenho locomotor é proveniente da integridade e intrínseca relação do complexo músculo-tendão, que inclui a arquitetura e as propriedades biomecânicas de cada estrutura (FINNI, 2006).

Com especificidades diferentes, músculos e tendões trabalham juntos durante a transmissão de força e dependem não somente da interação das fibras musculares com as fibras colágenas tendíneas, mas também da associação de uma rede de tecido conectivo para a eficiência do complexo motor (KJAER, 2004; FINNI, 2006).

Didaticamente, músculos e tendões são tratados de forma independente, no entanto encontram-se funcionalmente integrados (ROBERTS, 2002). Portanto, alterações que interferem na integridade de cada um isoladamente, como rupturas tendíneas ou imobilizações musculares, desencadeiam prejuízos morfológicos e bioquímicos em ambas as estruturas (KJAER, 2004).

Os músculos mantêm uma tensão de repouso permanente quando conectados aos tendões. Quando há ruptura tendínea, esta tensão imediatamente decai e ocorre encurtamento das unidades motoras, fato que provoca alterações imediatas nas fibras musculares (JAMALI *et al.*, 2000).

Desta forma, considerando-se a importância da integridade da unidade músculo-tendão para o sistema locomotor como um todo, faz-se necessário conhecer mais detalhadamente a respeito do nosso objeto de estudo.

2.1 - MÚSCULO

O tecido muscular estriado esquelético apresenta estrutura altamente ordenada tanto celular quanto molecularmente o que confere como principais funções a capacidade locomotora, respiração, geração de força e manutenção postural (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). Cada fibra muscular é uma única célula cilíndrica, longa e multinucleada com uma fina membrana plasmática chamada sarcolema (GREFTE *et al.*, 2007).

A fina camada de tecido conjuntivo intramuscular que reveste cada fibra e por onde passam capilares é denominada de endomísio. O perimísio circunda os fascículos de miofibras, contendo vasos sanguíneos mais calibrosos, artérias e nervos. Por fim, o epimísio constituído de tecido conjuntivo denso, envolve o músculo (Figura 2) (JÄRVINEN *et al.*, 2002; PURSLOW, 2002; JÄRVINEN *et al.*, 2005).

Além de promover suporte para a rede de irrigação muscular, as camadas de tecido conectivo intramuscular se interconectam e permitem a propagação de força homogênea não somente do músculo para o tendão e, posteriormente, para o osso (força miotendinosa), como também provê a transmissão lateral entre as fibras (força miofascial). Ambos, tecido conectivo intramuscular e tendões, interagem com os elementos contráteis musculares para a transmissão de força (JÓZSA *et al.*, 1990; TAKALA; VIRTANEN, 2000; HUIJING, 2003; KJAER, 2004).

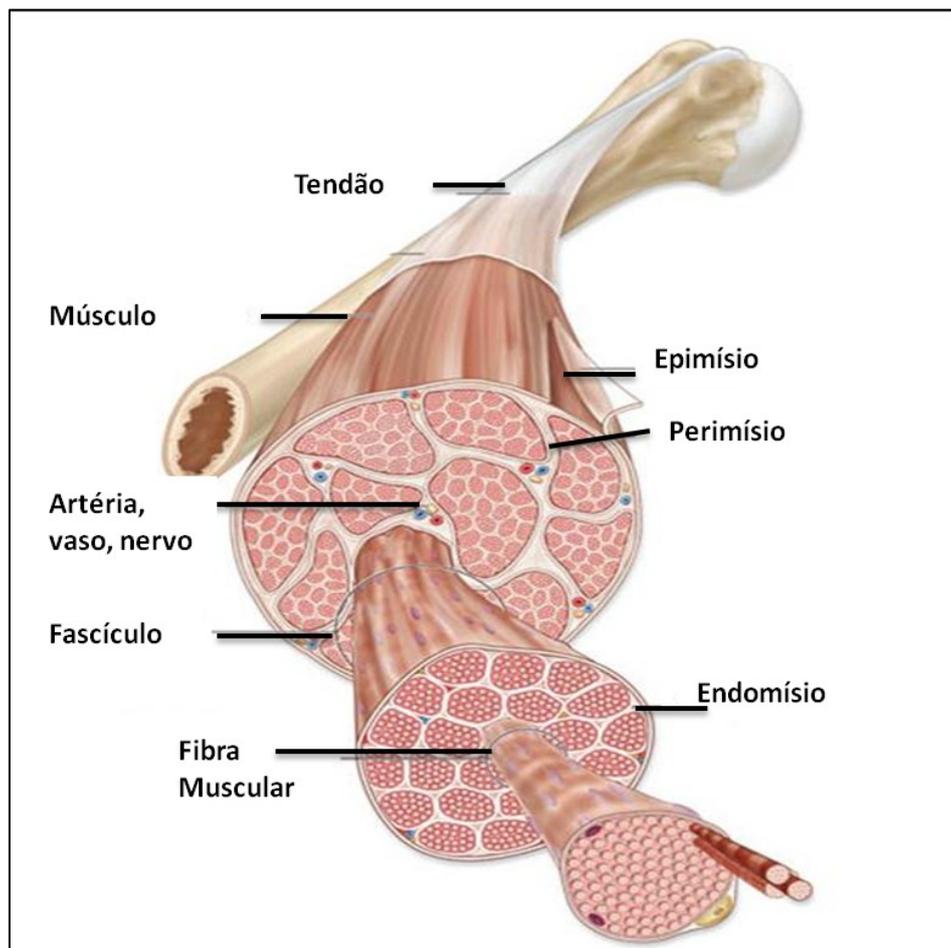


Figura 2: Organização do tecido conectivo e sua disposição no tecido muscular esquelético.
Fonte Disponível: Adaptado <http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bi201McKinley/muscular.htm>

Os músculos esqueléticos são constituídos por diferentes tipos de fibras com ampla capacidade funcional (PETTE; STARON, 2000; SCOTT *et al.*, 2001). A identificação das isoformas de cadeia pesada de miosina (MHC), em fibras isoladas, proporcionou a classificação das fibras em puras e híbridas. Portanto, as fibras musculares puras que expressam uma única isoforma de MHC I, IIA, IIB e IIX, são fibras do tipo I, IIA, IIB e IIX, respectivamente. Enquanto as fibras híbridas expressam mais de uma isoforma de MHC, exemplo: I/IIA, IIA/IIX, IIX/IIB. (PETTE, 2001; WESTERBLAD; BRUTON; KATZ, 2010; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

De forma didática e generalista, músculos com predominância de fibras do tipo I, como o músculo sóleo, são chamados de músculos vermelhos e classificados como de contração lenta, ricos em mioglobina e enzimas oxidativas, apresentam baixo consumo de ATP, maior rede de capilares e são especializados para atividades tônicas que necessitem de maior resistência à fadiga. Ao contrário, músculos que apresentam preponderância de fibras do tipo II, como gastrocnêmio, são denominados de músculos brancos, pois apresentam contração rápida, são especializados para atividades fásicas, possuem metabolismo glicolítico, alto gasto energético e apresentam maior grau de fadigabilidade (PETTE; STARON, 2000; SCOTT *et al.*, 2001; GREFFE *et al.*, 2007; WESTERBLAD; BRUTON; KATZ, 2010).

Eventos como as rupturas tendíneas normalmente ocasionam transições fenotípicas reversíveis nas fibras musculares, passando de contração rápida para lenta ou vice-versa (PETTE; STARON, 2000; JÄRVINEN *et al.*, 2005).

Cada fibra muscular é composta no seu interior por diversas miofibrilas, as quais alojam as complexas unidades contráteis do músculo, dispostas de maneira repetitiva e ordenada, denominadas sarcômeros (CLARK *et al.*, 2002; GREFFE *et al.*, 2007) (Figura 3).

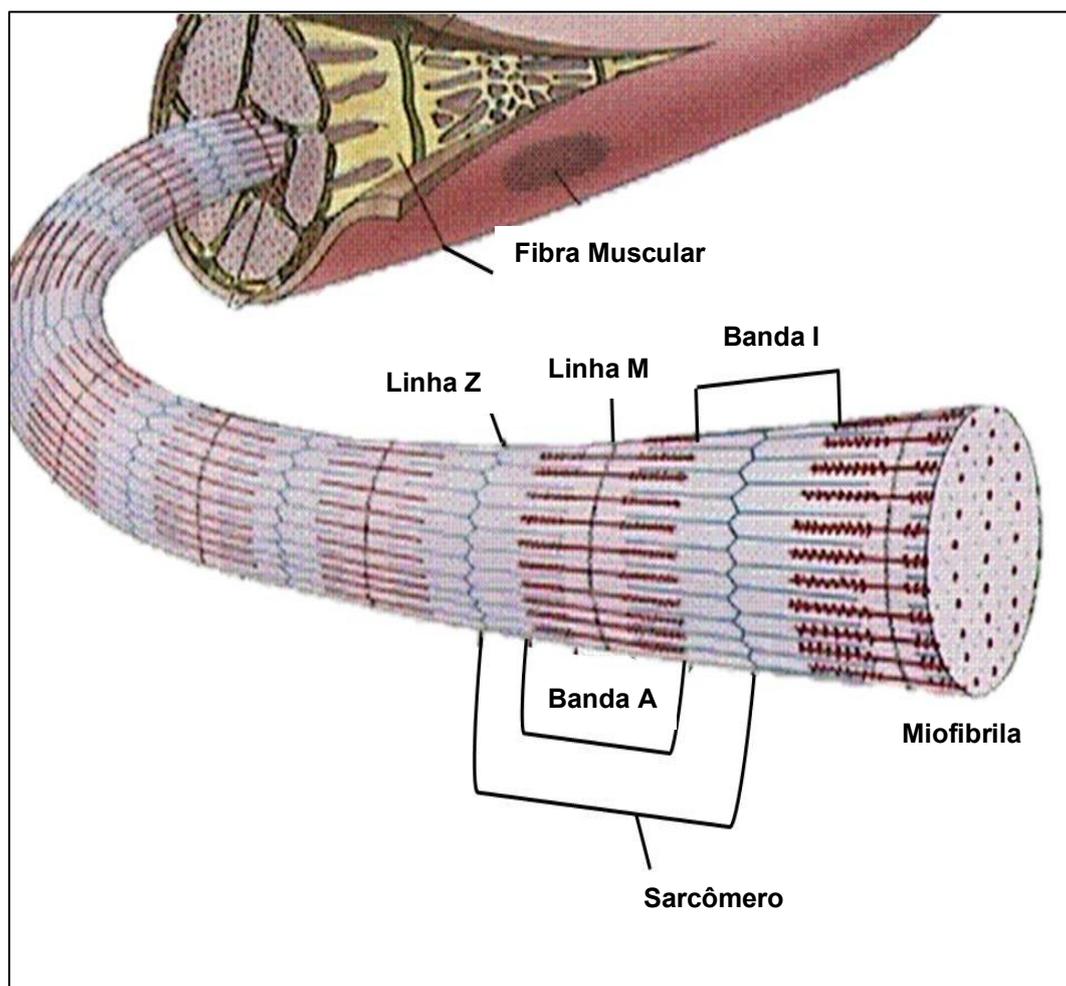


Figura 3: Organização estrutural da unidade contrátil na miofibrila. O espaço compreendido entre duas linhas Z, incluindo uma banda A, uma semibanda I e uma linha M, denomina-se sarcômero.

Fonte: Adaptado de <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/biobookmusskel.html>

Funcionalmente indispensável cada sarcômero é formado por estruturas denominadas: banda-A (constituída por filamentos grossos e por uma zona de sobreposição destes aos filamentos finos); banda-I (composta por filamentos finos dispostos de forma paralela e alinhada); linha-Z (região que demarca o centro da banda-I e ancora os filamentos finos); e por fim, linha-M (que delimita o centro da banda-A e sustenta os filamentos grossos). Cada sarcômero é a região compreendida entre duas linhas-Z, que inclui duas semi bandas-I e uma banda-A (CLARK *et al.*, 2002; TAJSHARGHI, 2008; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011) (Figura 3).

O sistema actina-miosina propaga a força através da linha-Z do sarcômero que a transduz por meio de sua conexão com a matriz extracelular. Tal fato é devido à função da linha-Z de proporcionar transmissão de força longitudinal, entre sarcômeros adjacentes, e força transversal, entre as miofibrilas (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

O alinhamento adequado e preciso entre os filamentos finos e grossos é imprescindível no processo contrátil. As proteínas actina, miosina, troponina e tropomiosina são as principais envolvidas no processo (CLARK *et al.*, 2002; TAJSHARGHI, 2008).

Resumidamente, a contração ocorre a partir de um potencial de ação, proveniente do neurônio motor, que ocasiona despolarização do sarcolema, com consequente liberação de íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citosol. Estes íons se associam à troponina que através da mudança conformacional de suas três subunidades empurra a molécula de tropomiosina mais para o interior do sulco da hélice da actina. Conseqüentemente, os sítios de ligação dos componentes globulares da actina ficam expostos e ocorre interação desta com a cabeça de miosina ocasionando a decomposição de ATP em ADP + energia. Assim, o filamento fino desliza sobre o filamento grosso promovendo o encurtamento do sarcômero, fato este que caracteriza a contração muscular (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

Uma importante característica do tecido muscular esquelético é sua capacidade de adaptar-se em resposta a diferentes demandas ambientais e fisiológicas, as quais conferem ao tecido o uso do termo “plasticidade muscular” (PETTE, 2001; GIGER *et al.*, 2009).

Neste tecido com ampla capacidade adaptativa encontram-se uma população de células mononucleadas e indiferenciadas, denominadas de células satélites, as quais contribuem de forma crucial para a regeneração (ANDERSON, 2006; GREFTE *et al.*, 2007).

Tal nomenclatura dá-se devido à localização anatômica estratégica na fibra muscular, abaixo da lâmina basal e justaposta ao sarcolema, onde permanecem mitoticamente quiescentes, até sofrerem ativação por estímulos como crescimento, remodelação ou regeneração. Quando ativadas, proliferam-se podendo seguir dois caminhos: fundem-se com as fibras musculares já existentes e possivelmente lesionadas ou agregam-se entre si para formar uma nova fibra (JÄRVINEN *et al.*, 2005; ANDERSON, 2006; GREFTE *et al.*, 2007; TEDESCO *et al.*, 2010) (Figura 4).

Em estado quiescente, as células satélites são fusiformes, com poucas organelas citoplasmáticas, apresentam elevada heterocromatina e núcleos bem menores quando comparados com os mionúcleos. Em contrapartida, quando ativadas, após um evento danoso ao músculo, demonstram redução da heterocromatina, expansão citoplasmática e aumento no número de organelas intracelulares (WOZNIAK *et al.*, 2005).

Desta forma, contribuindo para a regeneração muscular, a ativação de CS ocorre frequentemente após diversos tipos de injúria sejam elas diretamente no músculo (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; TEDESCO *et al.*, 2010) ou de modo indireto pela lesão em estruturas adjacentes como a ruptura do tendão (TOMANEK; COOPER, 1972).

Sabendo-se que a lesão tendínea gera quadros de atrofia muscular, e que os mesmos acarretam alterações morfológicas e bioquímicas nas fibras, torna-se relevante uma compreensão adequada da injúria e seus fatores preponderantes que implicam em dano muscular.

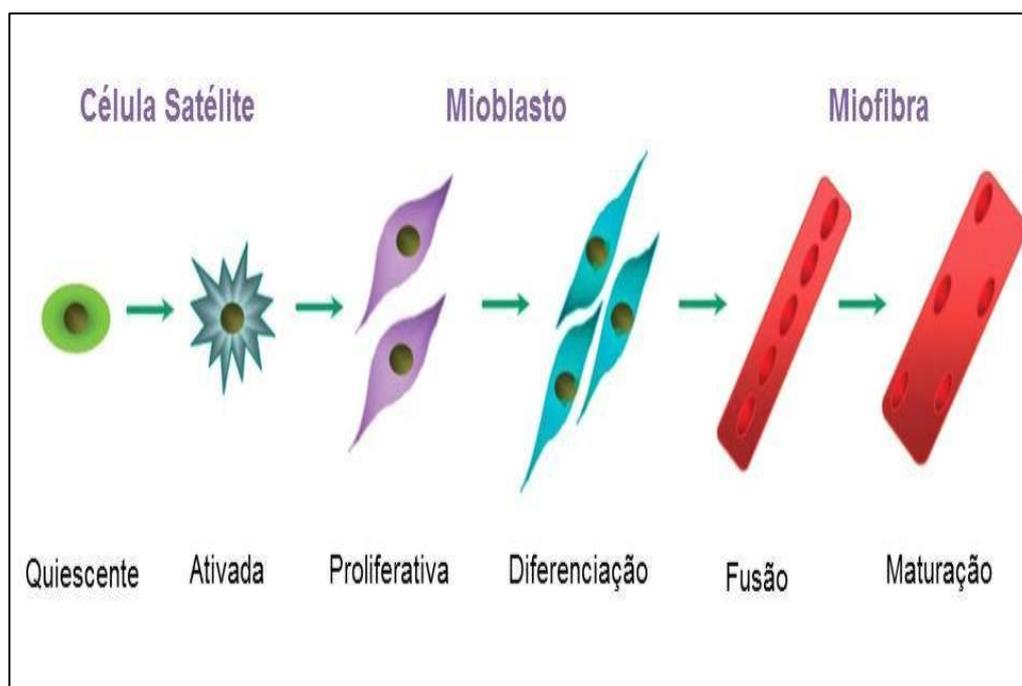


Figura 4: Células satélites em diferentes estágios, desde a quiescência até maturação e formação de nova fibra muscular. Fonte: Modificado de Zammit et al., 2006.

2.2 – LESÃO TENDÍNEA

Clinicamente as lesões nos tendões podem configurar-se como doença aguda ou crônica (CLEGG; STRASSBURG; SMITH, 2007). Alguns estudos sugerem que as causas desencadeadoras para a injúria envolvem aspectos genéticos, sexo, idade, déficits metabólicos e/ou endócrinos, vascularização ineficaz, microtraumas cumulativos e principalmente sobrecarga excessiva durante atividades físicas (KADER *et al.*, 2002; XU; MURRELL, 2008). Tais causas, isoladas ou em associação, ocasionam um processo degenerativo que se configura como fator de risco para ruptura aguda do tendão (SHARMA; MAFFULLI, 2006; XU; MURRELL, 2008).

Consequente à ruptura, o organismo desencadeia uma série de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade do tecido tendíneo. Assim, o reparo segue através de três fases distintas que são: inflamação, proliferação celular e remodelação (JAMES *et al.*, 2008).

Durante o reparo, diversas células inflamatórias e fatores de crescimento são expressos no local da lesão com o objetivo de reestabelecer a integridade do tecido, por meio da proliferação celular, síntese de colágeno e neovascularização (SHARMA; MAFFULLI, 2006; XU; MURRELL, 2008). Dentre as várias moléculas que estão envolvidas no processo de reparo do tendão, o óxido nítrico (NO) destaca-se como importante molécula mensageira na patologia (SHARMA; MAFFULLI, 2006; TOMIOSSO *et al.*, 2009).

2.2.1 – O ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO TENDÍNEA

O NO é uma molécula sinalizadora intercelular presente em diversos sistemas biológicos. Tem meia-vida curta e é biosintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por uma família de enzimas chamadas NO Sintase (NOS) (MONCADA; HIGGS, 1995; MURRELL, 2007).

A enzima NOS possui três isoformas: NOSI, NOSII e NOS III. As isoformas I e III são constitutivamente expressas e necessitam da atividade do

complexo Ca^{2+} -calmodulina e de NADPH como co-fator, enquanto que a NOS II só é expressa em resposta a estímulos e independe do complexo Ca^{2+} -calmodulina. A reação de síntese utiliza L-arginina, como substrato na presença de O_2 molecular, e NADPH gerando um produto intermediário, NG-hidroxi-L-arginina, em seguida há formação de L-citrulina e NO. Após ser gerado, o óxido nítrico interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel no citoplasma formando o monofosfato de guanosina 3',5' – cíclico (GMPc), um importante segundo mensageiro (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA; HIGGS, 1995; MONCADA, 1999; POWERS; TALBERTL; ADHIHETTY, 2010).

Sendo uma molécula instável, o óxido nítrico pode reagir com outras biomoléculas, podendo ser rapidamente oxidado pelo O_2 apresentando como produtos finais do metabolismo nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), que normalmente são utilizados como uma medida indireta dos níveis de óxido nítrico, pois ficam acumulados nos sistemas biológicos. Outro derivado ativo de nitrogênio pode ser gerado, denominado peroxinitrito (ONOO^-), por meio da interação do NO com o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; POWERS; TALBERTL; ADHIHETTY, 2010).

Em um tendão sadio a atividade da NOS é bem pequena, todavia após ruptura do tendão calcâneo foi observado um aumento de aproximadamente cinco vezes na conversão de L-arginina para L-citrulina durante o processo de reparo, havendo a expressão das três isoformas da NOS (MURRELL, 2007). A isoforma NOSII demonstrou um aumento de aproximadamente 23 vezes entre os dias 4 -7, a NOSIII 24 vezes no dia 7 e a NOSI demonstrou um aumento de 7 vezes durante a fase de remodelação ao 21º dia (LIN *et al.*, 2001; MURRELL, 2007).

De acordo com as propriedades bioquímicas da NOS, uma grande variedade de substâncias são utilizadas como inibidores da síntese de NO em ensaios clínicos e farmacológicos. Dentre os análogos da L-arginina, destaca-se o papel do L-Nitro-Arginina-Metil-Éster (L-NAME) como um importante bloqueador não-seletivo da biossíntese do NO (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MURRELL, 2007) (Figura 5).

No entanto, a administração sistêmica de bloqueadores nitrérgicos parece ser bastante controversa. Dados demonstraram que a inibição

experimental da NOS apresentou redução na magnitude da regeneração do tendão sugerindo um papel modulador importante do sistema nitrérgico durante o reparo tendíneo. Entretanto, também foi observado durante a inibição sistêmica uma série de comprometimentos em paralelo, os quais podem evidenciar que a inibição sistêmica acarreta prejuízos na homeostase do organismo animal e estes prejuízos podem ocasionar déficits que comprometem a regeneração como um todo. (VALLANCE, 2003; MURREL, 2007).

Alguns parâmetros biomecânicos também sugerem prejuízo na cicatrização tendínea, após o uso sistêmico de L-NAME enquanto que parâmetros bioquímicos apresentam resultados contrários (TOMIOSSO *et al.*, 2009).

A inibição sistêmica prolongada da NOS em modelo animal de injúria cardiovascular levou a um alto índice de mortalidade (TOFOVIC *et al.*, 2005), bem como os efeitos sistêmicos difusos da droga bloqueadora das isoformas da NOS prejudicaram a imunidade dos animais e comprometeram a integridade do sistema nervoso central (MURREL, 2007).

Logo, a administração sistêmica de bloqueadores nitrérgicos é questionável, uma vez que estes podem inibir as ações fisiológicas do NO, essenciais para a homeostase do tecido – como a manutenção do tônus vascular – e não somente sua possível ação citotóxica tecidual. (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA; HIGGS, 1995; VALLANCE, 2003).

Considerando tal evidência sobre a dualidade dos efeitos da inibição sistêmica, em trabalho prévio e inovador do nosso laboratório utilizou-se a administração local de L-NAME em modelo de ruptura tendínea. Neste estudo, foi observado que a inibição nitrérgica local no tendão calcâneo favoreceu a recuperação funcional e histológica 21 dias após a injúria, sem demonstrar alterações em parâmetros sistêmicos. Desta forma, nosso grupo evidenciou que a redução da síntese de NO localmente, pelo uso de L-NAME, melhorou o padrão de organização das fibras colágenas no tecido e promoveu melhora no desempenho funcional da marcha dos animais submetidos à injúria (MORAES, 2011).

Portanto, partindo deste pressuposto e considerando a intrínseca relação músculo-tendão surgiu o interesse em avaliarmos se tal ação positiva

do uso de L-NAME localmente durante o reparo cicatricial tendíneo seria também benéfica para a regeneração muscular durante o processo atrófico.

Ressaltamos que não foi identificada nenhuma pesquisa que averiguasse o efeito do uso de L-NAME no tendão com relação à atrofia muscular.

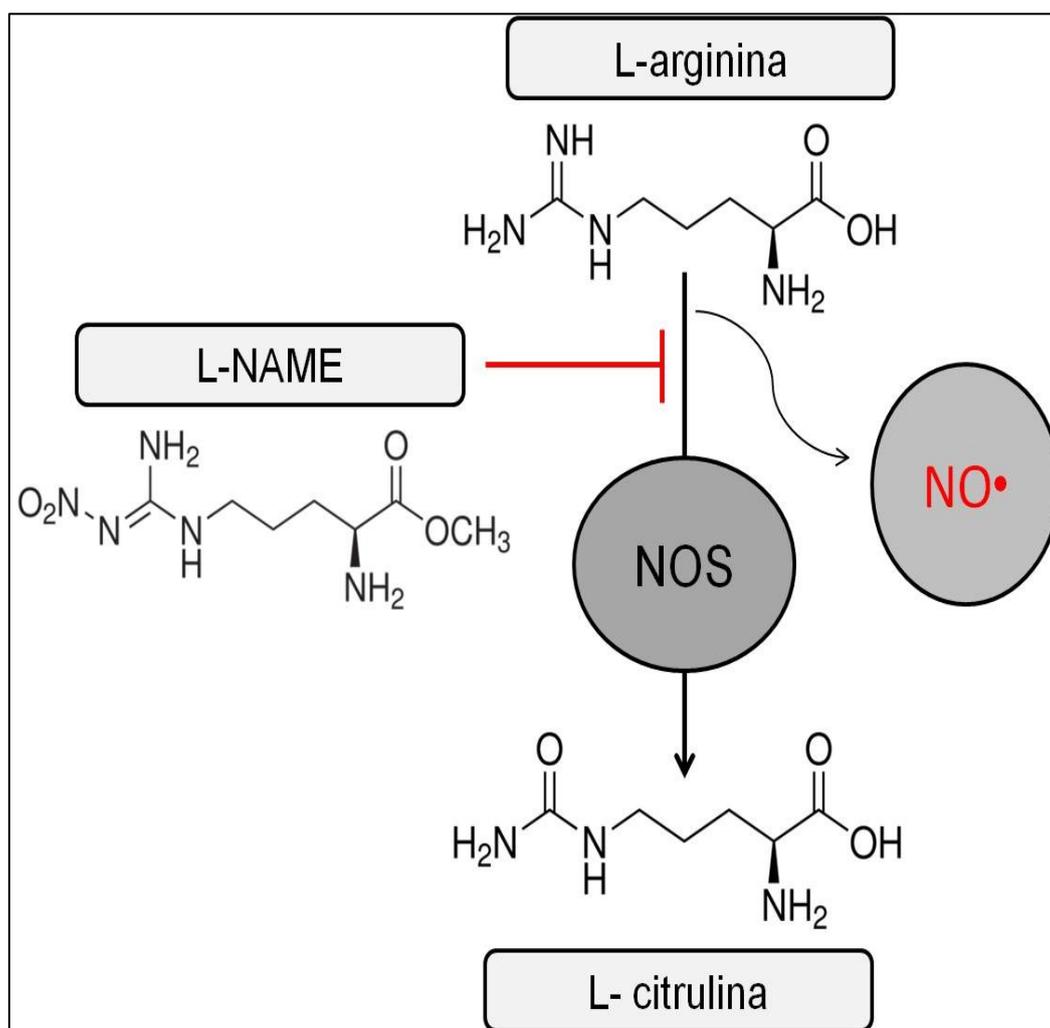


Figura 5: Esquema da reação de inibição da síntese de óxido nítrico. O L-NAME é o inibidor da síntese de óxido nítrico, pois é um análogo da arginina e bloqueador não seletivo das isoformas da NOS.

Fonte das estruturas químicas da L-arginina, L-citrulina e L-NAME: Adaptado de <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

2.3 - CARACTERÍSTICAS DA ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA POR RUPTURA TENDÍNEA

A atrofia caracteriza-se pela perda de massa muscular em diferentes condições como desuso, imobilização, desnervação, tenotomia, microgravidade ou doenças, onde as consequências bioquímicas, funcionais e morfológicas comuns são: desbalanço entre a síntese e degradação proteica, diminuição da área da fibra muscular, aumento da fadigabilidade e reduzida produção de força e potência (TOMANEK; COOPER, 1972; MAXWELL; ENWEMEKA, 1992; MAXWELL; MOODY; ENWEMEKA, 1992; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; JAMALI, *et al.*, 2000).

O modelo de tenotomia, o qual representa a ruptura tendínea seja ela traumática ou cirúrgica (JAMALI *et al.*, 2000), reproduz de forma adequada as alterações musculares encontradas no homem. No entanto, diferentemente dos modelos de desuso, imobilização e denervação, o modelo de tenotomia ainda é pouco estudado (BIALEK *et al.*, 2011).

2.3.1 BASE MOLECULAR DA ATROFIA

Diversas proteínas têm crucial importância na sinalização intracelular da atrofia, cuja função é desencadear uma cascata de eventos moleculares que culminam com o aumento da degradação proteica, ocasionando a perda de massa muscular e consequente diminuição da área da fibra (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; POWERS; SMUDER; CRISWELL, 2011).

Uma importante via neste processo, ocorre a partir da supressão do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) que ativa fatores de transcrição da família *Forkhead box O* (FoxO), envolvido em processos biológicos diversos como morte celular, crescimento tumoral, proliferação celular e longevidade (SUZUKI *et al.*, 2007).

No músculo normal, a proteína quinase B (Akt) atenua a ação de FoxO por meio da fosforilação deste no citoplasma. Quando ocorre a inativação da Akt devido à atrofia, o fator de transcrição FoxO é desfosforilado e ativa *muscle atrophy F-box* (MAFbx) e *muscle RING-finger protein-1* (MuRF-1) no núcleo celular, que são importantes mediadores atrofícos denominados de atrogenes.

No entanto pouco ainda se sabe sobre tais moléculas ativadoras da diminuição da síntese proteica. Desta forma, os fatores de transcrição FoxO têm papel crucial no desencadeamento da atrofia muscular (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; SUZUKI *et al.*, 2007; POWERS; SMUDER; CRISWELL, 2011).

Neste contexto, a degradação proteica ocorre por meio da ação coordenada de quatro sistemas que são: protease de cisteína dependente de cálcio (calpaínas); dependente das caspases; protease lisossomais (catepsina) e atividade do proteassoma mediado pela ubiquitina (BIALEK *et al.*, 2011; POWERS; SMUDER; CRISWELL, 2011).

Jackman e Kandarian (2004) sugerem que há interação coordenada entre as vias no decorrer do processo atrofico. Em uma visão atual, acredita-se que as catepsinas sejam responsáveis por degradar proteínas de membrana como receptores, canais iônicos e transportadores, sendo incapazes de degradar proteínas miofibrilares.

Sendo assim, as caspases e as calpaínas provavelmente atuam de forma similar promovendo a clivagem das proteínas miofibrilares para que as mesmas sejam envolvidas no processo de ubiquitinação pela ação das enzimas E1, E2 e E3 para degradação no proteassoma, sabendo-se que o mesmo não é capaz de degradar proteínas intactas (JACKMAN; KANDARIAN, 2004).

Recentemente, observou-se que dependendo do modelo de indução atrofica, a ativação dos sistemas proteolíticos pode apresentar particularidades. Um aumento na expressão de genes relacionados à degradação lisossomal ocorre no modelo de tenotomia, enquanto que a via do proteassoma é regulada mais expressivamente no modelo de imobilização (BIALEK *et al.*, 2011). Tal fato pode ser devido, às características biomecânicas diferentes entre os modelos, no entanto, não se deve excluir uma regulação coordenada entre os sistemas.

2.3.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Devido à especificidade de cada fibra muscular, os dados obtidos para músculos de fibra de contração lenta (fibras do tipo I), os quais respondem com

maior severidade ao processo atrófico, não devem ser comparados a músculos com preponderância de fibras do tipo II (TOMANEK; COOPER, 1972; JAMALI *et al.*, 2000). Dados que corroboram essa afirmação mostram que após doze dias de tenotomia a massa do sóleo diminuiu 50% e do gastrocnêmio apenas 16%, ambos em relação ao controle (JAKUBIEC-PUKA *et al.*, 1992).

Neste sentido, alguns trabalhos associaram o modelo de tenotomia com a imobilização e verificaram da mesma forma que músculos de fibras lentas são mais susceptíveis a desenvolver atrofia em graus de moderado a severo (WAHLBY, 1981; MAXWELL; ENWEMEKA, 1992; MAXWELL; MOODY; ENWEMEKA, 1992).

Por microscopia eletrônica, Józsa e colaboradores (1990) identificaram mudanças no tecido conectivo intramuscular após tenotomia do calcâneo sem reparo. Os resultados evidenciaram que após três semanas do ato cirúrgico, o tecido conectivo do músculo sóleo aumentou, sugerindo que o tecido contrátil degenera-se mais rapidamente em comparação ao conectivo.

Paralelamente ao aumento do tecido conectivo intramuscular, observou-se redução no número de capilares, permanecendo somente metade após três semanas da transecção tendínea (JÓZSA *et al.*, 1990). No mais, os capilares apresentaram morfologia alterada, com a presença de fenestrações, provavelmente acompanhando as mudanças estruturais do músculo (DESAKI *et al.*, 2000).

Outro estudo também verificou que o número de capilares diminuiu significativamente após a tenotomia. Neste contexto, objetivando minimizar os danos o grupo realizou sutura com atraso e constatou que o número de capilares retornou a valores próximos ao controle algumas semanas depois do reparo, sugerindo que a sutura aumenta o movimento muscular e conseqüentemente o fluxo capilar devido a mobilização. Sendo desta forma um estímulo positivo para formação de novos capilares. (JOZSA *et al.* 1985).

Mudanças morfológicas no endomísio e perimísio como, alterações no volume, distribuição e organização também já foram identificadas após ruptura tendínea. Tais modificações, também observadas em outros modelos, possivelmente acarretam prejuízo na capacidade de gerar força e no comportamento elástico muscular (JÓZSA; THÖRING; JARVINEN, 1988; JÄRVINEN; JÓZSA; KANNUS, 2002).

Modelos experimentais de tenotomia são utilizados para comparações morfológicas com algumas doenças musculares, principalmente com miopatia nemalínica devido o acúmulo subsarcolemal de corpúsculos bastonetiformes em fibras musculares. As semelhanças estruturais incluem perda de filamentos grossos e linha-Z desorganizada (SALEM *et al.*, 2001).

Tanto em modelos de tenotomia quanto desuso foi observado áreas de lesões de núcleo central, caracterizadas por uma área de dissolução focal de miofibrilas no interior das fibras musculares poucos dias após a tenotomia (BAEWER *et al.*, 2004; BAEWER *et al.*; 2008). Tais alterações compõem-se de duas zonas, uma periférica com aparência normal sem lesões e outra central com miofibrilas sem alinhamento, edema mitocondrial e desorganização da linha-Z (SALEM *et al.*, 2001). Sugere-se que no interior da zona central ocorra degeneração de miofibrilas e tal fato encontra-se associado com o encurtamento de sarcômeros após a tenotomia (BAKER, 1985; BAEWER *et al.*, 2004)

Embora alguns estudos tenham enfatizado estratégias que minimizem os danos atróficos, seja por meio de estimulação elétrica (BARRY *et al.*, 1994), o uso de técnicas de alongamento (BAEWER *et al.*, 2008), ou suturas (WAHLBY, 1981; JÓZSA *et al.*, 1985) poucos trabalhos se focam em estratégias que minimizem os danos atróficos após tendinopatias. Neste contexto, até o presente nenhum trabalho analisou a regeneração muscular após tratamento químico no local da lesão tendínea.

Considerando que a ruptura do tendão ocasiona mudanças nas propriedades morfológicas e bioquímicas dos músculos e conhecendo-se o papel do sistema nitrérgico na injúria tecidual, surgiu o interesse de expandir os dados já conhecidos do nosso grupo para a avaliação muscular em dois tempos de sobrevida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de recuperação muscular em ratos tenotomizados submetidos à inibição nitrérgica *in loco* à lesão.

3.1 Objetivos Específicos

- Verificar o ganho de massa corporal nos diferentes grupos experimentais no decorrer de 07, 14 e 21 dias;
- Observar a variação do peso úmido muscular, em animais com e sem uso de L-NAME localmente no tendão, após 14 e 21 dias do procedimento cirúrgico experimental;
- Quantificar, por meio de espectrofotometria, o nível de proteína muscular total nos diferentes grupos experimentais no período de 14 e 21 dias;
- Identificar lesões de núcleo central, por meio de microscopia de luz, nas fibras musculares de animais submetidos à tenotomia e tratados ou não com L-NAME em 14 dias;
- Avaliar a medida da área da fibra após injeção local de L-NAME no tendão calcâneo dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico experimental no decorrer de 21 dias.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), machos, adultos, pesando entre 240 e 280g provenientes do Biotério central pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas padrão contendo em média 4 animais, forradas com maravalha de pinus autoclavada, em ambiente climatizado com temperatura controlada a 21°C, condições padronizadas de luz (12:12 claro:escuro) e alimentação (água e ração balanceada *ad libitum*). Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA, protocolo BIO-0021-11). Todos os esforços foram realizados para evitar estresse excessivo nos animais.

4.2 - TENOTOMIA EXPERIMENTAL

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com uma associação de Cloridrato de Cetamina 10% (80 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12 mg/kg). A pata traseira direita, em sua porção ínfero-posterior (região do calcâneo) foi tricotomizada e limpa. Após este procedimento, realizou-se incisão cirúrgica longitudinal na região póstero-lateral da pele higienizada previamente, objetivando a exposição parcial do tendão calcâneo. A pele foi dissecada, para melhor isolamento do mesmo e posteriormente com o intuito de induzir atrofia muscular esquelética realizou-se a ruptura cirúrgica do tendão, denominada tenotomia.

A tenotomia passiva experimental consistiu na secção cirúrgica total do tendão, o qual é responsável pela inserção dos músculos Gastrocnêmio e Sóleo no osso calcâneo.

A cirurgia foi realizada em duas etapas. Primeiramente realizamos sutura, baseada no método de Kessler adaptado (GIORDANO, 2004), utilizando-se fio de poliamida monofilamento não absorvível número 4.0. A

sutura antes da ruptura ocorreu devido à exígua extensão do tendão. Em seguida, houve completa transecção tendínea, considerando-se 0,5 cm acima da inserção do tecido no calcâneo.

Posteriormente, a pele recebeu sutura com pontos simples até seu total fechamento. Métodos assépticos diários foram realizados com o uso de solução iodada por um período aproximado de 10 dias em todos os grupos. Nenhum método de imobilização do membro ou restrição de movimento foi utilizado durante o experimento.

Os animais foram mortos por decapitação decorridos 14 ou 21 dias após o procedimento cirúrgico experimental. As patas traseiras direitas (operadas ou não) sofreram dissecação muscular, respeitando o tempo máximo de 6 minutos. O músculo Sóleo, medindo aproximadamente 2 cm de comprimento, foi seccionado em sua origem e inserção para o estudo das alterações histomorfométricas e bioquímicas.

4.3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para esta pesquisa foram planejados 4 grupos experimentais: grupo CONTROLE, (n= 4); grupo RUPTURA, constituído de animais que sofreram tenotomia experimental (n=6); grupo RUPTURA + SALINA, grupo tratado com solução salina 0,9% (pH 7.4) administrada no tendão após a ruptura (n=6); e o grupo RUPTURA + L-NAME, representado por animais que após o procedimento cirúrgico foram tratados com L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico, diluído em salina 0,9% e administrado localmente no tendão (n=6) (Figura 6).

A dose de L-NAME utilizada foi de 100 µl e administrada nos animais no local da lesão. Tal dose e administração tiveram como base trabalho prévio do nosso grupo (MORAES, S.A, 2011). Com o auxílio de uma seringa descartável, tanto a solução salina, quanto o L-NAME foram injetados localmente na região paratendínea e a cada dois dias a partir do primeiro dia após a lesão. Os animais foram monitorados diariamente e pesados no dia da cirurgia experimental e também em 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Os animais foram mortos por decapitação cervical em dois tempos de sobrevivência (14 e 21 dias) após o procedimento cirúrgico experimental de ruptura tendínea.

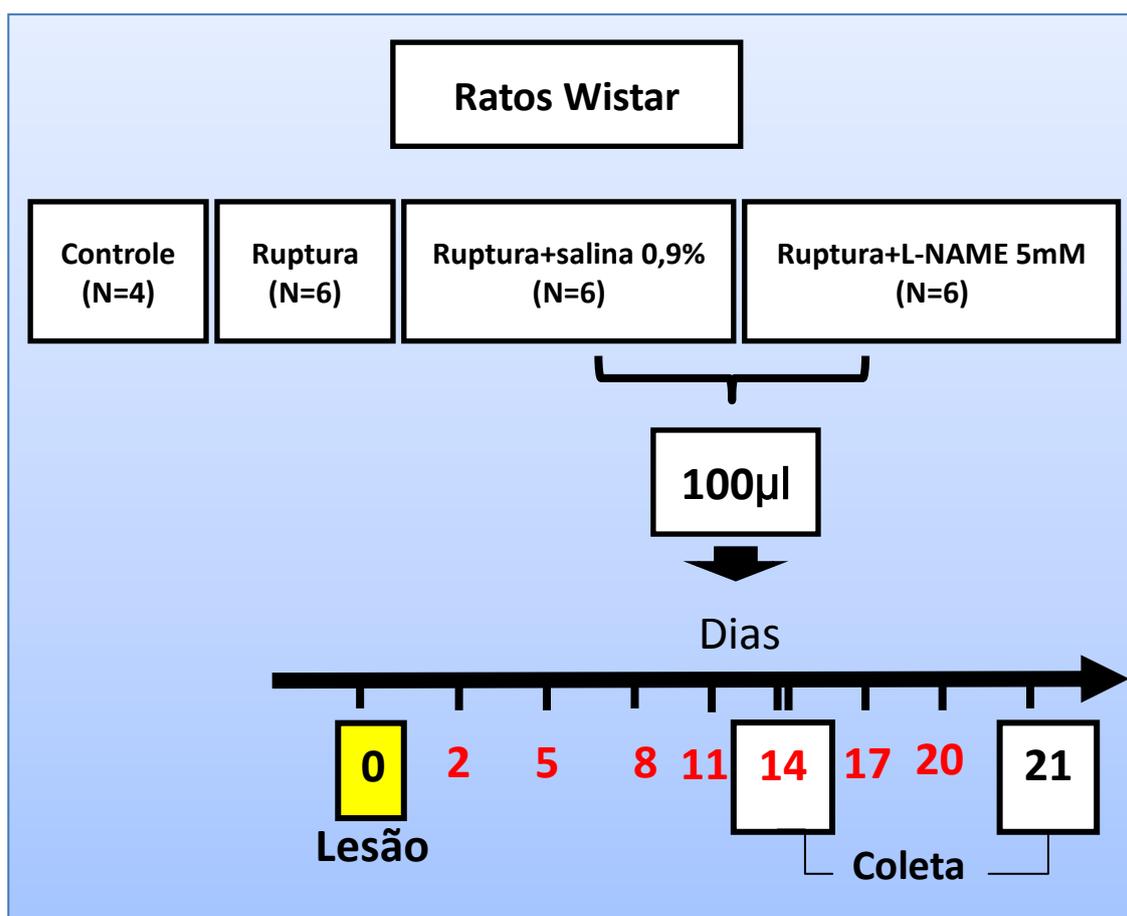


Figura 6: Representação esquemática do desenho experimental do trabalho. Os tratamentos foram realizados a partir do segundo dia após a injúria sendo administrados novamente a cada dois dias, destacados na cor vermelha ao longo da seta horizontal. No 14^a e 21^o dia os animais foram mortos e as amostras de tecido coletadas.

4.4 - DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL NO MÚSCULO SÓLEO

A quantificação de proteínas totais no músculo sóleo, de todos os grupos experimentais, foi obtida através do método descrito anteriormente por Bradford (1976). O corante Azul Brilhante de Coomassie presente no reativo de Bradford se liga a resíduos carregados positivamente em proteínas, resultando em um complexo que possui um máximo de absorvância diferente do corante livre. Para o preparo do reagente Bradford foi utilizado Coomassie Brilliant Blue G-250 0.1mg/ml dissolvido em 50 ml de etanol 95% e depois acidificado com ácido fosfórico 85%.

Em cada experimento, as amostras de músculo sóleo foram dissociadas mecanicamente em 2 ml de tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline* – PBS), e deste conteúdo 200 µl foram retirados e diluídos em 600 µl de água destilada e 200 µl de NaOH 1 N. Foi retirado 50 µl de amostra e adicionado a 2 ml do reativo. Ao final de 2 min de reação os conteúdos foram determinados por espectrofotometria em um comprimento de onda de 595 nm.

Os valores de proteína foram calculados a partir da equação da reta obtida por uma curva-padrão previamente estabelecida com diferentes concentrações de Albumina Bovina Sérica (BSA), corrigidos pelo peso úmido do músculo e expressos em porcentagem do controle.

4.5 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

4.5.1 – Processamento e corte das amostras

As amostras do músculo sóleo, após a rápida dissecação, foram imediatamente pesadas (massa úmida). Em seguida, as amostras foram incluídas em gel de imersão para criostato (Tissue Tek®, Sakura Finetek, Inc., Califórnia, USA), congeladas em nitrogênio líquido e estocadas à -20° para posterior análise, seguindo protocolo proposto por Józsa *et al.* (1985).

O material congelado foi seccionado com auxílio de um criostato (Micron, HM505E) com temperatura ajustada para -24°C. As secções de 20 µm

de espessura foram diretamente montadas em lâminas histológicas previamente gelatinizadas e conservadas em um freezer à -20°C para posterior coloração.

As criosecções foram realizadas com orientação transversal para visualização do diâmetro da fibra muscular e considerou-se somente a região muscular proximal ao tendão.

4.5.2 – Hematoxilina Eosina

A coloração das amostras foi realizada com hematoxilina-eosina (HE). Esta coloração permite a visualização da morfologia da fibra muscular e seus mionúcleos periféricos.

Para a realização da técnica as lâminas com as secções montadas foram retiradas do freezer e hidratadas por 5 minutos, sendo submersas em xilol por duas vezes, seguido de álcool nas concentrações de 100, 100, 95, 90, 80 e 70%. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada pelo mesmo tempo e submetidas à coloração por hematoxilina, sendo submersas 20 segundos por 3 vezes e novamente lavadas por 20 minutos. Imediatamente, foram imersas em eosina 2 vezes por 20 segundos cada, seguidas de lavagem por 20 minutos também em água destilada.

O próximo passo consistiu na desidratação das amostras seguindo uma bateria alcoólica crescente (70, 80, 90, 95, 100 e 100%) e novamente xilol por duas vezes consecutivas, por 3 minutos para cada imersão. Após a coloração, as lâminas foram montadas com glicerol 30% e lamínulas sobrepostas.

Um microscópio óptico (Nikon, Eclipse 50i) com câmera digital (Moticam 2500) acoplada foi utilizado para análise histológica e captura de imagens, as quais foram armazenadas para posterior análise semi-quantitativa e qualitativa.

4.5.3 – Análise morfológica quantitativa e qualitativa

Para avaliar as características morfológicas das fibras musculares (análise qualitativa) e a quantificação dos parâmetros selecionados, os cortes

devidamente corados como descrito acima foram analisados em microscópio óptico e posteriormente diversos campos representativos foram fotografados.

As imagens de todos os grupos experimentais foram capturadas em microscópio óptico com câmera acoplada e utilizado escala micrométrica calibrada no mesmo aumento. Utilizou-se nas contagens 6 lâminas com 5 secções, totalizando 200 fibras por animal e 4 animais para cada grupo experimental.

Para a avaliação do parâmetro da área da fibra muscular foi utilizado o programa de computação denominado *ImageJ*® versão *free* 1.44p. (RASBAND, 1997). O programa foi calibrado de acordo com uma escala micrométrica que realiza a conversão de *pixels* para μm^2 . A aferição da área se fez manualmente contornando os bordos da fibra com o próprio cursor do computador, que automaticamente determinou o resultado da mensuração em área, e estes foram expressos em porcentagem do controle.

Outro parâmetro avaliado foi a presença de núcleos centrais nas fibras musculares. Para tal, as fibras musculares de todos os grupos também foram quantificadas utilizando o programa de computação *ImageJ*® versão *free* 1.44p. (RASBAND, 1997), onde para cada secção de amostra muscular as fibras que exibiram a presença de lesões de núcleo central foram marcadas e quantificadas seguindo o protocolo descrito por VAN DYKE *et al.* (2012).

4.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por análise de variância um critério, seguido do pós-teste Bonferroni para comparação entre mais de dois grupo. O nível de significância estipulado foi de $p < 0,05$ (ANOVA, um critério, *posthoc* Bonferroni, $p < 0,05$). Os dados representam a média \pm desvio padrão da média sistematizados no programa BioEstat 5.0.

5- RESULTADOS

5.1 – MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM L-NAME.

A fim de avaliar se o efeito da inibição nitrérgica repercutiu no parâmetro sistêmico relacionado ao ganho de massa corporal, realizamos pesagens antes da lesão, 7, 14 e 21 dias após a injúria tendínea em todos os grupos experimentais.

Nossos resultados demonstram que o tratamento local com o L-NAME não interferiu de forma significativa no ganho de massa em nenhum dos tempos experimentais. Tal fato sugere que a inibição das isoformas da NOS ocorreu localmente ao tecido tendíneo, pois não causou interferência no parâmetro sistêmico relacionado ao ganho de peso dos animais, conforme ilustrado na Figura 7.

5.2 - MODELO DE TENOTOMIA ALTEROU O PESO ÚMIDO DO MÚSCULO.

Com o intuito de averiguar se o modelo de tenotomia provocou alteração na massa úmida muscular e considerar o efeito do tratamento com L-NAME no local da injúria, realizamos a pesagem dos músculos em todos os grupos experimentais logo após a dissecção nos dois tempos de sobrevida propostos.

A análise demonstrou que a massa úmida do músculo sóleo nos animais submetidos à tenotomia experimental reduziu de forma significativa quando comparado aos valores do grupo controle tanto em 14 dias ($0.073 \pm 0.010\text{g}$ ruptura vs $0.116 \pm 0.116\text{g}$ controle, $p < 0.05$), como também em 21 dias ($0.109 \pm 0.013\text{g}$ ruptura vs $0.142 \pm 0.008\text{g}$ controle, $p < 0.05$). Os dados também revelaram que o tratamento com L-NAME no local da ruptura tendínea não foi capaz de inibir a acentuada diminuição no peso úmido muscular após o procedimento cirúrgico experimental nem em 14 ($0.066 \pm 0.004\text{g}$ ruptura+L-NAME vs $0.073 \pm 0.010\text{g}$ ruptura, $p < 0.05$) e nem em 21 dias ($0.100 \pm 0.008\text{g}$ ruptura+L-NAME vs $0.109 \pm 0.013\text{g}$ ruptura, $p < 0.05$), como demonstrado na figura 8.

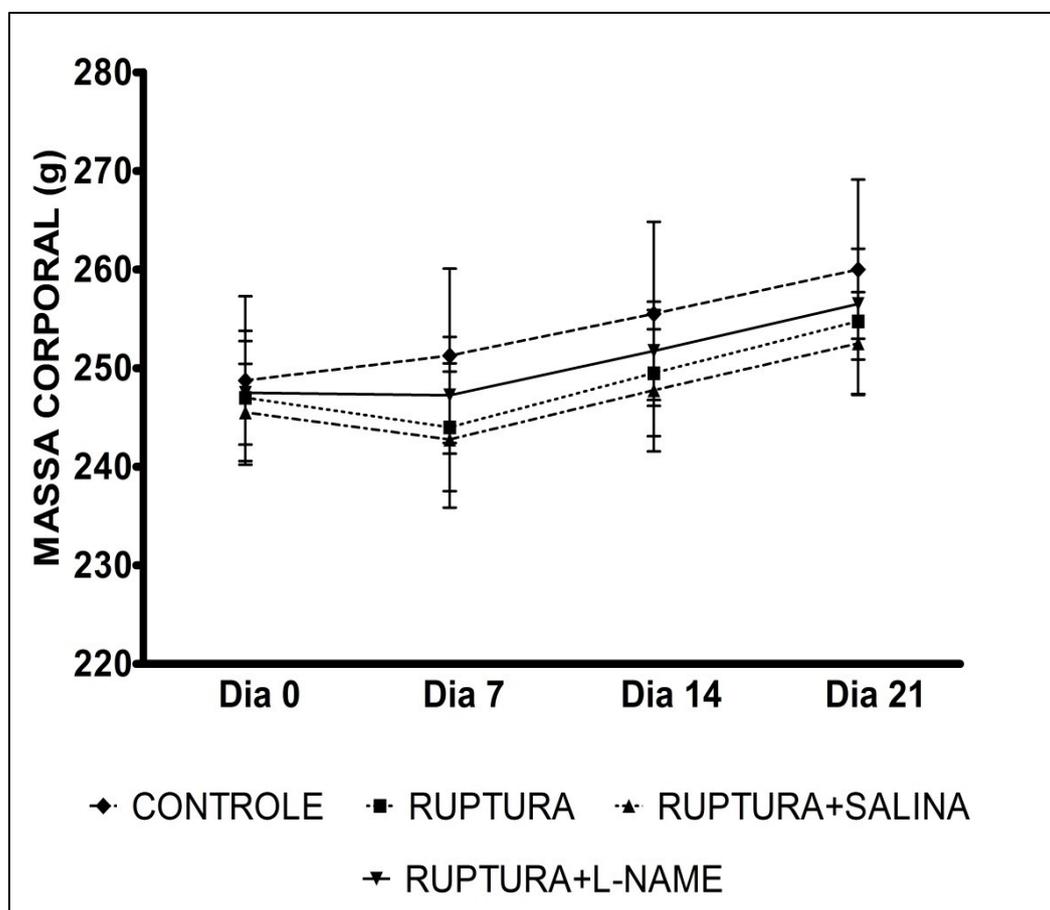


Figura 7: Massa corporal 14 dias e 21 dias após o procedimento cirúrgico. A pesagem foi realizada no grupo controle e nos demais grupos no dia da cirurgia e semanalmente para avaliar o efeito do tratamento local, sob a aquisição de massa corporal em ratos submetidos ou não à tenotomia. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$. (ANOVA-Bonferroni sem significância entre os dias para cada grupo).

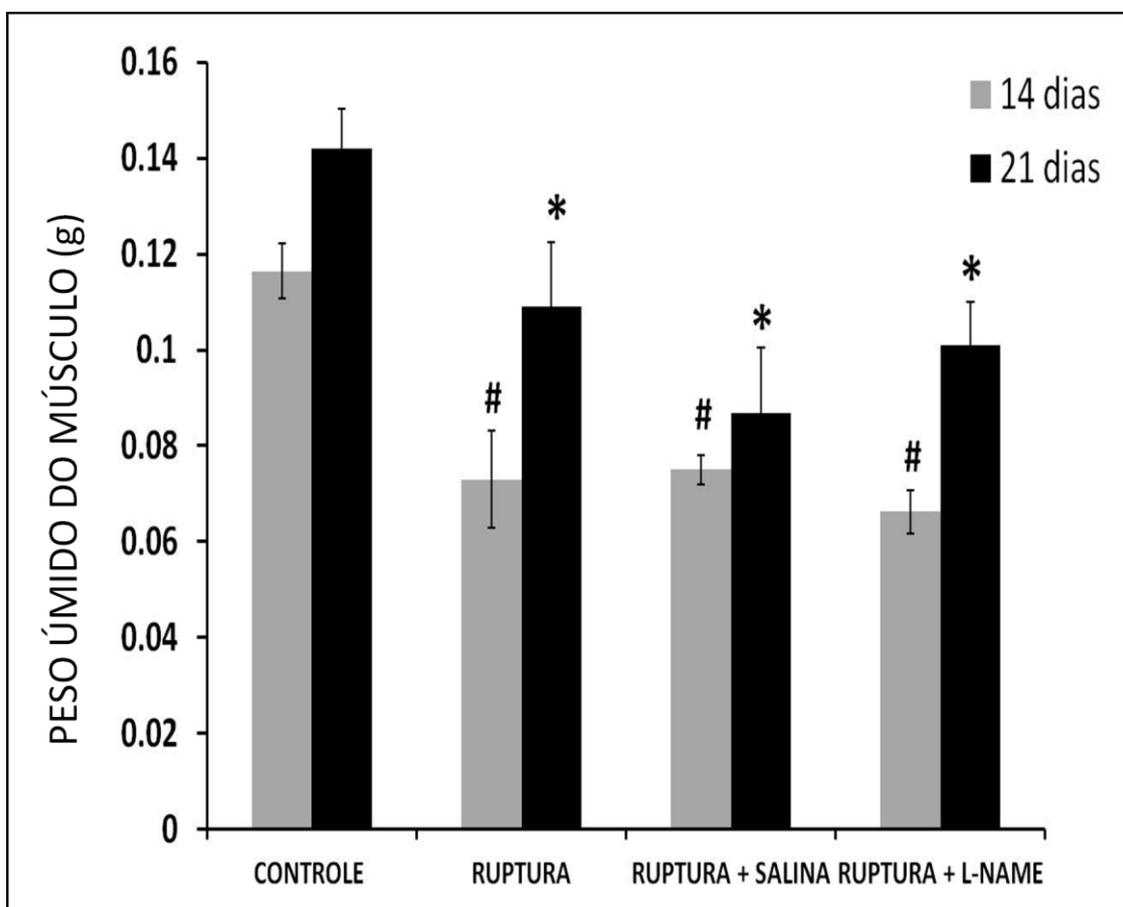


Figura 8: Diminuição do peso úmido muscular. Avaliou-se o efeito da ruptura tendínea e ruptura tendínea associada à inibição nitrérgica local no tendão sob o peso úmido do músculo sóleo em ratos submetidos à tenotomia após 14 e 21 dias. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$. (ANOVA-Bonferroni, (#) $p < 0.05$ vs CONT 14 dias e (*) $p < 0.05$ vs CONT 21 dias).

5.3 – O USO DE L-NAME ALTEROU O NÍVEL DE PROTEÍNA TOTAL NO MÚSCULO SÓLEO DOS ANIMAIS.

Com a finalidade de avaliar se o modelo gerou diminuição nos níveis de proteína devido ao desequilíbrio entre as taxas de síntese e degradação proteica, realizamos a quantificação de proteínas totais no músculo sóleo dos animais de todos os grupos experimentais respeitando o protocolo descrito anteriormente.

Nossos resultados confirmaram que houve diminuição de aproximadamente 55% e 30% nos níveis de proteínas totais nos músculos dos animais submetidos à lesão tendínea em comparação ao grupo controle, em 14 e 21 dias respectivamente, conforme ilustrado na figura 9. Tal resultado sugere que o modelo experimental é adequado para induzir atrofia muscular.

A análise também demonstrou que o tratamento com inibidor da síntese do óxido nítrico não gerou mudanças nos níveis diminuídos de proteínas totais no músculo do grupo ruptura+L-NAME após 14 dias ($39.3 \pm 24.3\%$ ruptura+L-NAME vs $54 \pm 11.8\%$ ruptura, $p < 0.05$) do procedimento cirúrgico. Entretanto, decorridos 21 dias de tratamento com o inibidor da síntese de óxido nítrico o grupo submetido à tenotomia demonstrou aumento dos níveis de proteínas totais presentes no músculo apresentando diferença estatística significativa quando comparado ao grupo ruptura e ruptura+salina ($108.3 \pm 21\%$ ruptura+L-NAME vs $69 \pm 23\%$ ruptura, $p < 0.05$), alcançando os níveis do controle (Figura 9).

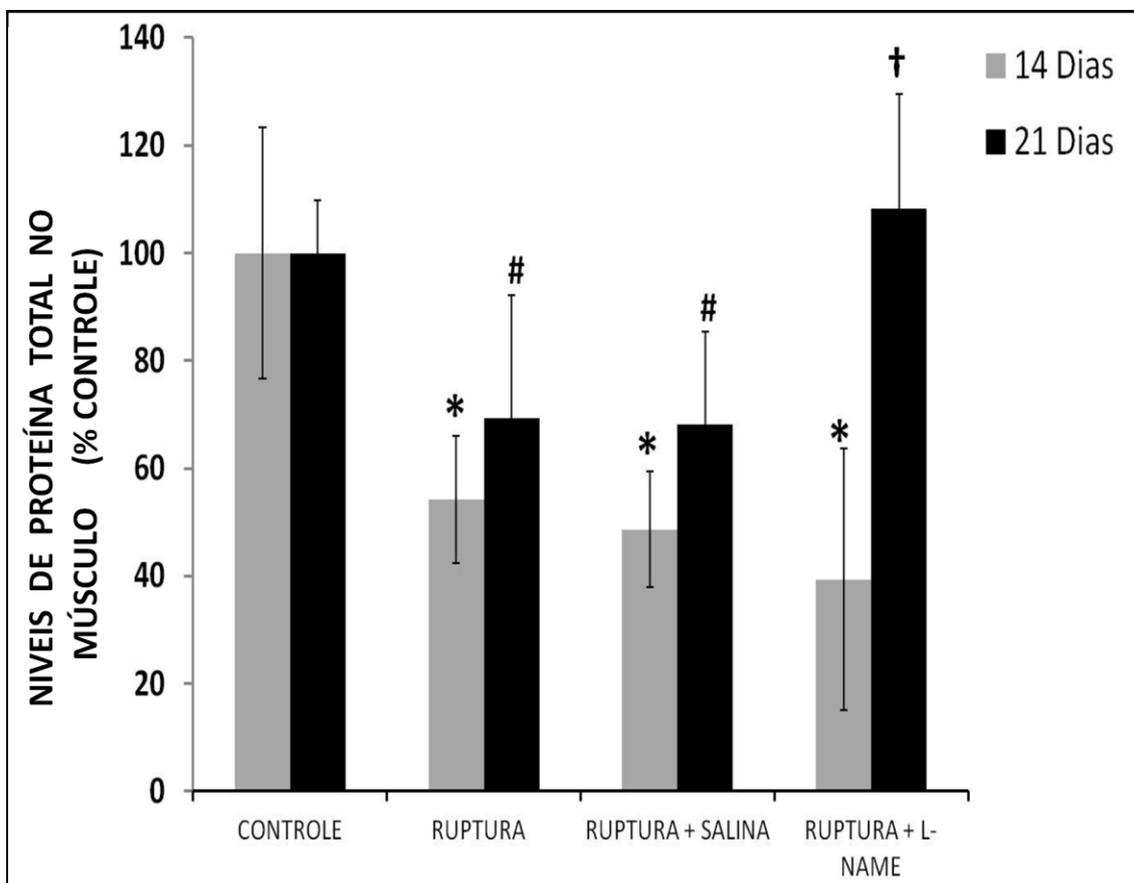


Figura 9: Níveis de proteína total no músculo. As amostras musculares foram obtidas nos diferentes grupos em 14 ou 21 dias, após a tenotomia. Os valores dos níveis de proteína são apresentados em porcentagem do controle e foram corrigidos pelo peso do músculo (g), sendo expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$ (ANOVA- Bonferroni, (*) $p < 0,05$ quando comparado ao controle em 14 dias (#) $p < 0,05$ em comparação ao controle em 21 dias e (†) $p < 0.05$ em comparação aos grupos ruptura e ruptura+salina em 21 dias).

5.4 - TRATAMENTO COM L-NAME REDUZIU O APARECIMENTO DE LESÕES DE NÚCLEO CENTRAL.

Objetivando caracterizar alterações histológicas nas fibras musculares decorrentes do modelo de tenotomia após 14 dias, utilizou-se a técnica de hematoxilina e eosina como recurso para identificar áreas de lesão central (*lesion central core*) nas fibras musculares. As secções transversais das fibras duas semanas após a cirurgia, coradas com hematoxilina e eosina, evidenciaram que diversas fibras apresentavam uma região central com coloração mais discreta e de forma variável, sugerindo continuidade na degeneração de miofibrilas. E uma zona periférica com coloração normal. Ao redor das fibras que apresentavam lesões de núcleo central encontravam-se fibras com aparência e forma normais.

Com base nessa análise observamos a notável presença de lesões de núcleo central nos grupos experimentais quando comparados ao controle (Figura 10A). O grupo submetido ao modelo de tenotomia (Figura 10B) demonstra diversas fibras musculares adjacentes com a presença de lesão central evidenciando importante alteração morfológica da estrutura da fibra. Situação similar é vista no grupo ruptura+salina como pode ser observado na figura 10C

Por outro lado, o grupo que foi tratado de forma contínua com o inibidor L-NAME no tendão demonstrou menor quantidade de fibras com a presença de tais lesões no mesmo período, caracterizando assim uma melhora histológica do tecido quando comparado ao grupo ruptura, conforme pode ser visualizado na figura 10D.

Devido á particularidade da técnica não foi possível identificar se as fibras morfológicamente alteradas correspondiam a fibras do tipo I ou fibras do tipo II.

A partir desta constatação de melhora morfológica da fibra muscular nos animais tratados com L-NAME objetivamos mensurar por meio de uma análise semiquantitativa a presença de lesões de núcleo central. No grupo ruptura, as lesões de núcleo central estavam presentes em aproximadamente 21% das 180 fibras musculares avaliadas e no grupo ruptura+salina em 19.6%. No

entanto, o grupo submetido ao tratamento com inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME) após 14 dias apresentou somente 12% de fibras com lesões de núcleo central, demonstrando significativa melhora com relação à morfologia das mesmas, conforme pode ser observado na figura 11.

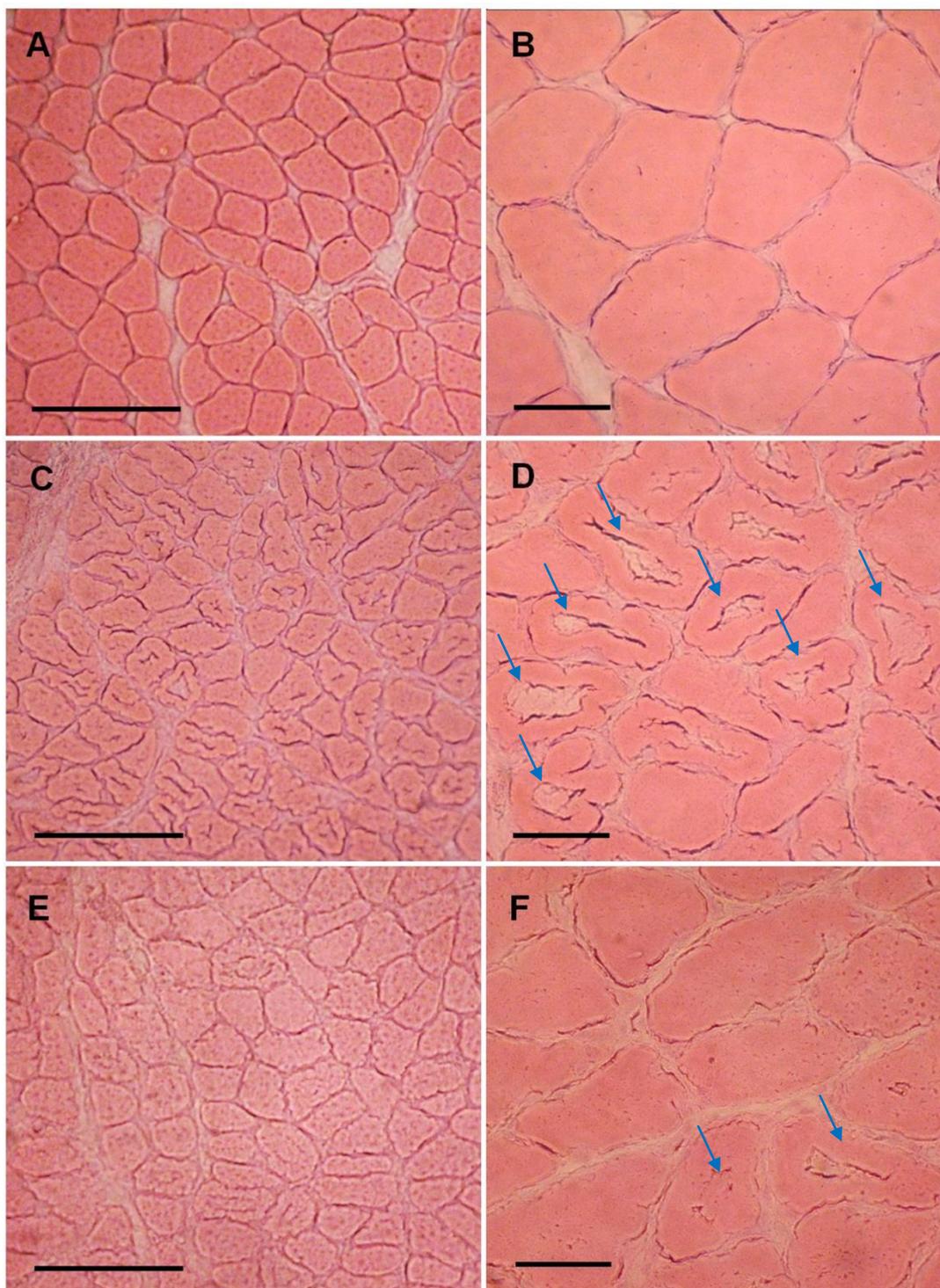


Figura 10: Caracterização histológica da presença de lesões de núcleo central. A análise histológica foi realizada em ratos controle (A e B), ruptura (C e D) e ruptura+L-NAME (figura E e F). As fibras musculares do grupo ruptura apresentaram evidentes alterações histológicas consistentes com lesões de núcleo central. Notar que o grupo ruptura=L-NAME também apresentou a presença de lesões de núcleo central, todavia em menor quantidade como pode ser observado nas figuras E e F. As setas indicam as lesões de núcleo central no interior da fibra muscular. Coloração por hematoxilina eosina. Em A, C e E, objetiva de 10x, barra da escala de 200 μ m. Em B, De F, objetiva de 40x, barra da escala 50 μ m, n=3.

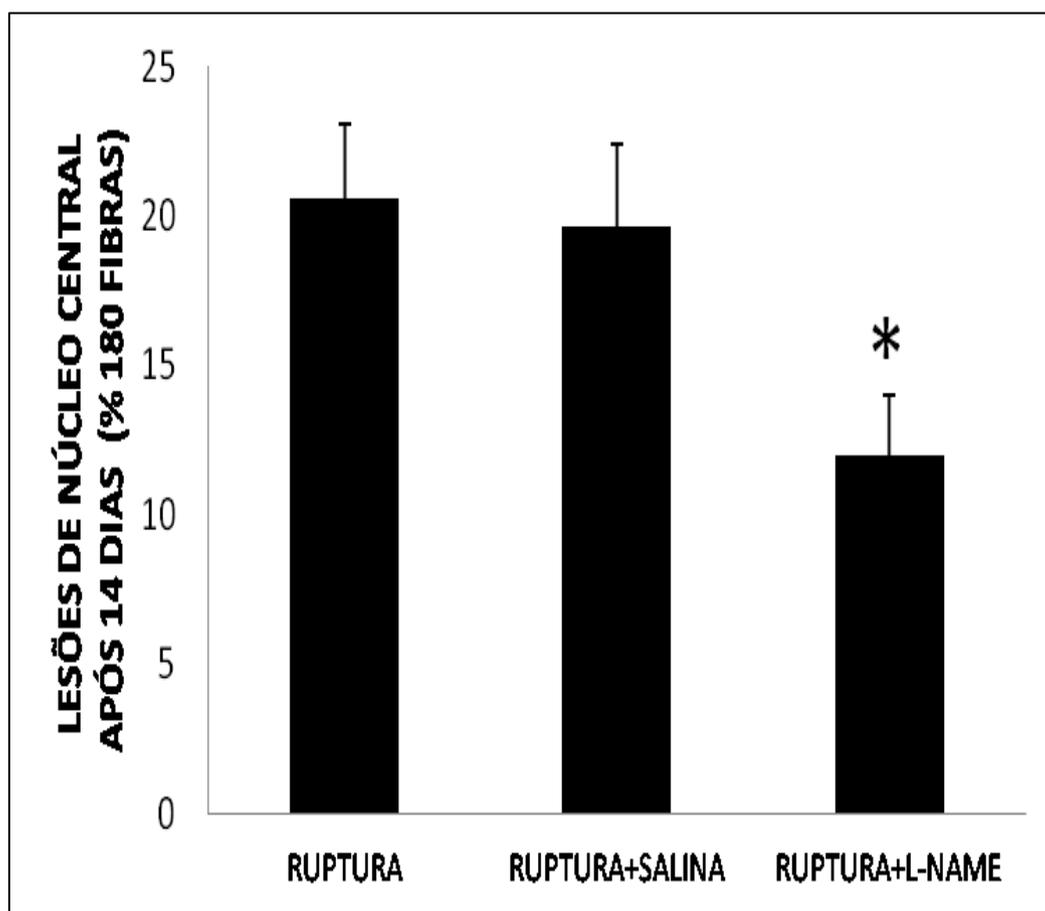


Figura 11: Quantificação de fibras apresentando lesões de núcleo central. Foi avaliado a presença de lesões de núcleo central em 180 fibras musculares dos grupos ruptura, salina e L-NAME de ratos cirurgicamente lesionados. Os grupos ruptura e ruptura+salina apresentaram 20% de fibras musculares com lesões de núcleo central. O grupo ruptura+L-NAME apresentou significativa redução de fibras com lesões de núcleo central, sendo aproximadamente 12%. Os valores são expressos em média \pm desvio padrão, $n=3$ (ANOVA-Bonferroni. (*) $p<0.05$ vs ruptura e ruptura+salina).

5.5 - INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO AUMENTOU A ÁREA DA FIBRA MUSCULAR.

Dando continuidade a análise morfológica, avaliou-se as fibras musculares dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico e tratados após 21 dias de tenotomia. Desta forma, observamos que os animais pertencentes ao grupo ruptura (Figura 12B) e ruptura+salina (Figura 12C) apresentaram discreta alteração na estrutura interna das fibras musculares quando comparados ao controle (Figura 12A). Tal fato pode ter sido ocasionado pela intensa presença de lesões de núcleo central no período de 14 dias. Considerando ainda os dois grupos, algumas fibras sugerem a discreta presença de lesões de núcleo central no período de 21 dias. No entanto, a morfologia de tais lesões não é clássica como foi observado no período de 14 dias. Mesmo assim, as fibras apresentam de forma geral coloração mais discreta e algumas fibras demonstram ainda a presença de um halo de degeneração de miofibrilas como pode ser observado pelas setas nas figuras 12B e 12C.

Por outro lado, o grupo ruptura+L-NAME (Figura 12D) apresentou melhor estrutura histológica quando comparado aos grupos ruptura e ruptura+salina, pois apresentou fibras musculares com morfologia mais íntegra, assemelhando-se as fibras do grupo controle.

Considerando os dados anteriores que demonstraram melhora nos níveis de proteínas em 21 dias no grupo dos animais tratados com L-NAME no local da injúria e sabendo que tal parâmetro tem intrínseca relação com a área da fibra, objetivamos mensurar por meio de uma análise semiquantitativa a área, já que esta é um indicador amplamente utilizado para caracterizar o processo atrófico.

Sendo assim, realizamos a mensuração da área da miofibra nos diferentes grupos experimentais. Essa análise foi realizada com o auxílio computacional do programa ImageJ® e constatou que o modelo de ruptura tendínea gerou diminuição significativa na área da miofibra quando comparado

ao controle ($56.3 \pm 1.2\%$ ruptura vs $100 \pm 5.4\%$ controle, $p < 0.05$) (Figura 13). Sendo essa diminuição visível durante a análise das amostras.

Por outro lado, um aumento na área ocorreu nos animais tratados com o L-NAME no local da injúria, conforme demonstrado na mesma figura. O grupo tratado com L-NAME apresentou aumento de 13% na área da fibra quando comparado ao grupo ruptura. No entanto, apesar do aumento da área promovido pelo tratamento com L-NAME, os valores continuaram estatisticamente diminuídos quando comparados ao controle ($69.3 \pm 1.6\%$ ruptura+L-NAME vs $100 \pm 5.4\%$ controle, $p < 0.05$), como pode ser observado na figura 13.

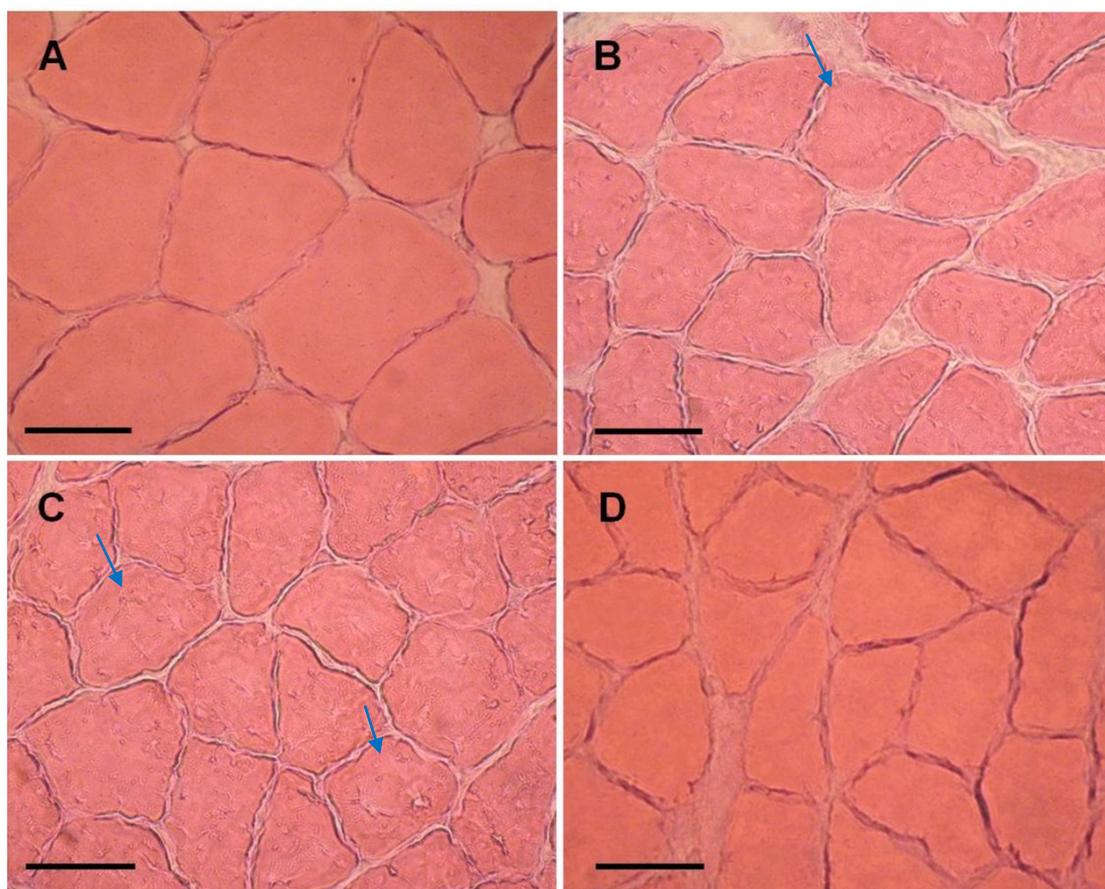


Figura 12: Morfologia da fibra muscular após 21 dias de lesão e tratamento local. A análise histológica foi realizada em animais submetidos a ruptura (B), tratados com salina (C) e L-NAME (D) em comparação ao controle (A). Os grupos ruptura e ruptura+salina apresentaram discretas alterações morfológicas no interior das fibras musculares possivelmente ocasionadas por lesões de núcleo central quando comparados ao controle. As setas indicam provavelmente a presença de lesões de núcleo central, porém não mais com morfologia clássica. O grupo ruptura+L-NAME apresentou melhor morfologia das fibras como pode ser observado na figura D se comparado ao grupo ruptura. Coloração por hematoxilina eosina. Objetiva de 40x, n= 3. Barra da escala, 200 μ m.

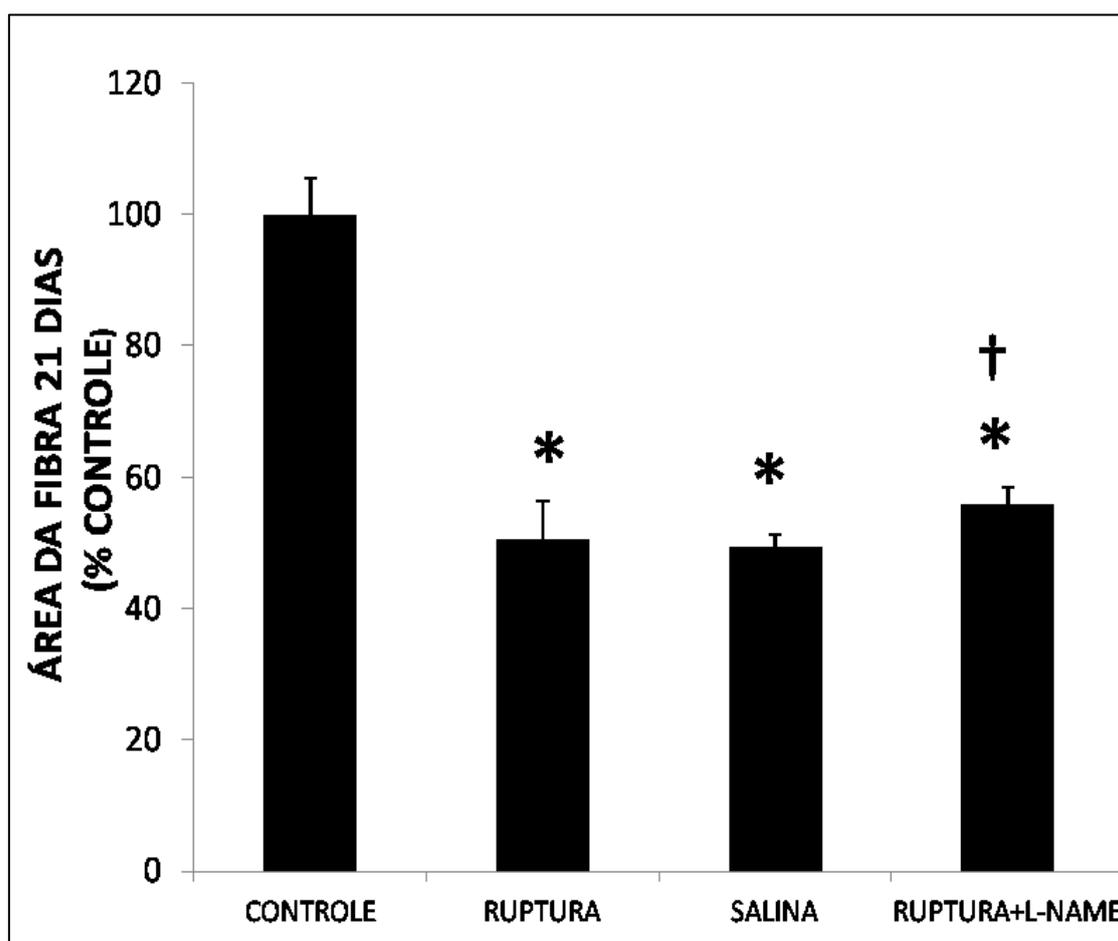


Figura 13: Quantificação da área da fibra muscular. As amostras musculares foram obtidas nos diferentes grupos em 21 dias após a tenotomia e em média 200 fibras por animal foram avaliadas. Os valores da área da fibra muscular são apresentados em porcentagem do controle e expressos em média \pm desvio padrão, $n=4$ (ANOVA- Bonferroni, (*) $p < 0,05$ quando comparado ao controle e (†) $p < 0,05$ em comparação aos grupos ruptura e ruptura+salina em 21 dias).

6 – DISCUSSÃO

A literatura reporta diversos estudos que identificaram os efeitos do alongamento passivo, ativo e estimulação elétrica como técnica para minimizar os efeitos deletérios da atrofia muscular após tenotomia (BARRY *et. al.*, 1994; ABRAMS *et. al.*, 2000; BAEWER *et. al.*, 2008; VAN DYKE; BAIN; RILEY, 2012), contudo este é o primeiro trabalho que propõem uma intervenção química no tendão lesionado objetivando avaliar a regeneração muscular associada ao processo.

De acordo com o que já foi relatado na parte introdutória dessa pesquisa, estudo prévio em nosso laboratório identificou que o uso do inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME) administrado de forma local na injúria tendínea antecipou os processos de reparo do tendão com reconhecida melhora funcional (MORAES, 2011). Considerando então que músculos e tendões encontram-se funcionalmente integrados e que prejuízos morfológicos e bioquímicos em uma das estruturas afeta ambas (ROBERTS, 2002; KJAER, 2004), surgiu o interesse em avaliar se tal benefício restrito ao tendão poderia estender-se ao músculo. No mais, o presente trabalho contribui para a melhor compreensão sobre a relação músculo-tendão durante o processo inerente à lesão tendínea e suas conseqüências para a fisiologia que regula a homeostasia do movimento.

Neste estudo, o modelo de ruptura tendínea com sutura imediata demonstrou ser eficaz para o desencadeamento da atrofia muscular, pois reproduziu, de forma similar, as alterações bioquímicas e morfológicas presentes nos modelos experimentais que se configuravam como somente ruptura (TOMANEK; COOPER, 1972, BARRY *et. al.*, 1994, SALEM *et. al.*, 2001), sutura imediata com imobilização (WAHLBY; DAHLBACK; SJOSTROM, 1978; MAXWELL; MOODY; ENWEMEKA, 1992) ou sutura com atraso (WAHLBY; DAHLBACK; SJOSTROM, 1978). Desta forma, nossos resultados sugerem que a inibição nitrérgica local no tendão, além de configurar-se como estratégia de intervenção complementar válida para o tratamento da atrofia muscular pode estender-se a diferentes modelos experimentais de tenotomia.

De fato, nossos resultados estão de acordo com trabalhos prévios descritos na literatura que verificaram diminuição da massa muscular, diminuição nos níveis de proteína, presença de lesões de núcleo central e redução da área da fibra muscular (TOMANEK; COOPER, 1972; WAHLBY; DAHLBACK; SJOSTROM, 1978; BAKER, 1985; JAKUBIEC-PUKA; CATANI; CARRARO, 1992; MAXWELL; MOODY; ENWEMEKA, 1992; JACKMANN; KANDARIAN, 2004).

Considerando o peso corporal dos animais, nossa análise demonstrou que o uso do L-NAME de forma restrita à lesão tendínea não alterou o padrão sistêmico relacionado ao ganho de massa muscular (MAXWELL; ENWEMEKA, 1992; MAXWELL; MOODY; ENWEMEKA, 1992; MORAES, 2011). Neste sentido, a inibição do sistema nitrérgico local pode se configurar como uma possível estratégia de terapia em acidentes que envolvam a lesão simulada no presente estudo.

É sabido que o óxido nítrico possui ação dual nos sistemas biológicos, pois além de seu efeito citotóxico quando em altas concentrações, é relatado também que em baixas concentrações, ele se mostra importante para manutenção da homeostasia (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA; HIGGS, 1995; MONCADA, 1999; VALLANCE, 2003). Portanto, de acordo com Moraes (2011), o modelo de inibição local da NOS é uma ferramenta valiosa, pois não influencia de forma negativa no parâmetro sistêmico relacionado ao ganho de peso corporal dos animais.

Recente estudo revelou que em modelo de diabetes, a infusão local do inibidor da NOS, por meio da artéria epigástrica, evitou o acentuado aumento da pressão sanguínea e problemas associados com a infusão sistêmica, que, por conseguinte podem ocasionar respostas compensatórias que comprometem os resultados (ROSS *et al.*, 2007).

Nossos resultados revelaram também, que a massa úmida muscular diminuiu de forma significativa em todos os grupos quando comparada ao controle nos dois tempos de sobrevida, sendo este dado condizente com os achados da literatura (JAKUBIEC-PUKA; CATANI; CARRARO, 1992; GIGER *et al.*, 2009). Contudo, o uso do L-NAME não apresentou reversão neste aspecto em nenhum dos tempos avaliados.

Contudo, na tentativa de compreender melhor essa questão e detalhar nossa análise, dosamos a quantidade de proteína muscular nos dois tempos de sobrevivência, pois a manutenção da capacidade funcional e a massa muscular provavelmente são controladas pelo balanço entre síntese e degradação proteica e existem diversos correlatos que indicam alterações do metabolismo proteico na atrofia muscular (MAXWELL; ENWEMEKA, 1992; JACKMAN; KANDARIAN, 2004; POWERS; SMUDER; CRISWELL, 2011)

Neste aspecto, nossos resultados demonstraram que houve perda de aproximadamente 55% e 30% nos níveis de proteínas totais nos músculos dos animais submetidos à lesão tendínea em comparação ao grupo controle, nos dias 14 e 21, respectivamente. Com relação a isto, a literatura reporta que o desbalanço protéico, o qual ocasiona redução dos níveis de proteína, provavelmente encontra-se associado mais com o aumento da proteólise do que com a diminuição da síntese proteica (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; BIALEK *et al.*, 2011; POWERS; SMUDER; CRISWELL, 2011).

Por outro lado, um significativo aumento no nível de proteína total no músculo foi constatado no grupo de animais tratados com L-NAME em 21 dias, igualando-se aos níveis do controle. Portanto, considerando a intrínseca relação músculo-tendão (KJAER, 2004) e estudo prévio do nosso laboratório (MORAES, 2011) esse achado sugere que a inibição da NOS no local da injúria não somente acelerou o processo de regeneração e organização do tecido tendíneo, como também repercutiu no aumento dos níveis proteicos no músculo. Portanto o dado descrito acima, nos permite inferir que houve atenuação da atrofia, já que demonstrou diminuição de um dos marcadores do processo atrófico.

De forma similar ao aumento dos níveis de proteína no músculo, a literatura reporta evidências recentes que indicam que o uso de L-NAME gerou aumento na síntese da proteína colágeno no tendão considerando o mesmo período de tempo (TOMIOSSO *et al.*, 2009). Tal situação pode ser explicada pelos achados que indicam que na presença de óxido nítrico a síntese de colágeno é inibida prejudicando assim a remodelagem do tecido (DOOLEY *et al.*, 2007).

Estudos revelam que a suplementação terapêutica em longo prazo com doador de NO em modelo experimental de Distrofia Muscular de Duchenne

(mdx), a qual tem como característica principal severa perda de massa muscular e progressão da atrofia, não ocasionou aumento na expressão de proteínas e agravou a fibrose muscular e cardíaca (WEHLING-HENRICKS *et al.*, 2010).

Adicionalmente, outro estudo aponta que os níveis de NO em modelo de desuso muscular encontravam-se elevados, culminando no desencadeamento de vias moleculares responsáveis pela atrofia e que após o uso de L-NAME a mesma apresentou atenuação (SUZUKI *et al.*, 2007).

Sendo assim, esses fatos somados aos nossos resultados demonstram indícios os quais sugerem que a inibição da síntese de NO seja na injúria tendínea ou em outros modelos de atrofia muscular experimental geram benefícios para atenuação do processo atrofico.

A partir dos dados supracitados, objetivamos investigar a modulação nitrérgica com relação à morfologia das fibras musculares em nosso modelo experimental. Desta forma, nossos dados demonstraram a presença de lesões de núcleo central nas fibras em 14 dias de injúria, demonstrando características morfológicas similares ao que é referido na literatura (BAKER, 1985; SALEM *et al.*, 2001; VAN DYKE; BAIN; RILEY, 2012).

Neste sentido, há relatos que sugerem que após a tenotomia ocorre aumento na atividade proteolítica dependente de cálcio que ocasiona degeneração da miofibrila e encontra-se implicada no surgimento da lesão de núcleo central (BAEWER *et al.*, 2008; VAN DYKE; BAIN; RILEY, 2012). Considerando então esse aumento na atividade proteolítica, fica clara a relação entre os níveis de proteína diminuídos e grande número de lesões de núcleo central no 14º dia, vistos em nossos resultados.

Por outro lado, o grupo tratado com L-NAME apresentou visível redução na quantidade de fibras com a presença de lesões de núcleo central. Portanto, partindo desta observação, quantificamos tais fibras e verificamos que o grupo tratado com L-NAME apresentou redução significativa de aproximadamente 40% de lesões de núcleo central quando comparado ao grupo ruptura evidenciando assim um padrão histológico melhor. Neste contexto, a literatura aponta efeitos benéficos do alongamento para reduzir o aparecimento de lesões de núcleo central (RILEY; VAN DYKE, 2012; VAN DYKE; BAIN; RILEY,

2012). Dados semelhantes também foram observados com injeções diárias de dantrolene, inibidor do canal de liberação de cálcio do receptor de *rianodina*, que demonstraram diminuição na formação de tais lesões (BAEWER *et al.*, 2008). Portanto, de posse de nossos dados, podemos sugerir que assim como o alongamento e o uso de fármacos, a inibição nitrérgica proposta por esse estudo também pode ser considerada como forte aliado na diminuição de lesões de núcleo central e consequente melhora do padrão histológico da fibra muscular.

Autores apontam que após tenotomia o número de sarcômeros em série diminui ocasionado pelo encurtamento da fibra e que existe uma relação evidente entre este mecanismo e a formação dos núcleos centrais (BAKER; HALL-CRAGGS, 1980; JAMALI, *et al.*, 2000; VAN DYKE; BAIN; RILEY, 2012).

Tais alterações morfológicas apresentam intrínseca relação com déficit funcional muscular, pois a literatura indica que na atrofia decorrente de doença muscular a NOSI pode ser deslocada do sarcolema para o citoplasma e esse processo, conseqüentemente, é capaz de desencadear um aumento na produção de NO pelo tecido ocasionando importante perda de força muscular (LI *et al.*, 2011).

Dando continuidade a análise dos nossos dados morfológicos, objetivamos avaliar a morfologia das fibras musculares de todos os grupos submetidos ao procedimento cirúrgico experimental no decorrer de 21 dias. Sob microscopia de luz, as fibras dos animais do grupo ruptura e ruptura+salina apresentavam-se com discretas alterações morfológicas. Vale ressaltar que não foram encontradas áreas de lesões de núcleo central nas fibras avaliadas. Entretanto a morfologia alterada provavelmente é decorrente da presença abundante destas em 14 dias, conforme já relatado. Na avaliação do grupo tratado com inibidor da síntese de óxido nítrico observamos melhora histológica, demonstrando fibras que sugerem aparência normal em comparação ao grupo controle.

Tal situação acima citada era esperada, pois consideramos a análise de nossos resultados anteriores que indicaram melhor nível de proteínas totais nos músculos no mesmo período e a menor quantificação de lesões de núcleo central em 14 dias.

De fato, nossos resultados apontam inter-relação entre os mesmos, pois evidenciam que na ausência de lesões de núcleo central obtivemos melhora nos níveis de proteína total e conseqüentemente este fato gerou melhor padrão histológico. Portanto, de forma complementar a estes dados, objetivamos quantificar a área da fibra muscular no período de 21 dias para adicionalmente complementar a confiabilidade de nossos resultados.

Ao verificarmos a área da fibra em 21 dias, notamos importante diminuição nos grupos experimentais não tratados com o inibido da NOS. O declínio na área é uma importante consequência da atrofia e possui relação com a degradação proteica e perda de massa muscular (MAXWELL; ENWEMEKA, 1992; MAXWELL; MOODY; ENWEMEKA, 1992; SALEM *et al.*, 2001), justificando o interesse em avaliá-la.

Por fim, nossos dados demonstram que o tratamento local com L-NAME promoveu melhora histológica significativa, e melhora quantitativa principalmente no 21º dia. Resultados similares foram obtidos com o estiramento (VAN DYKE; BAIN; RILEY, 2012) e uso de estimulação elétrica (BAKER, 1985; BAEWER *et al.*, 2008).

Acreditamos que essa atenuação da atrofia no 21º dia, como observado na área da fibra muscular e nos outros parâmetros já citados, pode ocorrer considerando a hipótese de Moraes (2011), que utilizando o mesmo modelo de intervenção, evidenciou melhora do processo cicatricial do tendão, a partir da redução do NO e seus produtos, evitando assim nitrosilação do colágeno e de proteínas envolvidas na estabilidade e remodelagem tecidual.

Desta forma, evidenciamos com a presente pesquisa que a inibição da síntese de óxido nítrico no tendão, acelerou o processo de regeneração do músculo sóleo, sugerindo que este efeito foi ocasionado pela estreita relação entre as estruturas e concomitante melhora no reparo tendíneo.

A aceleração da regeneração muscular por meio da inibição nitrérgica local no tendão além de ser importante para melhor compreensão da unidade músculo-tendínea sob um evento patológico é de grande valia para futuras pesquisas terapêuticas no âmbito da recuperação tecidual de músculos acometidos pelo processo atrófico gerado pela tenotomia.

7 - CONCLUSÃO

- O tratamento com L-NAME no local da injúria não alterou o ganho de peso dos animais.
- A atrofia muscular desencadeada por ruptura tendínea com sutura imediata do tendão calcâneo utilizada nesta pesquisa reproduziu as alterações morfológicas musculares descritas na literatura.
- Os níveis de proteína que forma diminuídos como consequência da atrofia muscular sofreram reversão quando foi utilizado o inibidor da síntese de óxido nítrico.
- A redução da atividade nitrérgica local no tendão acelerou a regeneração muscular com base na melhora morfológica das fibras musculares.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, R.A.; TSAI, A.M.; WATSON, B.; JAMALI, A.; LIEBER, R.L. Skeletal muscle recovery after tenotomy and 7-day delayed muscle length restoration. **Muscle Nerve**, 23: 707-714, 2000.

ANDERSON, J. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. **The Journal of Experimental Biology**, 209 p. 2276-2292, 2006.

BAEWER, D.V.; HOFFMAN, M.; ROMATOWSKI, J.G.; BAIN, J.L.W.; FITTS, R.H.; RILEY, D.A. Passive stretch inhibits central corelike lesion formation in the soleus muscles of hindlimb-suspended unloaded rats. **Journal of Applied Physiology**. 97, p.930-934, 2004.

BAEWER, D; VAN DYKE, J.M; BAIN, J.L.W; RILEY, D.A. Stretch reduces central core lesions and calcium build-up in tenotomized soleus. **Muscle Nerve**, 38, p. 1563–1571, 2008.

BAKER, J.H. The development of central cores in both fiber types in tenotomized muscle. **Muscle Nerve**, 85: 115-119, 1985.

BAKER, J.H, HALL-CRAGGS E. Changes in sarcomere length following tenotomy in the rat. **Muscle Nerve**, 3, p. 413–416, 1980.

BARRY, J.A.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E.; PATTULLO, M.C. The effect of immobilization on the recovery of rabbit soleus muscle from tenotomy: modulation by chronic electrical stimulation. **Experimental Physiology**, 79, p.515-525, 1994.

BIALEK, P.; MORRIS, C.; PARKINGTON, J.; ANDRE, M.S.; OWENS, J.; YAWORSKY, P; SEEHERMAN, H; JELINSKY, S.A. Distinct protein degradation

profiles are induced by different disuse models of skeletal muscle atrophy. **Physiological Genomics**, 43,p. 1075–1086, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, p. 248–254, 1976.

CHARGÉ,S. B; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Review**, 84 (1), 2004.

CLARK, K.A.; MCELHINNY,A.S; BECKERLE,M.C.; GREGORIO,C.C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual Review Cell and Developmental Biology**, v.18, 2002.

CLEGG, P.D.; STRASSBURG, S.; SMITH, R.K. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. **International Journal of Experimental Pathology**, 88: 227–235, 2007.

DESAKI, J; OKI, S; MATSUDA, Y; SAKANAKA, M. Morphological changes of capillaries in the rat soleus muscle following experimental tenotomy. **Journal of Electron Microscopy**, 49(1), p.185-193, 2000.

DOOLEY, A; GAO, B; SHI-WEN, X; ABRAHAM, D. J; BLACK, C.M; JACOBS, M; BRUCKDORFER, K.R. Effect of nitric oxide and peroxynitrite on type I collagen synthesis in normal and scleroderma dermal fibroblasts. **Free Radicals Biology Medicine**, 43: 253-264, 2007.

FINNI, T. Structural and functional features of human muscle-tendon unit. **Scandinavian Journal of Medicine Science Sports**, 16 (3), p. 147-58, 2006.

GIGER, J.M; BODELL, P.W; ZENG, M; BALDWIN, K.M; HADDAD, F. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. **Journal of Applied Physiology**, 107, p.1204-1212, 2009.

GIORDANO, V; PALLOTTINO, A.B; ALMEIDA, R.N. Estudo Experimental Comparativo De Duas Técnicas De Sutura Para Reparo Do Tendão De Aquiles: Análises Bioquímica, Histológica e Mecânica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, n. 10, p. 590-600, out. 2004.

GREFTE, S; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M.; TORENSMA, R. Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem Cells and Development**, 16: 857–868, 2007.

HUIJING, P. Muscular force transmission necessitates a multilevel integrative approach to the analysis of functional of skeletal muscle. **Exercise Sport Sciences Review**, 31 (4), p. 167–175, 2003.

JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **American Journal Physiology - Cell Physiology**, 287, p. 834 – 843, 2004.

JAKUBIEC-PUKA, A; CATANI, C; CARRARO, U. Myosin heavy-chain composition in striated muscle after tenotomy. **Biochemical Journal**, 282, p. 237-242, 1992.

JAMALI, A.A.; SHAR, P. A.F.; ABRAMS, R.A.; LIEBER, R.L. Skeletal muscle response to tenotomy. **Muscle Nerve**, 23, p. 851–862, 2000.

JAMES, R; KESTURU, G; BALIAN, G; CHHABRA, B. Tendon: biology, biomechanics, repairs, growth factors and evolving treatment options. **Journal of Hand Surgery**, 33A, p. 102-112, 2008.

JÄRVINEN, T.A.; JÄRVINEN, T.L.; KÄÄRIÄINEN, M. Muscle Injuries: Biology and Treatment. **The American Journal Sports Medicine**, 33 (5): 745-64, May. 2005.

JÄRVINEN, T.A.; JÓZSA, L.; KANNUS, P. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An

immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, 23 (3): 245-54, 2002.

JÓZSA, L; BÁLLINT, B.L; VÁNDOR, E; RÉFFY, A; DEMEL, Z. Recapillarization of tenotomized skeletal muscles after delayed tendon suture. I. Experimental study. **Research in Experimental Medicine (Berlin)**, 185 (2): 163-8, 1985.

JÓZSA, L; KANNUS, P; THORING, J. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscle. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 72-B, n. 2, Março, 1990.

JÓZSA, L; THÖRING, J; JARVINEN, M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. **Experimental and Molecular Pathology**, 49 (2):267-278, 1988.

KADER, D; SAXENA, A; MOVIN, T; MAFFULLI, N. Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. **British Journal Sports Medicine**, 36, p. 239 -24, 2002.

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

LECKER, S.H.; JAGOE, T; GILBERT, M.G; BARACO, V; BAILEY, J; PRICE, R; MITCH, W.E; GOLDBERG, A.L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **The FASEB Journal**, 18, p. 39–51, 2004.

LI, D; YUE,Y; LAI,Y; HAKIM, C.H; DUAN, D. Nitrosative stress elicited by nNOS μ delocalization inhibits muscle force in dystrophin-null mice. **The Journal of Pathology**, 223: 88–98, 2011.

LIN, J; WANG, M; WEI, A; ZHU, W; MURRELL, GA. The cell specific temporal expression of nitric oxide synthase isoforms during achilles tendon healing. **Inflammation Research**, 50(10): 515-522, 2001.

MAXWELL, L .C; ENWEMEKA, C.S. Immobilization-induced muscle atrophy is not reversed by lengthening the muscle. **The Anatomical Record**. 234, p. 55-61, 1992.

MAXWELL, L .C; MOODY, M.R; ENWEMEKA, C.S. Muscle atrophy continues after early cast removal following tendon repair. **The Anatomical Record**. 233, p. 376-386, 1992.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **Journal of the Royal Society Medicine**, 92: 164-169, 1999

MONCADA, S; HIGGS, E.A. Molecular mechanics and therapeutic strategies related to nitric oxide. **The FASEB Journal**, 9, p. 1319-1330, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, 43 (2), 1991.

MORAES, S.A.S. Inibição nitrérgica local favorece o processo de regeneração do tendão de aquiles em ratos submetidos a tenotomia. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

MURRELL, G.A.C. Oxygen free radicals and tendon healing. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, 16 (5 Suppl): 208S-14S, 2007.

PETTE, D; STARON, R.S. Myosin Isoform, Muscle Fiber Types and Transitions. **Microscopy Research and Technique**, 50: 500-509, 2000.

PETTE, D. Historical Perspectives: Plasticity of mammalian skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 90, p. 1119-1124, 2001.

POWERS, S.K; SMUDER, A. J; CRISWELL, D.S. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. **Antioxidants & Redox Signaling**, 15 (9), p, 2519 -2528, 2011.

POWERS, S.K.; TALBERTL, E.E.; ADHIHETTY, P. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, 2, 2010.

PURSLOW, P.P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part A 133, p.947-966, 2002.

RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997.

RILEY, G. Tendinopathy – from basic science to treatment. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, 4 (2): 82-89, 2008

RILEY, D.A.; VAN DYKE, J.M. The effects of active and passive stretching on muscle length. **Physical Medicine and Rehabilitation clinics of North American**, 23 (1), 51-57, 2012.

ROBERTS, T.J. The integrated function of muscles and tendons during locomotion. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 133, p.1087–1099, 2002.

ROSS, M.R; WADLEY, G.D; CLARK, M.G; RATTIGAN,S; MCCONELL, G.K. Local nitric oxide synthase inhibition reduces skeletal muscle glucose uptake but not capillary blood flow during in situ muscle contraction in rats. **Diabetes**, 56, 2007

SALEM, E.A.A.; FUJIMAKI, N.; ISHIKAWA, H.; TASHIRO, T.; KOMIYA, Y. Morphological changes and recovery process in the tenotomized soleus muscle of the rat. **Archives of Histology and Cytology**, 64 (2), p.127-137, 2001.

SCHIAFFINO, S; REGGIANI, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**, 91, p. 1447-1531, 2011.

SCOTT, W; STEVENS, J; BINDER-MACLEOD, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physiological Therapy**, 81, p.1810-1816, 2001.

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

SUZUKI, N; MOTOHASHI, N; UEZUMI, A; FUKADA, S; YOSHIMURA, T; ITOYAMA, Y; AOKI, M; SUZUKI, Y. M; TAKEDA, S. NO production results in suspended-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. **Journal Clinical Investigation**, 117, p. 2468 – 2476, 2007.

TAKALA, T. E; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, 10(6):321–5, 2000.

TAJSHARGHI, H. Thick and Thin Filament Gene Mutations in Striated Muscle Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 9, p.1259-1275, 2008.

TEDESCO, F.S; DELLAVALLE, A; DIAZ-MANERA, J; MESSINA, G; COSSU, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. **Journal Clinical Investigation**, 120 (1):11–19, 2010.

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

TOMANEK, R. J; COOPER, R.R. Ultrastructural changes in tenotomized fast and slow-twitch muscle fibers. **Journal Anatomy**, 113 (3), p.409-424, 1972.

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

VALLANCE, P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. **Fundamental Clinical Pharmacology**, 17: 1-10, 2003.

VAN DYKE, J.M; BAIN, J.L. W; RILEY, D.A. Preserving sarcomere number after tenotomy requires stretch and contraction. **Muscle Nerve**, 45 (3): 367 -75, 2012.

WAHLBY, L. Achilles tendon Injury. 4. Structure of rabbit calf muscles after tendon repair with removable traction suture. **Acta Chirurgica Scandinavica**, 147,p. 37-41, 1981.

WAHLBY, L; DAHLBACK, L; SJOSTROM, M. Achilles tendon injury. II. Structure of tenotomized rabbit crural muscles after primary and delayed tendon suture. **Acta Chirurgica Scandinavica**, 144:359-369, 1978.

WEHLING-HENRICKS, M; JORDAN, M.C; GOTOH, T; GRODY, W.W; ROOS, K.P; TIDBALL, J.G. Arginine metabolism by macrophages promotes cardiac and muscle fibrosis in mdx muscular dystrophy. **PLoS One**, 5 (5), 2010.

WESTERBLAD, H; BRUTON, J.D; KATZ, A. Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. **Experimental Cell Research**, 316 (18), 2010.

WOZNIAK, A.C; KONG, J; BOCK, E; PILIPOWICZ, O; ANDERSON, J. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch and potential alternate pathways. **Muscle Nerve**, 31, p. 283–300, 2005.

WRÓBLEWSKI, R; EDSTRON, M.L.Changes in elemental composition of single muscle fibers following tenotomy of the rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, 6, p. 490–496, 1983.

XU, Y; MURRELL, GAC. The basic science of tendinopathy. **Clinical Orthopaedics Related Research**, 466: 1528–1538, 2008

ZAMMIT, P.S.; PARTRIDGE, T.A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, 54, n.1. 2006.