

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



TATIANA CARLA TOMIOSSO

**ESTUDO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO TENDÃO
CALCANEAR APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL, COM E
SEM INIBIDOR DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Tatiana Carla Tomiosso
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Campinas, 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

T595e

Tomiosso, Tatiana Carla

Estudo da matriz extracelular do tendão calcâneo após transecção parcial com e sem inibidor de óxido nítrico sintetase / Tatiana Carla Tomiosso. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Edson Rosa Pimentel.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tendão calcâneo. 2. Óxido nítrico. 3. L-NAME. 4. Colágeno. I. Pimentel, Edson Rosa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Study of the calcaneal tendon extracellular matrix after partial section with and without L-NAME.

Palavras-chave em inglês: Calcaneal tendon; Nitric oxide; L-NAME; Collagen.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Edson Rosa Pimentel, Sebastião Roberto Taboga, Rejane Maira Góes, Amílcar Sabino Damazo, Cibele Marli Cação Paiva Golvêa.

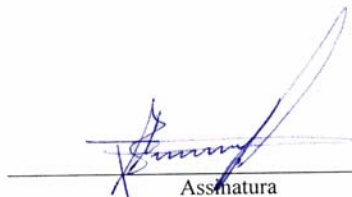
Data da defesa: 29/05/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 29 de maio de 2008.

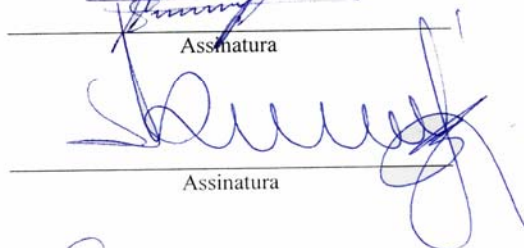
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)



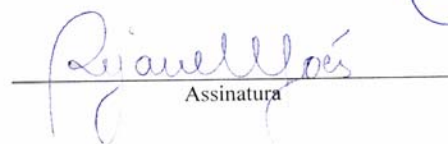
Assinatura

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



Assinatura

Profa. Dra. Rejane Maira Góes



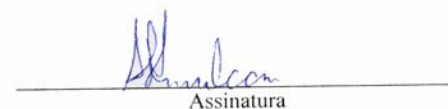
Assinatura

Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa



Assinatura

Prof. Dr. Amílcar Sabino Damazo



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marreto Esquisatto

Assinatura

*“Não existe passagem que o mar não encontre
se nisso puser toda sua força..”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

A Deus

Guarda-me, ó Deus, porque é em voz que procuro refúgio;
Digo a Deus: “Sois o meu Senhor;
Fora de vós não há felicidade para mim.”
Quão admirável tornou Deus o meu afeto
Para com os santos que estão em sua terra.
Numerosos são os sofrimentos que suportam
Aqueles que se entregam a estranhos deuses.
Não hei de oferecer suas libações de sangue
E meus lábios jamais pronunciarão o nome de seus ídolos.
Senhor, vós sois a minha parte de herança e meu cálice.
Vós tendes nas mãos o meu destino.
O cordel mediu para mim um lote aprazível,
Muito me agrada a minha herança.
Bendigo o senhor porque me deu conselho,
Porque mesmo de noite o coração me exorta.
Ponho sempre o senhor diante dos olhos;
Pois que Ele está a minha direita, não vacilarei.
Por isso meu coração se alegra e minha alma exulta,
Até meu corpo descansará seguro.
Porque vós não abandonareis minha alma na habitação dos mortos,
Nem permitireis que vosso santo conheça a corrupção.
Vós me ensinareis o caminho da vida,
Há abundância de alegria, junto de vós,
E delícias eternas, à vossa direita. (Salmo 15)

*Obrigada Senhor, obrigada Jesus, e também a todos os anjos, santos de
minha devoção e mensageiros de luz que guardam meus caminhos, por todos os
momentos de minha vida, bons ou ruins. Fiquem comigo, por todo o tempo.*

A Maria, minha mãe

Saudação à Virgem Maria (S. Francisco de Assis)

Salve, ó Senhora Santa, Rainha Santíssima,
 Mãe de Deus, ó Maria, que sois Virgem feita Igreja,
 eleita pelo Santíssimo Pai celestial,
 que vós consagrou por seu Santíssimo e
 dilecto Filho e o Espírito Santo Paráclito.

Em vós residiu e reside toda plenitude da graça e todo o bem.

Salve, ó palácio do Senhor!

Salve, ó tabernáculo do Senhor!

Salve, ó morada do Senhor!

Salve, ó manto do Senhor!

Salve, ó serva do Senhor!

Salve, ó mãe do Senhor!

E salve vós todas, ó santas virtudes derramadas,
 pela graça e iluminação do Espírito Santo,
 nos corações dos fiéis, transformando-os de infiéis
 em fiéis servos de Deus!

Amém.

*Nossa Senhora Aparecida, Nossa Senhora Desatadora dos Nós e Maria
 Passa na Frente, roguem por mim. Mãe do Belo Amor não me solte jamais.*

Dedicatória

Mãe, Juninho, Ray, Analice e vó (família querida):

“Eu tenho tanto
Pra lhe falar
Mas com palavras
Não sei dizer
Como é grande
O meu amor
Por você...

E não há nada
Prá comparar
Para poder
Lhe explicar
Como é grande
O meu amor
Por você...

Nem mesmo o céu
Nem as estrelas
Nem mesmo o mar
E o infinito
Nada é maior
Que o meu amor
Nem mais bonito...

Me desespero
A procurar
Alguma forma
De lhe falar
Como é grande
O meu amor
Por você...

Nunca se esqueça
Nem um segundo
Que eu tenho o amor
Maior do mundo
Como é grande
O meu amor
Por você...

Mas como é grande
O meu amor
Por você!...”

Amo todos vocês, mas como poderia não amá-los se são parte de mim...

In memorium

Pai e Nega, os anos passam, mas a saudade continua imensa. “Quando as pessoas que amamos são tiradas de nós a única maneira de mantê-las vivas é não deixarmos de amá-las, pois o amor de verdade é para sempre...”

“É tão estranho, os bons morrem
jovens
Assim parece ser quando me lembro
de você
Que acabou indo embora, cedo
demais

Quando eu lhe dizia: - me apaixono
todo dia
E é sempre a pessoa errada
Você sorriu e disse: - eu gosto de
você também
Só que você foi embora cedo demais
Eu continuo aqui, meu trabalho e
meus amigos
E me lembro de você em dias assim
dia de chuva, dia de sol
E o que sinto eu não sei dizer

- Vai com os anjos, vai em paz
Era assim todo dia de tarde, a
descoberta da amizade
Até a próxima vez, é tão estranho
Os bons morrem antes
Me lembro de você e de tanta gente
Que se foi cedo demais

E cedo demais eu aprendi a ter tudo
que sempre quis
Só não aprendi a perder
E eu, que tive um começo feliz
Do resto eu não sei dizer

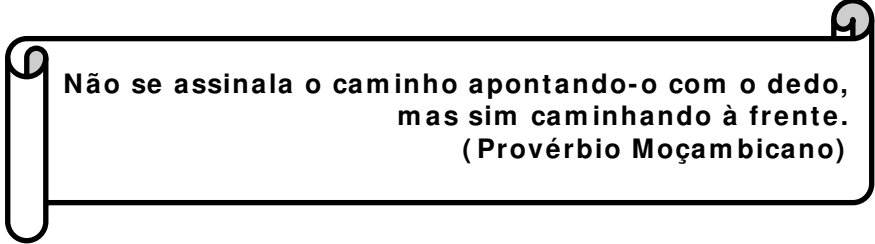
Lembro das tardes que passamos
juntos
Não é sempre, mas eu sei
Que você está bem agora

Só que este ano o verão acabou
Cedo demais”.

O amor é para sempre...

Agradecimento Especial

É meu querido professor Edson, ao fim de mais uma jornada só tenho a agradecer sua orientação, paciência (e olha que às vezes sou chata demais), confiança, respeito, carinho, elogios, críticas e principalmente palavras incentivadoras. Em todo este tempo de convivência se tornou um amigo, não só no laboratório, mas também em vários eventos sociais e culturais os quais participamos. Teremos muitas histórias pra contar durante nossas longas vidas, felizmente. Vencemos mais uma etapa.



**Não se assinala o caminho apontando-o com o dedo,
mas sim caminhando à frente.
(Provérbio Moçambicano)**

Agradecimentos

À Prof.a. Dra. Laurecir Gomes pelos ensinamentos, pelas sugestões durante a execução do trabalho, pelo incentivo, pelas críticas, pelo carinho. Sei que divergimos em algumas situações, mas isto faz parte do crescimento.

À Prof.a. Dra. Heidi, por toda a ajuda, por permitir a utilização do seu laboratório, pelos conselhos, por todos os momentos bons em que convivemos, principalmente fora do expediente. O quintal do Neto que o diga.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop por ter-se tornado meu colaborador durante o doutorado e por permitir tão prontamente o uso de seu laboratório.

Aos professores Dr. Sebastião Roberto Taboga, Dra. Cibele e Dr. Amílcar S. Damazo, pela análise prévia da tese, pelas sugestões e disponibilidade em participar da banca examinadora. Pela disponibilidade também agradeço aos professores Dra. Rejane Maira Góes, Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira, Dr. Humberto Santo Neto e Dr. Marcelo Augusto Marreto Esquisatto.

À Prof.a. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, Dr. Humberto Santo Neto e Dra. Luciana Bolsoni Lourenço que compuseram a banca do exame de qualificação, pelas palavras incentivadoras, críticas e sugestões. Também ao Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira e principalmente ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira que muito me ajudaram na confecção do projeto de qualificação.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallat esta, pela amizade durante todo este tempo que permaneci no laboratório, pelo apoio fundamental na realização dos experimentos

e também, por que não?, das nossas conversas sobre os mais variados assuntos, pode acreditar que tudo ajudou em muito no meu enriquecimento como pessoa.

Ao amigo de pós-graduação Amauri Pierucci, por ter me ensinado a como operar o t endão e sut urar a cirurgia.

Ao Laboratório de Matriz Extracelular, chefiado pelo Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, pela disponibilidade em permitir o uso de seus equipamentos.

A todos docentes, técnicos e colegas do departamento de Biologia Celular, pela convivência pacífica e edificante. Também aos docentes dos departamentos de Histologia e Anatomia, pela oportunidade de formação e utilização de equipamentos.

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado.

À secretária do programa de pós-graduação, Lílian Panagio, pela competência, auxílio, amizade, caf ezinhos e bat e-papos nos intervalos, principalmente sobre as cenas do dia anterior da novela das oito.

Aos secretários do departamento de BC, Mario e Bia, por todo o auxílio.

Aos caríssimos Professores Dr. Sebastião Roberto Taboga e Dra. Rejane Maira Góes, pelo exemplo, pelo incentivo e amizade. Não há dúvidas que são importantes na minha formação.

Aos amigos de Bebedouro, André, Mariângela, Bárbara e Adejaine. Amigos de longa data e sempre presentes.

Às queridas amigas Daniele, Kelly e Aline, que conheço desde o início da graduação e que já partilharam de muitos momentos da minha vida, que se felizes ou não, estão sempre por perto do meu coração auxiliando-me na longa jornada. *“Amigo? Aí foi isso que eu entendi? Ah, não; amigo para mim é diferente. Não é um ajuste de um dar serviço ao outro, e receber, e saírem por este mundo, barganhando ajudas, ainda que sendo com o fazer a injustiça aos demais. Amigo, para mim, é só isto: é a pessoa com quem a gente gosta de conversar, do igual ao igual, desarmado. O de que um tira prazer de estar próximo. Só isto, quase, e os todos sacrifícios. Ou – amigo- é que a gente seja, mas sem precisar de saber o porquê é que é.”* (Grande Sertão: Veredas).

A todos os amigos da graduação em Rio Preto, a minha ex-república Casa da Creusa, as ex-vizinhas Paty, Vivi e Tati.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica de Matriz Extracelular, as que já passaram, Fernanda, Josete e Lúcia, e os presentes Andrea e Adriano, por todo apoio e torcida, no fim tudo vai dar certo...

Aos amigos de pós-graduação, amigos de todas as horas, almoços e jantares, ceia de Natal, feijoada e até vaca atolada, festa junina, aniversários, festa brega, bares como o do Quintal do Neto, bate papo, viagens, cinemas (e viva o kinoplex no shopping D. Pedro na quarta-feira, pois o ingresso vale meia entrada), mas como a vida não é só festa, há também os desabafos, as reclamações, as tristezas: Juliana, Sheila (e André), Taíze, Fernanda (já estou contando nossas histórias, assim como conto as de Rio Preto), Flávia, Alberto, Wilson, Fabrícia, Kazinha, Alexandre Xaropinho (e Andréa), Adriano, Andréa, Justulim, Marcos, Pedro (Cíntia e Daniel), Gustavo, Manuel. *“O amigo, no ser humano, é aquela parte que é para você e que abre uma porta que talvez ele nunca abra para outra pessoa. E o seu amigo é verdadeiro e tudo o que ele*

diz é verdade, e ele ama você mesmo que o odeie em alguma outra casa do seu coração.” (Cidadela)

Aos demais amigos do departamento, Klélia e família, Aninha, Giseli, Marco Esqui, Danilo, Liliam, Sílvia, Eliane, Renata e Rafaela (anatomia), que se não partilharam de todos os momentos da minha estada aqui, participaram da maioria deles. Valeu.

Às companheiras de república atual: Taize, Ju, Valéria (junto com o Júnio tb - o namorado da república), e às que já passaram: querida Paty, Fê, Flavuska, Lucinha, Elusa e Elaine.

Às pessoas da minha família, aquelas que torceram por mim, é claro.

A todos que passaram pela minha vida até o presente momento. Se me fizeram chorar ou sorrir, em muito contribuíram para eu me tornar o que sou. *“Non, Je Ne Regrette Rien; Non, rien de rien; Non, je ne regrette rien; Ni le bien qu'on m'a fait - Ni le mal, tout ça m'est égal”*

Enfim a mim, que também sou filha de Deus, e como disse o famigerado poeta:

“Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena.”

ÍNDICE

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	6
1. Características do tendão.....	6
2. Lesão de tendão.....	9
3. Óxido Nítrico.....	12
OBJETIVOS.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
RESULTADOS:.....	27
Artigo 1 : Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with l-name.....	28
Artigo 2: Análise morfológica e bioquímica de tendão calcâneo de ratos após transecção parcial, com e sem inibidor de óxido nítrico sintetase.....	49
CONCLUSÕES.....	78

RESUMO

Os tendões são estruturas que transmitem a força muscular ao osso. São formados por células imersas em uma matriz extracelular rica em fibras de colágeno paralelas. Tendões, como o calcâneo, são resistentes, contudo podem ser acometidos por lesões. Esse tecido lesado não se regenera totalmente e a organização, estrutura e propriedades mecânicas do tendão reparado são inferiores ao tendão saudável. Além disso, há formação de adesão entre o tendão e o tecido conjuntivo adjacente, o que constitui um problema clínico. Tem sido reportado que o óxido nítrico (NO) tem influência na regeneração do tecido e que a inibição da síntese de NO poderia estar diretamente relacionada a uma não recuperação do tecido lesado. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo analisar o dano estrutural e o acúmulo de células inflamatórias após a injúria em tendão calcâneo de ratos adultos não tratados e tratados com o inibidor da óxido nítrico sintetase (NOS), L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina metil éster). Para tanto, os animais tiveram seus tendões parcialmente seccionados. Os animais tratados com L-NAME receberam a droga na água de beber quatro dias antes da secção e isto se manteve durante todo o período experimental. Os tendões de animais não tratados e tratados com L-NAME foram removidos aos 7, 14 e 21 dias pós-injúria, e processados para rotina em parafina (Histosec). Foram realizados cortes longitudinais de 7 µm de espessura, corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Azul de Toluidina (AT) e Xilidina Ponceau (XP) e analisados em microscopia de luz comum e de polarização. Analisando o material não tratado com L-NAME, foi observada grande quantidade de fibroblastos, hemácias e células inflamatórias, principalmente macrófagos e mastócitos nos tendões de 7 dias pós-injúria, com diminuição progressiva para 14 e 21 dias. Com relação às fibras de colágeno, observou-se o início da reorganização das fibras em 14 dias após a lesão. Em 21 dias o grau de reorganização das fibras é maior, embora se mostre inferior se comparado a um tendão normal. Em contraste, os tendões dos animais tratados com L-NAME, em todos os três tempos, mostraram-se mais acentuadamente infiltrados por células inflamatórias. Em 21 dias pós-injúria essas células inflamatórias persistem, a matriz ainda mostra-se desorganizada e há formação de adesão entre o tendão e o tecido conjuntivo adjacente. Para as análises bioquímicas, os tendões foram divididos em regiões de compressão, de secção e de tensão. A análise em SDS-PAGE dos tendões seccionados e

normal mostrou uma maior quantidade de colágeno neste, e uma presença marcante de proteínas com Mr entre 14 e 67 kDa nos tendões seccionados de 7 e 14 dias pós-injúria de animais não tratados com L-NAME. O tendão de 21 dias pós-injúria apresenta um padrão de bandas eletroforéticas muito similar ao normal. Nos animais tratados, todos os três tempos apresentaram presença marcante daquelas proteínas. A dosagem de proteínas e quantificação de hidroxiprolina mostrou uma maior quantidade desses componentes nos animais tratados com L-NAME. Entretanto, foi observada uma maior concentração de glicosaminoglicanos (GAGs) nos animais não tratados. Com relação ao tipo de GAG presente nos tendões seccionados foi possível identificar a presença de dermatan sulfato. Os tendões também foram submetidos ao ensaio mecânico sobre tração a fim de avaliar suas propriedades biomecânicas. Durante este ensaio foi constatado que os tendões dos animais tratados com L-NAME são menos resistentes à ruptura. Nossos resultados mostram que o reparo do tendão é complexo e que a presença de NO é fundamental para a recuperação do tecido, visto que nos tendões de animais tratados com L-NAME, o tecido mostrou uma inflamação persistente.

ABSTRACT

The tendons are structures capable of transmitting force from the muscle to bone. They are formed by cells immersed into an extracellular matrix (ECM) rich in collagen fibres. Tendons, as the calcaneal tendons, are capable of supporting high tension force, may also undergo damage. The damaged tissue does not regenerate completely, and the organization, structure and mechanical properties of a repaired tendon are usually inferior to the healthy tendon. Adhesion between the tendon and the adjacent connective tissue occurs, resulting in a clinical problem. Nitric oxide (NO) influences tissue regeneration, and this inhibition may be correlated to a non-recuperation of the injured tissue. The aim of this work was to analyze the structural damage and the presence of inflammatory cells after the injury of rats' calcaneal tendons non-treated and treated with L-NAME (N ω -nitro-L-arginine methyl ester), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. The animals had their tendons partially transected. In the NO synthase inhibition experiments animals received L-NAME in their drinking water, *ad libitum*, for four days prior to surgical lesion of the calcaneal tendon and throughout the post-operative experimental period. The tendons non-treated and treated L-NAME animals were removed at 7, 14 and 21 days post-injury, and processed for paraffin inclusion (Histosec). Longitudinal sections with 7 μ m were stained with Hematoxylin-Eosin (HE), Toluidine Blue (TB) and Xylidine Ponceau (XP). The non-treated tendons exhibited large amount of fibroblasts, blood cells and inflammatory cells as macrophages and mast cells, mainly in 7 days post-injury, with progressive decrease at 14 and 21 days. The reorganization of collagen fibers was observed since the 14 days after injury. At day 21 the organization of the collagen fibers, was higher compared to 14 days, but lesser than in the normal tendon. The tendons of L-NAME treated rats, in all periods, exhibited great infiltration of inflammatory cells. In 21 days post-injury of L-NAME treated rats, these inflammatory cells were still present, the ECM disorganization was observed and also adhesion between the tendon and adjacent connective tissue. For biochemical analysis, the tendons were divided in compression, section and tension regions. SDS-PAGE analysis of transected and normal tendons, showed a more expressive presence of collagen in normal rats and a remarkable presence of proteins with Mr between 14 and 67 kDa in transected tendons of non-treated animals at 7 and 14 days post-injury. The rats,

at 21 days post-injury, exhibited protein profile similar to the normal tendon. In L-NAME treated animals, in all tree-points, it was found a significant amount of these proteins. The analysis of protein and hydroxyproline content showed a larger amount of both components larger than in treated animals. On the other hand, a larger concentration of glycosaminoglycans (GAGs) was observed in non-treated animals. The analysis of GAGs in agarose gel showed a prominent presence of dermatan-sulfate in the section region of both non-treated and treated animals. The biomechanical tests indicated that the L-NAME treated tendons were less resistant to rupture than the non-treated tendons. Our results revealed that the repair in tendons is a complex process and that NO is essential for the healing and complete recovering of the tissue, as in tendon of L-NAME treated animals, the tissue exhibited a persistent inflammatory process.

INTRODUÇÃO

1. Características do tendão

Os tendões são estruturas capazes de transmitir ao osso a força de tensão gerada pela contração muscular. Apresentam variações na forma e no tamanho podendo ser cilíndricos ou achatados (VOGEL & KOOB, 1989; CRIBB & SCOTT, 1995).

O tendão calcâneo (também chamado tendão de Aquiles) é o maior, e mais resistente tendão do corpo humano, e é responsável pela fixação dos músculos gastrocnêmio e sóleo no osso calcâneo. Estima-se que as forças que atuam nesse tendão podem ser até 10 vezes maiores do que o peso corporal durante uma corrida. Estas cargas frequentes e repetidas impostas ao tendão o predispõem para lesões causadas por uso excessivo (SMITH *et al.*, 2002), e tanto atletas profissionais como os de fim de semana podem sofrer uma lesão de esforço e inflamação neste tendão.

Morfologicamente o tendão é um tecido conjuntivo denso modelado, fibroso, composto essencialmente por fibras altamente ordenadas em feixes. Este tecido exibe uma hierarquia estrutural e pode ser subdividido em fascículos, fibras, fibrilas e microfibrilas (LIN *et al.*, 2004). Cerca de 90 a 95% do seu componente celular são compostos de fibroblastos e fibrócitos. Os fibroblastos com numerosas organelas citoplasmáticas refletem sua alta atividade metabólica, característica típica de células que estão sintetizando grandes quantidades de componentes da matriz extracelular (MEC). Com o decorrer da idade os fibroblastos tornam-se alongados e se transformam em fibrócitos quiescentes, contudo estas células mantêm a capacidade de síntese, que pode ser reativada durante processos de reparo após uma lesão do tendão (HAYEM, 2001; ESQUISATTO *et al.*, 2003; SHARMA & MAFFULLI, 2006). O restante do componente celular é formado por condrócitos na região

de inserção, células sinoviais e células vasculares. Os fibroblastos sintetizam colágeno, proteoglicanos e proteínas não-colagênicas, que são os componentes da MEC, e juntamente com os fibrócitos localizam-se entre a MEC depositada por eles.

A MEC dos tendões é composta principalmente por moléculas de colágeno do tipo I, que representam cerca de 80 a 90% do peso seco do tecido e estão arrançadas em fibras e feixes de fibras, dispostas longitudinalmente ao maior eixo do tendão (VIDAL, 1970; VIDAL & CARVALHO, 1990; LIN *et al.*, 2004). Este tipo de colágeno é o maior responsável pela estabilidade estrutural e mecânica atribuída a esse tecido (EZURA *et al.*, 2000). Junto ao colágeno tipo I, também podem ser encontrados o colágeno tipo II na região de compressão dos tendões (BERENSON *et al.*, 1996), o tipo III, que está relacionado ao controle do diâmetro fibrilar e compõe fibrilas heterotípicas com os colágenos tipos I e V, o tipo VI que é encontrado na parte mediana e na entese do tendão calcâneo (WAGGETT *et al.*, 1998), além dos tipos XII e XIV que participam na regulação do crescimento e associação fibrilar (YOUNG *et al.*, 2000).

Os proteoglicanos (PGs), outro componente da MEC dos tendões, são constituídos por um esqueleto protéico central ao qual estão ligados uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Devido à variabilidade da proteína e das diferentes classes de GAGs, estas moléculas desempenham diversas funções nos tecidos conjuntivos (IOZZO e MURDOCH, 1996). Os GAGs são cadeias polissacarídicas não ramificadas, compostas de unidades repetidas de dissacarídeo. O colágeno fibrilar e os proteoglicanos estão associados formando as fibrilas. O colágeno tipo VI e as glicoproteínas podem interagir com o colágeno na matriz interfibrilar (van der REST & GARRONE, 1991). Esses componentes possuem o papel de estabilizar as fibras de colágeno e mediar interações com outros

componentes da matriz, a fim de assegurar o desenvolvimento e a maturação tecidual (BIRK & LINSENMAYER, 1994).

Os pequenos proteoglicanos estão envolvidos com a montagem das fibras e fibrilas colagênicas, podendo tanto influenciar na organização destas por alteração do padrão nas quais se formam, quanto no tamanho final da fibra de colágeno (KUC & SCOTT, 1997). Os proteoglicanos representam menos de 1% do peso seco nos tecidos fibrosos. Os grandes proteoglicanos são representados principalmente pelo agregam e o versicam e são uma pequena parcela do total de proteoglicanos presentes nos tendões (EVANKO & VOGEL, 1990). Nos pequenos proteoglicanos destaca-se o decorim, biglicam e o fibromodulim.

Na MEC de tendões, além de colágeno e proteoglicanos, também estão presentes as glicoproteínas não colagênicas (PNC) e diversas outras pequenas moléculas. Entre aquelas, destacam-se glicoproteínas adesivas como a fibronectina e a trombospondina, que participam em processos de reparo e regeneração de tendão (JOZSA *et al.*, 1991).

A quantidade, distribuição e organização destes componentes da MEC podem variar ao longo do tendão, dependendo dos tipos de forças mecânicas que estejam atuando em cada região do tendão, como já observado em tendões de bovinos (VOGEL *et al.*, 1986; EVANKO & VOGEL, 1990), coelhos (GILLARD *et al.*, 1979; MERRILEES & FLINT, 1980), anfíbios (CARVALHO & VIDAL, 1994; CARVALHO & FELISBINO, 1999), ratos (COVIZI *et al.*, 2001), porcos (FEITOSA *et al.*, 2002 a,b) e frangos (BENEVIDES *et al.*, 2004). De acordo com a organização, quantidade e propriedades dessas macromoléculas na MEC são possíveis obter uma diversidade de formas adaptadas às necessidades de cada tipo de tendão (CHIQUET, 1999).

As propriedades biomecânicas dos tendões estão relacionadas com a orientação das fibras e feixes de fibras de colágeno, com o diâmetro dessas fibras, bem como ao seu grau de organização e ordem molecular (VILARTA & VIDAL, 1989). Sendo assim, as fibras são os elementos responsáveis pela resistência de um tendão, e a eficiência deste mecanismo depende do direcionamento paralelo destes elementos com a direção das forças à que estão sujeitas (HUKINS & ASPDEN, 1985).

2. Lesão de tendão

Em humanos muitas das rupturas espontâneas de tendões ocorrem na extremidade inferior. A razão entre a ruptura traumática e a ruptura espontânea é de 1:3 a 1:4 na extremidade inferior e 4:1 a 6:1 na extremidade superior (JÓZSA & KANNUS, 1997). De todos os tendões o tendão calcâneo é um dos mais resistentes que se conhece, apesar disto, vários trabalhos descrevem a ruptura completa do tendão calcâneo como a mais freqüente dentre os tendões (KANNUS & JÓZSA, 1991; LESIC & BUMBASIREVIC, 2004). Como nas rupturas totais, a ruptura parcial do tendão é vista com mais freqüência no tendão calcâneo. Não há estatísticas seguras, mas a incidência da ruptura parcial é similar à ruptura total. Ruptura parcial do tendão calcâneo ocorre predominantemente em homens jovens e de meia-idade em atividades atléticas extenuantes (KÄLEBO *et al.*, 1992). Essas lesões e rupturas completas ou parciais deste tendão podem ocorrer por razões de idade, doenças, trauma ou deformidades congênitas (LESIC & BUMBASIREVIC, 2004). Muito freqüentemente a ruptura parcial do tendão calcâneo é mascarada ou acompanhada de peritendinite e, normalmente, os pacientes não procuram ajuda antes da fase crônica do episódio (KÄLEBO *et al.*, 1992). Os tratamentos para estes casos envolvem procedimentos cirúrgicos ou fisioterapia.

O reparo tecidual consta de uma série de eventos que se inicia imediatamente após a lesão. A recuperação de um tendão ou de outros tecidos lesados pode ocorrer por três caminhos: pela regeneração, pela cicatrização ou pela combinação de ambos. Regeneração é uma forma de reparo que produz um novo tecido que é estrutural e funcionalmente idêntico ao tecido normal (LEADBETTER, 1992). A regeneração representa o reparo ideal de um tecido lesado, entretanto, nem sempre isso acontece no caso de lesão do tendão. Nesse caso, o reparo pela cicatrização é o que mais comumente ocorre, sendo que o tendão reparado apresenta-se com propriedades estruturais e funcionais inferiores se comparado ao tendão não lesado (JÓZSA & KANNUS, 1997).

Quando o tendão, ou qualquer outro tipo tecidual sofre uma lesão, o corpo inicia um processo de reparo e formação de uma cicatriz que pode ser dividido em fases denominadas: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Cada fase é caracterizada por passos celulares específicos e eventos bioquímicos. A duração dessas fases pode variar conforme a localização e a extensão da lesão ou doença que acomete o tecido (WOO *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2004; MIDWOOD *et al.*, 2004; LUO & CHEN, 2005; SHARMA e MAFFULLI, 2005). Todas essas fases compreendem uma série de eventos que incluem coagulação sanguínea, inflamação, formação de um tecido de granulação, apoptose de células inflamatórias, neovascularização e síntese de colágeno (SINGER & CLARK, 1999). Na fase inflamatória do primeiro ao sétimo dia pós-injúria, os macrófagos e outras células fagocitárias, como eosinófilos e neutrófilos, removem os fragmentos de substâncias não-colagênicas intercelulares e as fibras de colágeno degeneradas pela ruptura (MARSOLAIS *et al.*, 2001). Com a ruptura das fibras de colágeno é detectada a deposição de fibrina-fibronectina, moléculas estas que estabilizarão a nova matriz extracelular a ser sintetizada e também atuam como uma rede para a migração e adesão celular (MIDWOOD *et al.*, 2004).

Após a fase inflamatória, tem-se o início da fase proliferativa, em cerca de 10-14 dias. Estudos de microscopia eletrônica, nesta fase proliferativa, mostraram aumento do retículo endoplasmático dos fibroblastos, que é um indicativo da atividade de síntese de matriz extracelular, além disso, o conteúdo de DNA e colágeno tipo III apresentam-se em concentrações elevadas durante esse processo reparativo. Acredita-se que essas mudanças auxiliam na síntese de colágeno e na gradual substituição do colágeno tipo III pelo tipo I (JÓZSA e KANNUS, 1997).

A fase de remodelação é vista após a fase proliferativa. É uma fase de longa duração, que começa por volta do vigésimo primeiro dia e pode se estender a um ano ou mais dependendo do tipo da lesão (HOUGLUM, 1992; WOO *et al.*, 1999). Nesta fase a matriz torna-se mais densa e longitudinalmente orientada (LIN *et al.*, 2004; SHARMA & MAFFULLI, 2005).

A principal razão das pesquisas que envolvem reparo em tendão calcâneo é para se compreender os processos que participam da restauração do tendão lesado. A severidade da ruptura pode se estender a umas poucas fibras ou à totalidade da espessura do tendão (WILLIAMS, 1986). A complexidade da organização dos feixes colagênicos é o principal motivo para não se obter uma regeneração perfeita de tendões lesados, seja com relação ao diâmetro das fibrilas (MATHEW & MOORE, 1991; SANDERS & GOLDSTEIN, 2001), ou na sua organização (ASTROM & RAUSING, 1995). MATHEW e colaboradores (1987) demonstraram que o colágeno tipo III começa a ser sintetizado na região da lesão, enquanto colágeno tipo I continua a ser normalmente sintetizado na área não lesionada. Esses autores ainda afirmaram que a nova população de fibras sintetizada apresenta um pequeno diâmetro (< 50 nm) e isso pode ser detectado nas primeiras três semanas. Outros estudos afirmam que a média do diâmetro das fibras de colágeno é 128 ± 10 nm no tendão controle, mas

apenas 30 ± 2 nm no tendão em recuperação nos primeiros 30 dias pós-injúria (MATHEW & MOORE, 1991).

Nos primeiros dias do processo inflamatório há uma significativa perda da resistência à tensão no tendão injuriado. Isso se continua pela segunda semana. A partir da gradual substituição do colágeno tipo III para colágeno tipo I há um aumento na resistência à tensão (HOUGLUM, 1992). Durante todo o tempo de remodelação, a resistência à tensão no tendão lesado permanece inferior ao tendão normal (CHIMICH *et al.*, 1991; WOO *et al.*, 1999), e aparentemente isso se relaciona ao menor diâmetro das fibras colágenas recém-formadas (FRANK *et al.*, 1992).

Alguns trabalhos têm mostrado a relação entre os processos de regeneração e a organização dos feixes de colágeno (MELLO *et al.*, 1975; MELLO & VIDAL, 2003), outros tem chamado a atenção para o papel de mediadores como os vários fatores de crescimento (MUTSARES *et al.*, 1997). Também tem sido verificado que o óxido nítrico (NO) tem papel na cicatrização de tendão (MURRELL *et al.*, 1997).

3. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (MORRIS & BILLIAR, 1994). O NO, que até meados da década de 1980 era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais, em pequenas concentrações age como mediador fisiológico e fisiopatológico em animais, plantas e seres humanos (MONCADA & HIGGS, 1993; DAVIS *et al.*, 2001). Esta molécula é sintetizada a partir da conversão do aminoácido L-arginina à L-citrulina, e sua

síntese é catalisada por isoformas da enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Estudos bioquímicos e análise seqüencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, duas isoformas são expressas constitutivamente, a forma neuronal (nNOS ou tipo 1) e a forma endotelial (eNOS ou tipo 3), dependentes de íons cálcio (Ca^{++}) e calmodulina e que estão envolvidas na sinalização celular, e uma forma induzível (iNOS ou tipo 2) em condições patológicas e que é ativada por citocinas (MARLETTA, 1994; SAHA & PAHAN, 2006). A biossíntese de NO já foi relatada em diversos tipos celulares como células endoteliais, miócitos, neurônios, macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas, hepatócitos, astrócitos, fibroblastos entre outros (MONCADA *et al.*, 1991; NATHAN, 1992; FUKUTO & CHAUDHURI, 1995). Sua síntese é estimulada durante os processos inflamatórios (VANE *et al.*, 1994) e de reparo em tecidos que passam por uma lesão (LIN *et al.*, 2001 a, b). Há evidências que esta molécula atua nas vias de sinalização celular e acelera o reparo tecidual (LUO & CHEN, 2005). O NO tem um papel central no processo de angiogênese e aumenta a taxa de formação de novos micro-vasos em tecidos que sofreram uma isquemia (DONNINI & ZICHE, 2002). Enquanto as duas formas de NOS constitutivas são sempre expressas para manter a homeostasia celular e produzem NO em quantidades fisiológicas (nM), a forma induzível é expressa em condições patológicas, como na inflamação, na resposta imune e no trauma (CONTI *et al.*, 2007). Tem sido mostrado que o NO gerado pela iNOS modula a ação de citocinas que agem na inflamação, incluindo interleucinas e TGF- β , fatores que atraem monócitos e neutrófilos (BELENKY *et al.*, 1993). Estas células, atraídas à região do reparo, são ativadas e iniciam a produção de TNF- α e interleucina 1, e esses fatores estão implicados no reparo tecidual (FRANK *et al.*, 2002). Uma vez expressa, a iNOS produz local e temporariamente grande quantidade de

NO (μM) que pode ser benéfica para o tecido lesado, por estar relacionada à eliminação de microorganismos e células tumorais. Há evidências que a atividade da iNOS represente uma poderosa estratégia para a estimular a atividade de um eventual infiltrado tecidual. Contudo, grande quantidade de NO pode induzir efeitos prejudiciais ao tecido, principalmente quando a resposta inflamatória não é controlada, o que pode ser visto na inflamação crônica ou em doenças auto-imunes (CONTI *et al.*, 2007).

No final das fases de reparo quando um aumento na síntese e deposição de colágeno é requerido, ligação entre NO e a deposição de colágeno tem sido descrita (SCHAFFER *et al.*, 1996). Em muitos estudos, através do tratamento com doadores de NO, uma dieta rica em L-arginina ou superexpressão das enzimas óxido nítrico sintetases através de terapia genética, observou-se um aumento no conteúdo de colágeno (SCHÄFFER *et al.*, 1997; THORNTON *et al.*, 1998; MUSCARA *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2000; XIA *et al.*, 2006).

Substâncias análogas à L-arginina, tais como a L-nitro-arginina (L-NA) (ISHII *et al.*, 1990; MAGGI *et al.*, 1991), N ω -amino-L-arginina (L-NAA), N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (MOORE *et al.*, 1990), N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) e NG monometil-L-arginina (L-NMMA) (MARLETTA *et al.*, 1988) inibem a atividade de NOS, tanto *in vitro* como *in vivo*, embora existam diferenças na especificidade e potência (FUKUTO e CHAUDHURI, 1995). Estes inibidores têm grande importância na pesquisa dos prováveis efeitos do NO nos tecidos, uma vez que a substituição do substrato habitual (L-arginina) pelos análogos irá inibir a produção de NO e seus efeitos conseqüentes. Os isômeros L são inibidores mais efetivos da NOS do que os isômeros D correspondentes (MONCADA *et al.*, 1997). Entre os inibidores disponíveis, o L-NMMA e o L-NAME são ativos por via

oral. Outros compostos não derivados da L-arginina, tais como guanidina, imidazóis, 7-nitroindazóis e azul de metileno (SOUTHAN & SZABÓ, 1996), também têm sido descritos como inibidores da NOS. Neste grupo existem compostos “seletivos” para a NOS, como é o caso da aminoguanidina que inibe preferencialmente a iNOS (CORBETT *et al.*, 1992) e o 7-nitroindazol que inibe preferencialmente a nNOS (MOORE *et al.*, 1993). Através do uso de inibidores de NOS tem sido possível estudar o papel do NO endógeno em diversos eventos fisiopatológicos. Dentre os inibidores de NOS, destaca-se o L-NAME, um inibidor amplamente usado devido à potente ação inibidora não-específica sobre todas as isoformas de NOS.

A inibição da síntese de NO acarreta sérios problemas durante o desenvolvimento intra-uterino em ratos (DIKET *et al.*, 1994), além de prejudicar a angiogênese e a deposição de colágeno. Há poucos trabalhos analisando a importância de NO no processo de cicatrização de tendões injuriados. MURRELL e colaboradores (1997) mostraram que em ratos com tendões lesados e tratados com inibidor de NOS, havia redução na área seccional do tendão e diminuição na sua resistência. Posteriormente, o trabalho de LIN e colaboradores (2001 a,b), sugere que as três diferentes isoformas conhecidas de NOS são sintetizadas por fibroblastos, e que esta atividade é aumentada após a injúria em tendão. Mais recentemente, YUAN e colaboradores (2003), mostraram que a aplicação direta de NO em tendões seccionados, permite uma melhor reorganização dos feixes de colágeno durante a cicatrização e também uma maior resistência à tensão, comparado com animais que não receberam o NO.

Apenas recentemente se descobriu que o NO pode ser sintetizado pelos mamíferos e como resultado disso já existem mais de 32.000 artigos científicos relacionados a essa molécula nos últimos cinco anos. As funções do NO até hoje descobertas são complexas e

antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual, e apesar dos vários estudos já existentes, faltam informações sobre o efeito do NO sobre componentes específicos da MEC, bem como sobre a atividade inflamatória durante o processo de cicatrização de tendões. Assim neste trabalho, visamos analisar a organização dos feixes de colágeno e regressão da inflamação na região seccionada, dos tendões de ratos não tratados e tratados com L-NAME (N ω -nitro-L-arginina metil éster), um inibidor de síntese de NOS.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Analisar aspectos morfológicos, dos tendões dos animais que foram submetidos a transecção parcial do tendão calcâneo em 7, 14 e 21 dias pós-injúria.
2. Verificar as alterações na composição geral da matriz extracelular do tendão em função dos procedimentos realizados.
3. Quantificar proteínas, glicosaminoglicanos e hidroxiprolina nos diferentes grupos experimentais.
4. Analisar as propriedades biomecânicas dos tendões.

REFERÊNCIAS

ASTROM, M.; RAUSING, A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop.*, v.316, p. 151-164. 1995.

BELENKI, S.N.; ROBBINS, R.A.; RUBISTEIN, I. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J Leukoc Biol.*, v.53, p. 498-503. 1993.

BENEVIDES, G.P.; PIMENTEL, E.R.; YOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; GOMES, L. Biochemical and biomechanical analysis of tendon of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res.*, v.45, p.206-215. 2004.

BERENSON, M.C.; BLEVINS, F.T.; PLASS, A.H.K.; VOGEL, K.G. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res.*, v.14, p. 518-525. 1996.

BIRK, D.E.; ZYCBAND, E. Assembly of the tendon extracellular matrix during development. *J. Anat.*, v.184, p. 457-463. 1994.

CARVALHO, H.F.; FELISBINO, S.L. The development of the pressure-bearing tendon of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat Embryol.*, v.200, p. 55-64. 1999.

CARVALHO, H.F.; VIDAL, B.C. The unique fibrillar arrangement of the bullfrog pressure-bearing tendon as an indicative of great functional deformability. *Biol. Cell*, v.82, p. 59-65. 1994.

CHIMICH, D.; FRANK, C.; SHRIVE, N.; DOUGALL, H.; BRAY, R. The effects of initial end contact on medial collateral ligament healing: A morphological and biomechanical study in a rabbit model. *J. Orthop. Res.*, v.9, p. 37-47. 1991.

CHIQUET, M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.*, v.18. p. 417-426. 1999.

CORBETT, J.A.; TILTON, R.G.; CHANG, K.; HASAN, K.; IDO, Y.; SON, J.R.; MCDANIEL, M.L. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*, v.41, p. 552-556. 1992.

COVIZI, D.Z.; FELISBINO, S.L.; GOMES, L.; PIMENTEL, E.R.; CARVALHO, H.F. Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell*, v.33, p. 483-490. 2001.

CRIBB, M.; SCOTT, J.E. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycans interactions in stressed tendons. *J. Anat.*, v.187, p. 423-428. 1995.

DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.41, p. 203-236. 2001.

DIKET, A.L.; PIERCE, M.R.; MUNSHI, U.K.; VOELKER, C.A.; ELOBYCHILDRESS, S.; GREENBERG, S.S.; ZHANG, X.J.; CLARK, D.A.; MILLER, M.J.S. Nitric-oxide inhibition causes intrauterine growth-retardation and hindlimb disruptions in rats. *Am J Obstet Gynecol.*, v.171, p. 1243-1250. 1994.

DONNINI, S.; ZICHE, M. Constitutive and inducible nitric oxide synthase: role in angiogenesis. *Antioxid Redox Signal*, v.4, p. 817-823. 2002.

ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P.P.; PIMENTEL, E.R.; GOMES, L. Ultrastructural characteristics of tensional regions in tendons from rats of different ages. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v.20, p. 109-114. 2003.

EVANKO, S.P.; VOGEL, K.G. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix*, v.10, p. 420-36. 1990.

EZURA, Y.; CHAKRAVARTI, S.; OLDBERG, A.; CHERVONEVA, I.; BIRK, D.E. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *Cell Biol.*, v.151, p. 779-787. 2000.

FEITOSA, V.L.; ESQUISATTO, M.A.; JOAZEIRO, P.P.; GOMES, L.; FELISBINO, S.L.; PIMENTEL, E.R. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. *Cell Mol Biol.*, v.48, p. 359-367. 2002 a.

FEITOSA, V.L.; VIDAL, B.C.; PIMENTEL, E.R. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. *J. Anat.*, v.200, p. 105-111. 2002 b.

FRANK, C.; McDONALD, D.; BRAY, D. Collagen fibril diameters in the healing adult rabbit medial collateral ligament. *Connective Tissue Res.*, v.27, p. 251-263. 1992.

FRANK, S.; KAMPFER, H.; WETZLER, C.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int.*, v.61, p. 882-888. 2002.

FUKUTO, J.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.35, p.165-194. 1995.

GILLARD, G.C.; REILLY, H.C.; BELL-BOOTH, P.G.; FLINT, M.H. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect Tissue Res.*, v.7, p. 37-46. 1979.

HAYEM, G. Tenology: a new frontier. *Joint Bone Spine*, v.68, p. 19-25. 2001.

HOUGLUM, P.A. Soft tissue healing and its impact on rehabilitation. *J.Sports Rehab.* v.1, p. 19-39. 1992.

HUKINS, D.W.; ASPDEN, R.M. Composition and properties of connective tissues. *Trends in Biochem. Sc.*, v.10, p. 260-264. 1985.

IOZZO, R.V.; MURDOCH, A.D. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.*, v.10, p. 598-614. 1996.

ISHII, K.; CHANG, B.; KERWIN, J.F.; HUANG, Z.J.; MURAD, F. N ω -nitroL-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J. Pharmacol.*, v.176, p. 219-223. 1990.

JÓZSA, L.; KVIST, M.; KANNUS, P.; VIENO, T.; JARVINEN, M.; LEHTO, M. Structure and macromolecular composition of the myotendineal junction. Histochemical, immunohistochemical and electron microscopic study of the rat calf muscles. *Acta Morphol. Hung.*, v.39, p. 287-297. 1991.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. *Human tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Human Kinetics, 574 pp. 1997.

KÄLEBO, P., ALLENMARK, C.; PETERSON, L.; SWÄRD, L. Diagnostic value of ultrasonography in partial ruptures of the Achilles tendon. *Am J. Sports Med.*, v.20, p.378-381. 1992.

KANNUS, P.; JÓZSA, L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.73, p.1507-1525. 1991.

KUC, I.M.; SCOTT, P.G. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect. Tissue. Res.*, v.36, p.287-296. 1997.

LEADBETTER, W.B. Cell-matrix response in tendon injury. *Clin Sports Med.* v.11, p. 533-578. 1992.

LESIC, A.; BUMBASIREVIC, M. Disorders of the Achilles tendon. *Cur Orthop.*, v.18, p. 63-75. 2004.

LIN, J-H.; WANG, M-X.; WEI, A.; ZHU, W.; DIWAN, A.D.; MURRELL, G.A.C. Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. *J Orthop Res.*, v.19, p. 139-142. 2001 a.

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

LIN, T.W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L.J. Biomechanics of tendon injury and repair. *J. Biomechanics* v.37, p. 865-877. 2004.

LUO, J.; CHEN, A.F. Nitric oxide, a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin.*, v.26, p. 256-264. 2005.

MAGGI, C. A.; BARBANTI, G.; TURINI, D.; GIULIANI, S. Effect of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG) on nonadrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum. *Br. J. Pharmacol.*, v. 103, p. 1970- 1972. 1991.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* v.78 ,p. 927-930. 1994.

MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISNHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochem.*, v.27, p. 8706-8711. 1988.

MARSOLAIS, D.; CÔTÉ, C.H.; FRENETTE, J. Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res.*, v.19, p. 1203-1209. 2001.

MATHEW, C.A.; MOORE, M.J.; CAMPBELL, L. A quantitative ultrastructural study of collagen fibril formation in the healing extensor digitorum longus tendon of the rat. *J. Hand Surg. Br.*, v.12, p. 313-320. 1987.

MATHEW, C.A.; MOORE, M.J. Collagen fibril morphometry in transacted rat extensor tendons. *J. Anat.*, v.175, p. 263-268. 1991.

MELLO, M.L.; GODO, C.; VIDAL, B.C.; ABUJADI, J.M. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. *Ann. Histochem.* v.20, p. 145-152. 1975.

MELLO, M. L. S.; VIDAL B. C. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement newly synthesized collagen fibers. *Cell Molec. Biol.*, v.49, p. 579-585. 2003.

MERRILEES, M.J.; FLINT, M.H. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat.*, v.157, p. 87-106. 1980.

MIDWOOD, K.S.; WILLIAMS, L.V.; SCHWARZBAUER, J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, p. 1031-1037. 2004.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J. Med.*, v.329, p. 2001-2012. 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev.*, v.49, p. 137-142. 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p. 109-142. 1991.

MOORE, P.K.; AL-SWAYEH, A.O.; CHONG, N.W.S.; EVANS, R.A.; GIBSON, A. N^G-Nitro-L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, v.99, p. 408-412. 1990.

MOORE, P. K.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z. A.; HART, S. L. 7-Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the without increasing blood pressure. *Br. J. Pharmacol.*, v.108, p. 296-297, 1993.

MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.*, v.266, p.829-839. 1994.

MURRELL, G.A.C.; SZABO, C.; HANNAFIN, J.A.; JANG, D.; DENG, X.H.; MURRELL, D.F.; WARREN, R.F. Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflamm. Res.*, v.46, p.19-27. 1997.

MUSCARA, N.M.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; WALLACE, J.L. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, 129, p. 681-686. 2000.

MUTSARES, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G.J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.29, p. 5-17. 1997.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, v.6, p. 3051-3064, 1992.

SAHA, N.R.; PAHAN, K. Signal for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int.*, v.49, p.154-163, 2006.

SANDERS, J.E.; GOLDSTEIN, B.S. Collagen fibril diameters increase and fibril densities decrease in skin subjected to repetitive compressive and shear stresses. *J. Biomech.*, v.34, p. 1581-1587. 2001.

SCHÄFFER, M.R.; EFRON, P.A.; THORNTON, F.J.; KLINGEL, K.; GROSS, S.S.; BARBUL, A.. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol.*, v.158, p. 2375-2381. 1997.

SCHAFFER, M.R.; TANTRY, U.; GROSS, S.S.; WASSERBURG, H.L.; BARBUL, A. Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res.*, v.63, p. 237-240. 1996.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: Healing and Repair. *J. Bone Joint Surg.*, v.87, p. 187-202. 2005.

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

SHI, H.P.; EFRON, D.T.; MOST, D.; TANTRY, U.S.; BARBUL, A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery*, v.128, p. 374-378. 2000.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.*, v.341, p.738-746. 1999.

SMITH, R.K.W.; BIRCH, H.L.; GOODMAN, S.; HEINEGÅRD, D.; GOODSHIP, A.E. The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration-hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comp. Biochem. and Phys. Part A*, v.133, p. 1039-1050. 2002.

SOUTHAN, C. J.; SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.*, v. 51, p. 383-394, 1996.

THORNTON, F.J.; SCHÄFFER, M.R.; WITTE, M.B.; MOLDAWER, L.L.; MACKAY, S.L.; ABOUHAMZE, A.; TANNAHILL, C.L.; BARBUL, A. Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.246, p. 654-659. 1998.

van der REST, M.; GARONE, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.*, v.5, p. 2814-2823. 1991.

VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v.91, p. 2046-2050. 1994.

VIDAL, B.C. Dichroism on collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Annals of Histochem.*, v.115, p. 289-296. 1970.

VIDAL, B.C.; CARVALHO, H.F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. *Matrix*, v.10, p. 48-57. 1990.

VILARTA, R.; VIDAL, B.C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*, v.9, p. 55-61. 1989.

VOGEL, K.G.; KOOB, T.J. Structural specialization in tendon under compression. *Int. Rev. Cytol.*, v.115, p. 267-293. 1989.

VOGEL, K.G.; KELLER, E.J.; LENHOFF, R.J.; CAMPBELL, K.; T.J. Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Eur J Cell Biol.*, v.41, p. 102-112. 1986.

XIA, W.; SZOMOR, Z.; WANG, Y.; MURRELL, G.A.C. Nitric oxide enhances collagen synthesis in cultured human tendon cells. *J. Orthop. Res.*, v.24, p.159-172. 2006.

WAGGETT, K.G.; RALPHS, J.R.; KWAN, A.P.L.; WOODNUTT, D.; BENJAMIN, M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol.*, v.16, p. 457-470. 1998.

WILLIAMS, J.P.G. Achilles tendon lesions in sport. *Sports Med.*, v.3, p. 114-135. 1986.

WOO, S. L-Y.; HILDEBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A.; PAPAGEORGIOU, C.D.; WANG, J.H-C. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Orthop Tissue Engineer.*, v.367S, p. S312-S323. 1999.

YOUNG. B.B; GORDON, M.K.; BIRK, D.E. Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: Association with assembly and growth of collagen fibrils. *Dev. Dyn.*, v.217, p. 430-439. 2000.

YUAN, J.; MURRELL, G.A.C.; WEI, A.-Q.; APPLEYARD, R.C.; DEL SOLDATO, P.; WANG, M.-X. Addition of nitric oxide via nitroflurbiprofen enhances the material properties of early healing of young rat Achilles tendon. *Inflamm. Res.*, v.52, p. 230-237. 2003.

RESULTADOS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foram elaborados dois artigos científicos:

Artigo 1: Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with l-name.

Artigo 2: Análise morfológica e bioquímica de tendão calcâneo de ratos após transecção parcial, com e sem inibidor de óxido nítrico sintetase.

**ORGANIZATION OF COLLAGEN BUNDLES DURING TENDON
HEALING IN RATS TREATED WITH L-NAME**

**Tomiosso, T.C. ¹; Nakagaki, W.R. ¹; Gomes, L. ¹; Hyslop, S. ²; Pimentel,
E.R. ^{1,*}**

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

²Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Short title: Tendon healing in L-NAME-treated rats

Keywords: tendon, nitric oxide, L-NAME, biomechanics, collagen

Contact Author:

Dr. Edson Rosa Pimentel
Department of Cell Biology
Institute of Biology
CP 6109, State University of Campinas - UNICAMP
13083-863 Campinas, SP, Brazil.
e-mail: pimentel@unicamp.br
Telephone: 0055-19-35216117
Phone/Fax: 0055-19-35216111

Abstract

The Achilles tendon can support high tension forces and may experience lesions. The damaged tissue does not regenerate completely, and the organization and mechanical properties of the repaired tendon are usually inferior to those of a healthy tendon. Nitric oxide (NO) plays an important role in wound repair, but few studies have investigated its influence on the reorganization of extracellular matrix components. In this work, we examined the structural reorganization and repair in calcaneal tendon after injury in rats treated with the NO synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). The right calcaneal tendon of male Wistar rats was partially transected 0.5 cm from its insertion in the *calcaneus*. One group of rats was treated with L-NAME (~300 mg/kg/day, given in the drinking water) for four days prior to sectioning of the tendon and throughout the post-operative period. Control rats received water without L-NAME. The tendons were excised 7, 14 and 21 days post-injury and used to quantify hydroxyproline and for mechanical tests. Some tendons were also processed for histomorphological analysis by polarized light microscopy after staining with toluidine blue. Polarized light microscopy showed that the collagen fibers were disorganized by day 7 in non-treated and L-NAME-treated rats. By days 14 and 21 in non-treated rats the extracellular matrix was more homogeneous, although this homogeneity was still less than in normal tendon. In contrast in injured tendons from L-NAME-treated rats, the collagen fibers were still disorganized on day 21. Tendons from L-NAME-treated rats had more hydroxyproline and were less resistant to rupture compared to those from non-treated rats. These results indicate that NO modulates tendon healing, with a reduction in NO biosynthesis delaying reorganization of the extracellular matrix, especially collagen.

Keywords: tendon, nitric oxide, L-NAME, biomechanics, collagen

INTRODUCTION

The Achilles tendon is a connective tissue with a parallel array of collagen fibers and elongated fibroblasts or fibrocytes. This tendon transmits the tensile forces generated by muscle to the bone. Rupture of the Achilles tendon is a common injury, particularly in sports [1]. The repair of a ruptured tendon involves a series of overlapping and coordinated processes, including inflammation, cell proliferation, migration and differentiation, matrix deposition, and tissue remodeling, that begin after the initial wound. Subsequent wound healing is an essential process for restoration of the intact structure in injured tissue [2, 3].

The healing of injured tendons involves three phases. Initially, there is an inflammatory phase that is followed a few days later by a proliferative phase and, finally, a remodeling phase characterized by a decrease in cellularity and biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans [3, 4]. Inflammation, granulation and collagen synthesis are mediated by a complex mixture of cytokines, growth factors and other bioactive molecules that are released coordinately into the area of injury [5]. In addition to these mediators, there is increasing evidence of an important role for small diffusible molecules such as nitric oxide (NO) in wound healing [6].

NO is a short-lived, highly reactive free radical involved in neurotransmission, cardiovascular regulation, immunological and inflammatory responses, and tissue healing [7, 8]. NO is synthesized from the precursor amino acid L-arginine by a family of enzymes known as nitric oxide synthases (NOS) [8-10]. Three isoforms of NOS have been described. Two isoforms (endothelial and neuronal NOS, or eNOS and nNOS, respectively) are constitutively expressed and produce low, stable amounts of NO, whereas the third isoform, inducible NOS (iNOS), produces high concentrations of NO in response to a variety of inflammatory stimuli [9]. All three NOS isoforms are involved in wound healing

since inhibition of NO biosynthesis by the topical application (to the wound surface) [11] or systemic (oral) administration [12] of NOS inhibitors impairs collagen synthesis and wound healing [13, 14]. NO has been implicated in several aspects of tendon healing, and the three NOS isoforms are expressed during tendon healing, although their patterns of expression vary during the different phases of this process [15]. NOS inhibition attenuates tendon healing, decreases the final cross-sectional area and reduces the failure load of healing Achilles tendon [6, 15, 16].

Collagen synthesis is very important for wound healing and its deposition in the extracellular matrix of the wound is regulated by NO [17]. However, the precise role of NO in the regulation of collagen synthesis is unclear and the mechanisms whereby healing is enhanced are undetermined. Thus, whereas several reports have described the inhibition of collagen deposition by NO in pulmonary and vascular tissue [18-20], others have shown that NO stimulates collagen synthesis in skin during reepithelialization [12]. In previous reports, treatment with dietary rich in L-arginine, NO donors, or iNOS overexpression via gene therapy, increases collagen content of experimental wounds [21-24]. Furthermore, Xia et al. [25] showed for first time that NO can enhance collagen synthesis in human tendon cells in vitro.

In this study, we examined the influence of NO on the levels of collagen, biomechanical properties and morphological organization of partially transected Achilles tendon in rats treated with N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a non-specific NOS inhibitor. The tendons were examined 7, 14 and 21 days after injury, which corresponded to the inflammatory, proliferative and initial remodeling phases of tendon healing, respectively.

MATERIAL AND METHODS

Animals Model and NO synthesis inhibition

Rats were housed two/cage with 12 hr light: dark cycle in a central animal care facility, at 23° C. They were fed rat chow and water *ad libitum*. All of the experimental procedures involving animals were approved by the institutional Ethics Committee for Animal Use (CEEAA/IB/UNICAMP, protocol n° 1388-1).

To produce tendon injury, the rats were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p.) and the right Achilles tendon was partially transected with a scalpel 0.5 cm from the calcaneal insertion, after which the skin was sutured with two simple nylon sutures of 5-0 ethilon monofilament. Seven, 14 and 21 days after injury the rats were killed with an overdose of anesthetic and the Achilles tendons were removed for analysis. Control rats had the tendon transected but received water without treatment. To investigate the involvement of NO in tendon repair, some rats were treated with L-NAME (~ 300 mg/kg/day; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) administered in the drinking water for four days prior to surgical intervention and throughout the post-operative period [6]. The dose used was selected from well-reported literature. Once a week, the rats were weighed, and tail blood pressure was measured by a tail-cuff method (Kent Instruments).

Seventy-eight male Wistar rats (8-10 weeks old, 300-350 g) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB/UNICAMP), were utilized for histological analysis (n = 18), quantification of hydroxyproline (n = 30), and biomechanical testing (n = 30). Normal tendon corresponds to the non-operated left Achilles tendons of non-treated rats.

Histological analysis

Achilles tendons obtained from rats treated as described above were fixed in 4% formalin for 18 h and then processed for inclusion in paraffin (Histosec, Merck). Sections 7 μm thick were stained with toluidine blue and analyzed by polarized light microscopy. The organization of collagen bundles was examined with a Zeiss Axioplan 2 microscope loaded with Kodak Gold ISO 100 film. To assess birefringence, the analyzer and the polarizer were crossed and the material was positioned at an angle of 45° relative to the polarizer.

Quantification of hydroxyproline

Hydroxyproline was used as an indicator of the collagen content of the wound. Samples from the transected region of the tendon were hydrolyzed in 6 N HCl (10 mg of tissue/ml) for 4 h at 130°C , after which the hydrolysate was treated with chloramine T and perchloric acid/aldehyde. After incubation for 15 min at 60°C , the material was cooled and the absorbance at 550 nm was read [26]. The amount of hydroxyproline in the sample was calculated by comparison with a standard curve of hydroxyproline and expressed as mg/g of wet tissue.

Biomechanical parameters

The gastrocnemius and soleus muscles, the tendon and the paw were excised as a unit from rats killed with an overdose of anesthetic. The tendons were kept in physiological solution until tested (to prevent the fibers from drying out). For the test, the specimens were clamped in a mechanical support with the myotendinous junction and the phalanges at opposite extremities, as described by Nakagaki et al. [27]. The experiments were done with

a machine designed specifically for testing the mechanical properties of materials (MTS, model TETSTAR II; designed by the Laboratory of Mechanical Properties, Faculty of Mechanical Engineering, UNICAMP). In each test, the tendon was subjected to a gradual increase in load at a constant displacement rate of 20 mm/min using a load cell of 1 kN, until the tendon ruptured. The results of these tests were used to calculate the structural properties of the tendons in each group. The maximum load, displacement at maximum load, extrinsic stiffness of the tissue and energy absorption at failure were analyzed, as described by Woo et al. [28].

Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm standard deviation, where appropriate. The biochemical and biomechanical data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test for multiple comparisons. A value of $p < 0.05$ indicated significance.

RESULTS

Arterial blood pressure measurements

As confirmation of the efficacy of treatment with L-NAME, the arterial blood pressure of control and L-NAME treated rats was measured. The blood pressure of all L-NAME treated groups presented an increase at the end of the experiment. In the group killed 7 days post-injury, the blood pressure of L-NAME treated rats increased 49% ($p < 0.001$), in the group killed 14 days after injury the increase was 63% ($p < 0.001$), and in the group killed 21 days the final blood pressure was 69% higher than in the beginning of

the experiment ($p < 0.001$). No alterations in the blood pressure of control group were observed.

Morphology

Polarized light microscopy of normal Achilles tendon revealed intense birefringence indicative of highly organized collagen bundles with a wavy appearance (Fig. 1A). No observed morphological differences between normal tendons (uninjured) of rats treated or non-treated with L-NAME. In tendons obtained 7 days after injury from rats treated with or without L-NAME there was birefringence up to the border where the tendon had been sectioned (Fig. 1B, C). There was no birefringence beyond this border, indicating that the newly synthesized collagen had not yet been organized into bundles, i.e., there was still extensive disorganization of the extracellular matrix in this region. In contrast, there was a gradual increase in the organization of the extracellular matrix in tendons obtained 14 (Fig. 1D) and 21 (Fig. 1F) days after injury from rats not treated with L-NAME. These tendons showed a greater number of fibers and better fiber alignment along the long axis of the tendon. However, the appearance of the fibrous matrix was not the same as that of normal tendon. The tendons obtained from L-NAME treated rats 14 (Fig. 1E) and 21 (Fig. 1G) days after injury showed disorganized fibers in both periods.

Hydroxyproline content

The hydroxyproline content of the transected region of tendons from rats treated with L-NAME was significantly greater than in non-treated rats in all three periods (7, 14 and 21 days after injury) (Fig. 2).

Biomechanical parameters

The biomechanical tests indicated that treatment with L-NAME significantly altered the tensile properties of the tendons. Specifically, L-NAME reduced the resistance of tendons 14 and 21 days after injury compared to tendons from non-treated rats, as shown by the lower maximum load in the former group (Fig. 3A). Similar results were obtained for the energy of failure (Fig. 3D) and extrinsic stiffness (Fig. 3C), i.e., treated tenotomized tendons were less resistant to deformation. In contrast, there were no differences in the values for these parameters in tendons from L-NAME-treated and non-treated rats 7 days after injury. The displacement at maximum load was significantly different between tendons from L-NAME-treated and non-treated rats only at 7 days after injury (Fig. 3B).

DISCUSSION

Tendon lesions significantly alter the biomechanical properties of these structures [29, 30], and several studies have examined if NO biosynthesis can influence the regeneration of injured tendons [6, 15, 25, 31-33]. As shown here, the inhibition of NOS prior to injury attenuated the healing response in lesion of tendons. These findings agree with those of Murrell et al. [6, 15, 31], who reported that the inhibition of NOS affected the volume of healing Achilles tendon, rather than the morphological or material properties of this structure, reflected in a decrease in failure load.

Tendon repair involves a complex, orchestrated series of physiological events that includes protein synthesis, cell migration, and degradation of the extracellular matrix, particularly collagen [34, 35]. As described above, polarized light microscopy showed that uninjured tendons had a strong birefringence caused by the extensive aggregation and high organization of the collagen bundles [36]. In tendons examined 7 days post-injury the

collagen fibers were arranged in parallel up to the border of the damaged region where the damaged collagen fibers were digested or phagocytosed. The collagenous matrix exhibited a heterogeneous and disorganized aspect, denoted by the lack of birefringence bright when observed under polarization microscopy. Collagen III is synthesized by fibroblasts during the first 7 days after injury, but the fibrils form an irregular and disorganized network [35]. By 14 and 21 days after injury there were collagen fibers in the transected area, but the tendon had still not regained the compact, ordered arrangement typical of normal tendon. In L-NAME-treated rats, the organization of the collagen was not the same as in operated rats that were not treated with L-NAME, even 21 days after injury. This finding confirmed that NO has an important role in the extracellular deposition and organization of collagen bundles [6].

Treatment with L-NAME significantly modified the biomechanical properties of injured tendons, with a significant reduction in the resistance to tension 14 and 21 days after injury when compared to non-treated rats. This lower resistance was reflected in reduced values for the maximum load, stiffness and absorbed energy on the 14th and 21st days of healing, compared to non-treated rats. These lower values were most likely a consequence of the lower organization of the collagen bundles in L-NAME-treated rats. This conclusion agrees with the observation that collagen fibers become increasingly organized as healing progresses [38], and that the resistance of tendons to traction is directly related to the extent of this organization [39]. Our results also agree with those of Murrell et al. [6] who reported a decrease in the cross-sectional area and resistance to traction in tenotomized tendons treated with L-NAME. It is worthwhile to mention that inside of each group, i.e., treated and non-treated rats, with 14 and 21 days after injury,

there was an increase of resistance to tension forces, indicating that the healing process improves with the time after injury.

The absence of differences in parameters like maximum load, extrinsic stiffness, energy at failure at 7 days after injury, may be because at this time the ECM was little organized, with or without L-NAME treatment. Besides this the effect of NO[•] on the tissue is low because the greatest synthesis of NO[•] occurs amongst the 7 and 14 days post-injury, becoming to the basal level after this period [6, 40]. After 7 days, the values for those parameters in non-treated animals were higher, indicating that the presence of NO improve the biomechanical properties of the tendon. No explanation was found for the difference in maximum displacement between treated and non-treated rats, detected at 7 days post-injury.

The higher content of hydroxyproline seen in L-NAME-treated rats disagreed with studies showing that NO stimulates collagen deposition [6, 8, 21-25]. In contrast, several studies have reported that NO inhibits collagen synthesis in vascular smooth muscle cells, pulmonary tissue cells, small intestinal lamina propria fibroblasts and pleural mesothelial cells [18-20, 41]. The higher content of hydroxyproline in L-NAME-treated rats may be attributable to the greater arginase levels found in tissue undergoing repair [42]. As with NOS, L-arginine is a substrate for arginase but the resulting amino acid is proline instead of citrulline [43]. This reaction is enhanced when NOS activity is inhibited by L-NAME since more L-arginine is then available for arginase. NOS and prolyl hydroxylase, an enzyme that hydroxylates proline, depend on iron, oxygen, ascorbic acid and α -ketoglutarate. Consequently, when NOS activity is inhibited, there will be no competition between the two enzymes for these co-factors and the hydroxylation of proline by prolyl hydroxylase

will be greater [43]. This enhanced activity could account for the increase in hydroxyproline content seen in L-NAME-treated rats. However, a greater hydroxyproline production does not necessarily imply more highly organized collagen bundles, as clearly demonstrated here by the morphological analysis and biomechanical results.

CONCLUSION

In conclusion, the tendons that passed by NOS inhibition exhibited significant implication on the biomechanical properties during the uniaxial traction test. This result corroborated the morphological analysis and indicated that the level of the ECM organization is essential for the mechanical functions of the tendon during the healing. The results of this study indicate that NO is beneficial in the healing of rat Achilles tendon and that this mediator plays a pivotal role in regulating the biosynthesis of collagen.

ACKNOWLEDGMENTS

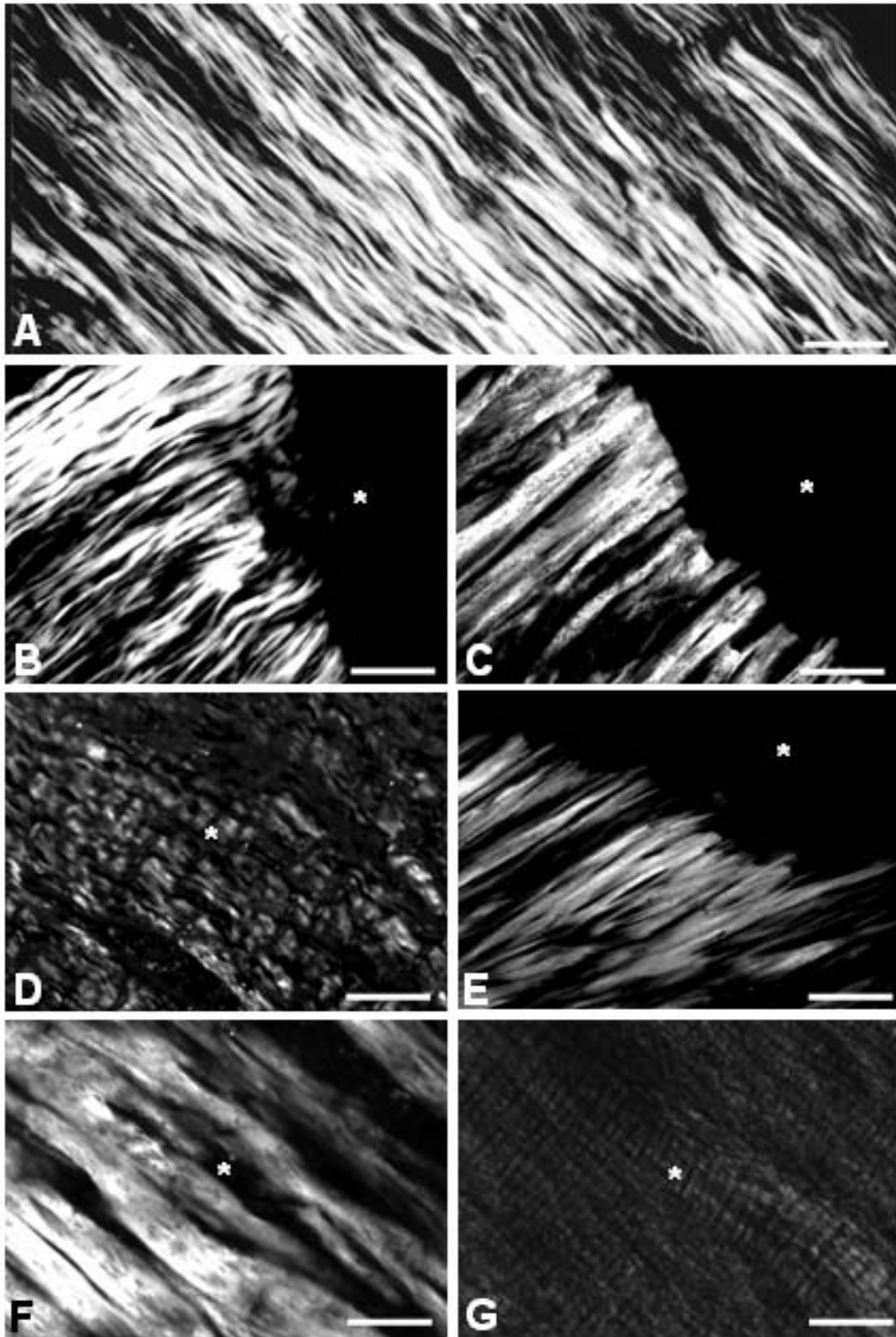
The authors thank Francisco Angelo Malatesta for technical assistance. T.C.T. and W.R.N were supported by a studentship from CAPES, and S.H. was supported by a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

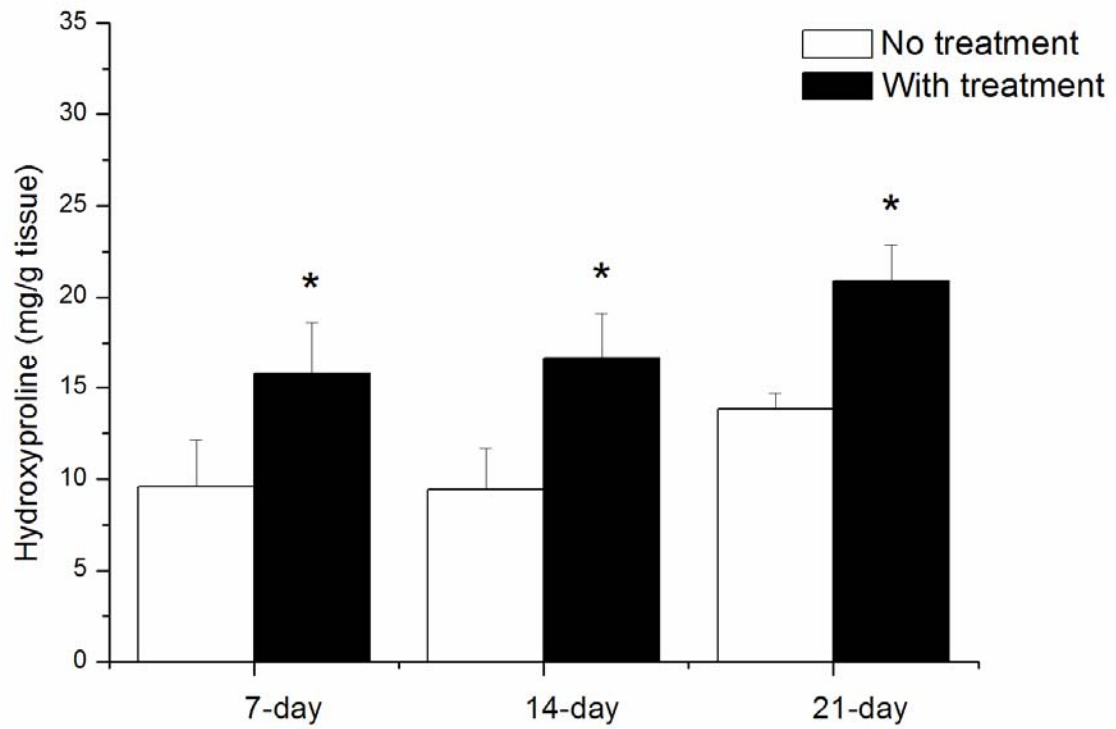
CAPTIONS

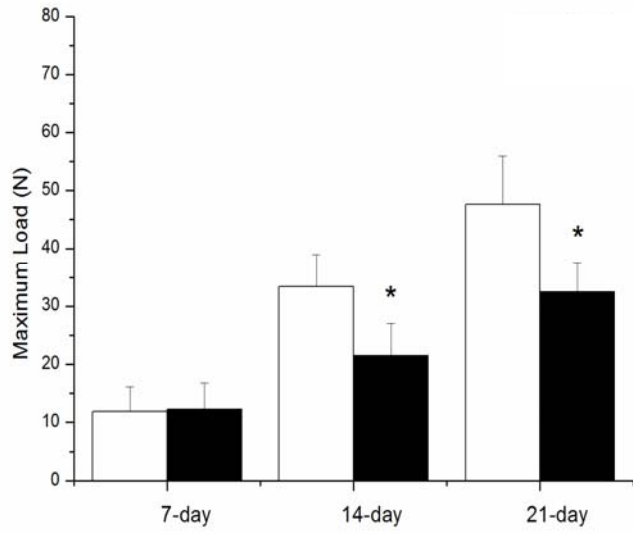
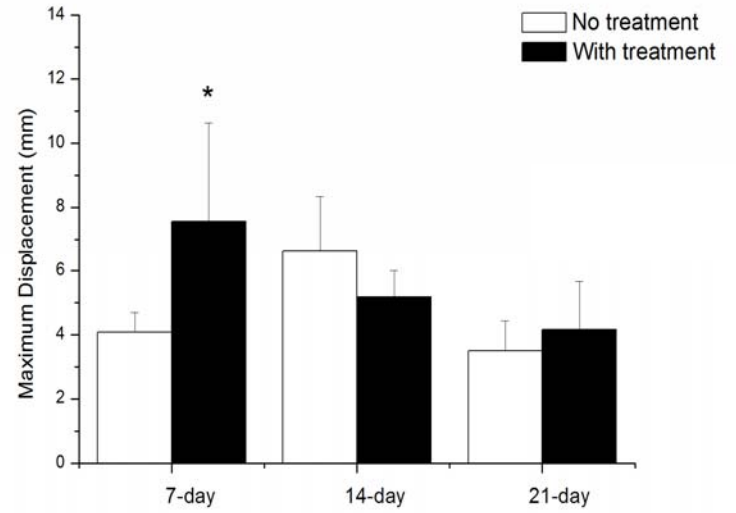
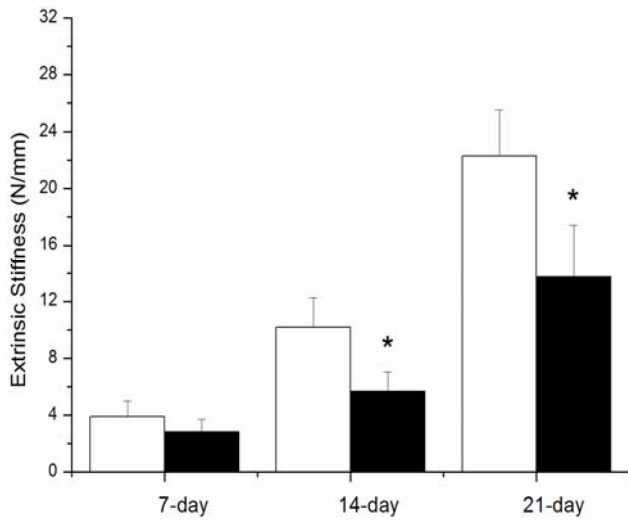
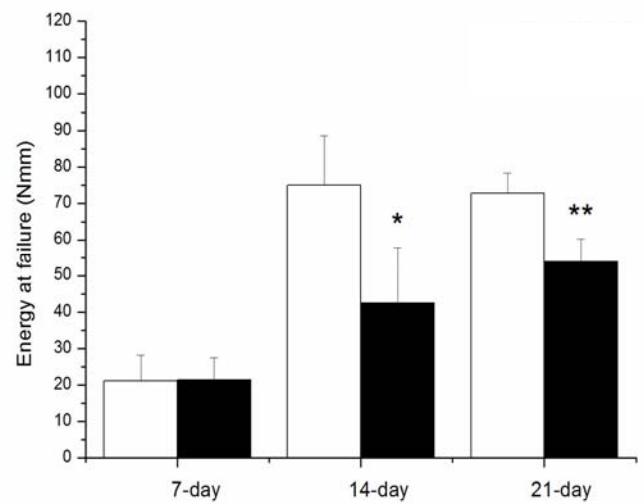
Figure 1: Polarized light microscopy of toluidine blue-stained sections of normal tendon (A) and of the transected region of tendons 7 (B, C), 14 (D, E) and 21 (F, G) days after injury in rats that were (C, E, G) and were not (B, D, F) treated with L-NAME. In normal tendon, the collagen fibers were intensely birefringent and formed aggregates that were arranged longitudinally. The lack of birefringence 7 days after injury (B, C) indicated complete disorganization of the collagen fibers, and the weak birefringence seen 14 days after injury (D) indicated that the new collagen fibers were still disorganized. The fibers showed greater organization by 21 days after injury (F), but were still less birefringent than normal tendon (A). In contrast, in rats treated with L-NAME, the collagen fibers were still disorganized 21 days after injury (G). The lack of birefringence 7 (C) and 14 (E) days after injury in L-NAME-treated rats again indicated disorganization of the collagen bundles. (*) Region of transection. Scale bar: 30 μ m.

Figure 2: Hydroxyproline content of the transected region of tendons 7, 14 and 21 days after injury in rats that were or were not treated with L-NAME. Note the increase in hydroxyproline in tendons from L-NAME-treated rats. The columns are the mean \pm SD of tendons. * $p < 0.05$ compared to non-treated rats.

Figure 3: Mechanical properties of sectioned Achilles tendons from rats non-treated and treated with L-NAME. The maximum load (A), extrinsic stiffness (C) and failure energy (D), but not displacement at maximum load (B), were lower in L-NAME-treated rats. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the corresponding non-treated group in each period (7, 14 and 21 days after injury).





**A****B****C****D**

REFERENCES

1. Cribb, M., and Scott, J.E. (1995). Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendons. *J. Anat.*, 187: 423-428.
2. Midwood, K.S., Williams, L.V. and Schwarzbauer, J.E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36: 1031-1037.
3. Sharma, P., and Maffulli, N. (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J. Bone Joint Surg.*, 87: 187-202.
4. Woo, S.L., Hildebrand, K., Watanabe, N., Fenwick, J.A., Papageorgiou, C.D., and Wang, J.H.(1999). Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 367: S312-323.
5. Arti, S., Anamika, M.R., and Ravi, S. (1999). Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis. *Mol. Cell. Biochem.*, 200: 27-33.
6. Murrell, G.A.C., Szabo, C., Hannafin, J.A., Jang, D., Deng, X.H., Murrell, D.F., and Warren, R.F. (1997). Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflamm. Res.*, 46: 19-27.
7. Rizk, M., Witte, M.B., and Barbul, A. (2004). Nitric oxide and wound healing. *World J. Surg.*, 28: 301-306.
8. Luo, J., and Chen, A.F. (2005). Nitric oxide, a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol. Sin.*, 26: 256-264.
9. Griffith, O.W., and Stuehr, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.*, 57: 707-736.

10. Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., and Murad, F. (2001). Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41: 203-236.
11. Bulgrin, J.P., Shabani, M., Chakravarthy, D., and Smith, D.J. (1995). Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds. *Wounds*, 7: 48-57.
12. Schaffer, M.R., Tantry, U., Gross, S.S., Wasserburg, H.L., and Barbul, A. (1996). Nitric oxide regulates wound healing. *J. Surg. Res.*, 63: 237-240.
13. Schaffer, M.R., Tantry, U., Thornton, F.J., and Barbul, A. (1999). Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur. J. Surg.*, 165: 262-267.
14. Shi, H.P., Efron, D.T., Most, D., and Barbul, A. (2001). The role of iNOS in wound healing. *Surgery*, 130: 225-229.
15. Lin, J.-H., Wang, M.-X., Wei, A., Zhu, W., Diwan, A.D., and Murrell, G.A.C. (2001). Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. *J. Orthop. Res.*, 19: 136-142.
16. Sharma, P., and Maffulli, N. (2006). Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 6: 181-190.
17. Hsu, Y.-C., Hsiao, M., Wang, L.-F., Chien, Y.W., and Lee, W.-R. (2006). Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation. *Nitric Oxide*, 14: 327-334.
18. Chatziantoniou, C., Boffa, J.J., Ardoillou, R., and Dussaule, J.C. (1998). Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice. Role of endothelin. *J. Clin. Invest.*, 101: 2780-2789.
19. Chakravorty, D., and Kumar, K.S. (1997). Induction of cell proliferation and collagen synthesis in human small intestinal lamina propria fibroblasts by lipopolysaccharide: possible involvement of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240: 458-463.

20. Owens, M.W., Milligan, S.A., and Grisham, M.B. (1996). Inhibition of pleural mesothelial cell collagen synthesis by nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.*, 21: 601-607.
21. Muscara, N.M., McKnight, W., Asfaha, S., and Wallace, J.L. (2000). Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 681-686.
22. Shi, H.P., Efron, D.T., Most, D., Tantry, U.S., and Barbul, A. (2000) Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery*, 128: 374-378.
23. Thornton, F.J., Schäffer, M.R., Witte, M.B., Moldawer, L.L., MacKay, S.L., Abouhamze, A., Tannahill, C.L., and Barbul, A. (1998). Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246: 654-659.
24. Schäffer, M.R., Efron, P.A., Thornton, F.J., Klingel, K., Gross, S.S., and Barbul, A. (1997). Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol.*, 158: 2375-2381.
25. Xia, W., Szomor, Z., Wang, Y., and Murrell, G.A.C. (2006). Nitric oxide enhances collagen synthesis in cultured human tendon cells. *J. Orthop. Res.*, 24: 159-172.
26. Stegeman, H., and Stalder, K. (1967). Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta*, 18: 267-273.
27. Nakagaki, W.R., Biancalana, A., Benevides, G.P., and Gomes, L. (2007). Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. *Connect. Tissue Res.*, 48: 219-228.
28. Woo, S.L.Y., Debski, R.E., Withrow, J.D., and Jansushek, M.A. (1999). Biomechanics of knee ligaments. *Am. J Sports Med.*, 27: 533-543.

29. Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L., and Enwemeka, C.S. (1999). Matrix remodeling in healing rabbit Achilles tendon. *Wound Repair Regen.*, 7: 518-527.
30. Silva, M.J., Ritty, T.M., Ditsios, K., Burns, M.E., Boyer, M.I., and Gelberman, R.H. (2007). Tendon injury response: assessment of biomechanical properties, tissue morphology and viability following flexor digitorum profundus tendon transection. *J. Orthop. Res.*, 22: 990-997.
31. Xia, W., Wang, Y., Appleyard, R.C., Smythe, G.A., and Murrell, G.A.C. (2006). Spontaneous recovery of injured Achilles tendon in inducible nitric oxide synthase gene knockout mice. *Inflamm. Res.*, 55: 40-45.
32. Murrell, G.A.C. (2007). Using nitric oxide to treat tendinopathy. *Br. J. Sports Med.*, 41: 227-231.
33. Murrell, G.A.C. (2007). Oxygen free radicals and tendon healing. *J. Shoulder Elbow Surg.*, 16: S208-214.
34. Liu, S.H., Yang, R.S., al-Shaikh, R., and Lane, J.M. (1995). Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 318: 265-278.
35. Lin, T.W., Cardena, L., and Soslowsky, L.J. (2004). Biomechanics of tendon injury and repair. *J. Biomech.*, 37: 865-877.
36. Vidal, B.C. (1995). Crimp as part of helical structure. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sci. Vie. Life Sciences*, 318: 173-178.
37. Houghlum, P.A. (1992). Soft tissue healing and its impact on rehabilitation. *J. Sports Rehab.*, 1: 19-39.
38. Madden, J.W. (1970). Current concepts of wound healing as applied to hand surgery. *Orthop. Clin. North Am.*, 1: 325-334.

39. Vilarta, R., and Vidal, B.C. (1989). Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*, 9: 55-61.
40. Moncada, S., and Higgs, E.A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329: 2001-2012.
41. Shukla, A., Rasik, A.M., and Shankar, R. (1999). Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis. *Mol. Cell. Biochem.*, 200: 27-33.
42. Albina, J.E., Mills, C.D., Henry, W.L., and Caldwell, M.D. (1990). Temporal expression of different pathways of L-arginine metabolism in healing wounds. *J. Immunol.*, 144: 3877-3880.
43. Witte, M.B., and Barbul, A. (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.*, 4: 406-412.

Análise morfológica e bioquímica de tendão calcanear de ratos após transecção parcial, com e sem inibidor de óxido nítrico sintetase

Tomiosso, T.C.¹; Gomes, L.¹; Hyslop, S.²; Pimentel, E.R.¹

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

² Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Tem sido descrito que o óxido nítrico (NO) regula a regeneração do tendão sendo muito importante no reparo de tendão calcanear, pois este quando lesado não se regenera totalmente e a organização e estrutura do tendão reparado são inferiores ao tendão saudável. O objetivo desse trabalho foi analisar a organização da matriz extracelular em tendão parcialmente seccionado de ratos não tratados e tratados com L-NAME (N ω -nitro-L-arginina metil éster), um inibidor de óxido nítrico sintetase (NOS). Os tendões de animais não tratados e tratados com L-NAME foram removidos aos 7, 14 e 21 dias pós-injúria, e foram utilizados para observações em microscopia de luz, análise dos componentes da matriz por SDS-PAGE e em gel de agarose-PDA, dosagens de proteínas totais e de glicosaminoglicanos. Analisando o material não tratado com L-NAME, foi observado com relação às fibras de colágeno o início da reorganização das fibras em 14 dias pós-injúria e isto se continua em 21 dias. Nos animais tratados com L-NAME, mesmo ainda em 21 dias pós-injúria a matriz colagênica mostrou-se desorganizada. Além disso, os tendões dos animais tratados com o L-NAME, em todos os três tempos, mostraram-se mais

acentuadamente infiltrados por células. A análise em SDS-PAGE mostrou uma maior quantidade de proteínas com massa molecular entre 14 e 67 kDa nos tendões seccionados de 7 e 14 dias pós-injúria de animais não tratados. Nos animais tratados com L-NAME, todos os três tempos apresentaram uma maior quantidade dessas proteínas. Também na dosagem de proteínas houve uma maior quantidade destas nos animais tratados. De forma contrária, foi observada uma maior concentração de GAGs nos animais não tratados. Com relação ao tipo de GAG nos tendões seccionados foi identificada principalmente a presença de dermatan sulfato. Nossos resultados mostram que o reparo do tendão é complexo e que a presença de NO é fundamental para a recuperação do tecido, visto que nos tendões de animais tratados com L-NAME, o tecido mostrou uma inflamação prolongada com prejuízo principalmente da organização da matriz colagênica.

Introdução

Os tendões são tecidos conjuntivos que consistem de poucas células circundadas por uma abundante matriz extracelular (MEC) rica em fibras de colágeno dispostas seguindo o eixo mais longo do tendão (Benjamin & Ralphs, 2000).

Dentre todos os tendões o calcanear é um dos mais resistentes que se conhece, mas apesar disto, lesões e rupturas completas ou parciais (injúrias) deste tendão em humanos são bastante comuns (Lesic & Bumbasirevic, 2004), por razões de idade, doenças, trauma ou deformidades congênicas. Ruptura parcial ou completa do tendão calcanear ocorre predominantemente em homens jovens e de meia idade em atividade atlética extenuante (Kälebo *et al.*, 1992).

O reparo tecidual consta de uma série de eventos que se inicia imediatamente após a injúria, contudo o tendão reparado apresenta-se com propriedades estruturais e funcionais inferiores se comparado ao tendão não injuriado (Józsa & Kannus, 1997). Quando o tendão, ou qualquer outro tipo tecidual sofre uma lesão, o corpo inicia um processo de reparo e formação de uma cicatriz que pode ser dividido em fases denominadas inflamatória, proliferativa e de remodelação. Cada fase é caracterizada por eventos estruturais e bioquímicos específicos. A duração dessas fases pode variar conforme a localização e a extensão da injúria ou doença que acomete o tecido (Woo *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004; Midwood *et al.*, 2004; Luo & Chen, 2005; Sharma & Maffulli, 2005). Todas essas fases compreendem uma série de eventos que incluem coagulação sanguínea, inflamação, formação de um tecido de granulação, apoptose de células inflamatórias, neovascularização e síntese de colágeno (Singer & Clark, 1999).

O mecanismo de reparo do tendão lesado é provavelmente mediado pelos fibroblastos residentes, que mantêm um equilíbrio entre a produção e degradação de matriz extracelular. Alguns trabalhos têm mostrado a relação entre os processos de regeneração e a organização dos feixes de colágeno (Mello *et al.*, 1975; Mello & Vidal 2003), outros tem chamado a atenção para o papel de mediadores como os vários fatores de crescimento (Mutsares *et al.*, 1997). Também foi verificado que o óxido nítrico (NO) tem importante papel na cicatrização de tendão (Murrell *et al.*, 1997).

O NO é um radical livre sintetizado a partir de L-Arginina, e está envolvido em muitos processos fisiológicos e patológicos (Moncada & Higgs, 1993; Davis *et al.*, 2001). Sua síntese catalisada por isoformas da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) é estimulada durante os processos inflamatórios (Vane *et al.*, 1994) e de reparo no tendão calcâneo (Lin *et al.*, 2001 a,b). Há evidências que esta molécula atua nas vias de sinalização celular e acelera o reparo tecidual (Luo & Chen, 2005). Tem sido mostrado também que o NO modula a ação de citocinas quimioatraentes que agem na inflamação, incluindo interleucinas e TGF- β , fatores estes que são quimiotáticos para monócitos e neutrófilos (Belenky *et al.*, 1993). Estas células, atraídas à região do reparo, são ativadas e iniciam a produção de TNF- α e interleucina 1, e esses fatores estão implicados no reparo tecidual (Frank *et al.*, 2002).

Apesar dos vários estudos já realizados, faltam informações sobre o efeito benéfico ou tóxico do NO sobre componentes específicos da MEC, bem como sobre a atividade inflamatória durante o processo de cicatrização de tendões. Assim foi feita uma injúria parcial no tendão calcâneo de ratos e observada a resposta do tecido à injúria em três fases distintas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação (Woo *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004; Midwood *et al.*, 2004; Sharma & Maffulli, 2005), pela modulação de NO.

Material e Métodos

Animais e grupos experimentais

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso animal (CEEA/IB/UNICAMP, protocolo nº 1388-1). Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, com livre acesso à água e ração.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (5mg/kg). Após remoção da pele, o tendão calcâneo foi exposto e feita uma incisão parcial transversal a uma distância de 0,5 cm de sua inserção no calcâneo (Murrell *et al.*, 1997). A pele foi em seguida suturada com fio de sutura de nylon, ethilon 5-0, e agulha PC-1. Os animais foram sacrificados, por overdose de anestésicos, com 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. Para investigar o envolvimento de NO no reparo, alguns animais receberam por via oral L-NAME (1mg/mL) (~300 mg/Kg/dia) (SIGMA, St Louis, MO, USA) em seus reservatórios de água de beber como descrito no trabalho de Murrell *et al.*, (1997), quatro dias antes da cirurgia e nos dias posteriores à cirurgia até o dia do sacrifício dos animais. Os ratos controle passaram pela mesma cirurgia e os mesmos tempos, mas não foram tratados com o inibidor. A pata esquerda não lesada de ratos não tratados foi considerada como normal.

Quarenta e oito ratos Wistar machos, de 8-10 semanas e pesando entre 250 e 350 g, foram utilizados para a análise morfológica (n=30) e bioquímica (n=18). Para as análises bioquímicas o tendão foi dividido em região de tensão, região de secção e região de compressão.

Análise Morfológica

Após a dissecação, os tendões calcaneares foram fixados em solução de formalina 4% em tampão Millonig pH 7,4 durante 18 horas em geladeira. Em seguida as peças foram processadas para rotina em parafina (Histosec). Foram realizados cortes longitudinais com 7 μ m de espessura, em micrótomo rotativo (MICROM/HM-315). Para visualização geral do tecido os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) (Kiernam, 1981). Para detecção de proteoglicanos e células inflamatórias foi utilizado Azul de Toluidina (AT) 0,25 % em tampão MacIrvine pH 4,0 (Mello & Vidal, 1980). Alguns cortes foram corados também com Xylidine Ponceau (XP) 2% em ácido acético 0,5%. As observações e documentação foram feitas em microscópio Olympus BX 41 (Olympus Optical, Tóquio, Japão).

Quantificação de mastócitos

O número de mastócitos foi avaliado em lâminas coradas por AT. Dez campos (0,1 mm²) foram contados utilizando a objetiva de x40 (Olympus BX 41), e a média de células contadas por campo foi calculada para cada animal.

Análise Bioquímica

Extração dos componentes da matriz extracelular do tendão

O tendão calcaneare foi retirado e a região que recebeu a incisão foi pesada e tratada separadamente, assim como a região de compressão e a de tensão. Os feixes de fibras foram devidamente dissociados em uma placa de petri mantida em torno de 4° C para diminuir o risco de proteólise. A extração foi realizada em tubo eppendorf, com 25 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4 M contendo EDTA 0,05 M, PMSF 1 mM em tampão acetato

0,05M pH 5,8 (Heinegård & Sommarin, 1987). Para uma extração mais eficiente o material ficou 24 horas sob constante agitação e em banho de gelo. Após este tempo, o material foi submetido à centrifugação em 10000 r.p.m. em um rotor JA-18.1 da Beckman por 30 minutos. O sobrenadante contendo o material extraído em GuHCl foi precipitado para as análises bioquímicas.

Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

As proteínas extraídas foram analisadas em gradiente (4-16%) em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o método de Zingales (1984), com algumas modificações. O sistema tampão foi de acordo com Laemmili (1970), com gel de empacotamento contendo 3,5% de acrilamida. Amostras contendo 50 µL dos diferentes extratos foram precipitadas em solução de 100 µL de tampão acetato de sódio 1,0 M pH 7,4, e 9 volumes de etanol, durante 24 horas à 4° C. Após este tempo as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga Fischer Scientific Model 235 Va 8.000, a 8.000 r.p.m. por 4 minutos. O precipitado obtido foi seco à 37° C e ressuspenso em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1 mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01%. As amostras foram incubadas por 5 minutos em 96° C. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1% em pH 6,8. A corrente elétrica aplicada foi de 30 mA durante 4 horas. Após a corrida o gel foi fixado durante 2 horas em metanol 50%, ácido acético 12%, e em seguida corado por Coomassie Brilliant Blue-R (CBB-R-250) 0,25%, 50% de metanol e 7% de ácido acético. O gel foi descorado utilizando 50% de metanol e 10% ácido acético.

As massas moleculares relativas foram deduzidas por cálculo de regressão linear de marcador de peso molecular (Weber & Osborn, 1969).

Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas dos extratos em GuHCl foram realizadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) (1mg/mL), como padrão. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas em 595 nm.

Dosagem de glicosaminoglicanos

As dosagens de glicosaminoglicanos sulfatados dos extratos em GuHCl foram realizadas utilizando azul de dimetilmetileno (DMMB) (Farndale *et al.*, 1986). Para a curva padrão foram usadas diferentes concentrações de condroitim sulfato (1 mg/mL) e a leitura efetuada em leitor de microplacas em 540 nm.

β -eliminação

Para liberação das cadeias de GAGs da proteína central, amostras da região seccionada dos tendões extraídos em GuHCl, foram precipitadas em acetato-etanol, incubadas durante 19 horas com 0,5 mL de NaOH 0,5 M a 4° C. Em seguida precipitadas em álcool etílico absoluto, lavadas em etanol 80% e a seguir em acetona. O material precipitado contendo as cadeias de GAGs foi suspenso em 5 μ L de água e analisado em gel de agarose-propilendiamino.

Análise dos glicosaminoglicanos (GAGs) em gel de Agarose-PDA

Os GAGs obtidos após o tratamento descrito acima foram suspensos em água, para então serem aplicados em gel de agarose-PDA, como descrito por Dietrich & Dietrich (1976). Como padrões foram aplicados 5 μ L de uma mistura de condroitim sulfato,

dermatam sulfato e heparam sulfato (1 mg/ml). O tampão da cuba de eletroforese foi propileno diamino (PDA) 0,05 M. As condições de corrida foram 100 mA durante cerca de 20 minutos. A seguir os géis foram fixados em brometo de cetiltrimetilamonio (Cetavlon) a 0,1%, corados com Azul de Toluidina a 0,1% em etanol a 50% e ácido acético a 1% durante 5 minutos e descorados em etanol a 50% e ácido acético a 1%.

Análise Estatística

As dosagens e quantificações dos grupos foram comparadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e significância pelo teste de TUKEY, com $p < 0.05$.

Resultados

Morfologia

Observações do tendão normal (Fig. 1 A), corado com HE, mostraram fibras colágenas orientadas na mesma direção do eixo mais longo do tendão, com poucos fibroblastos fusiformes dispersos entre essas fibras. Nos tendões com 7 dias pós-injúria (Fig. 1 B), próximo à região de secção foi visto um intenso processo inflamatório com hiper celularidade. Em 14 (Fig. 1 D) e 21 (Fig. 1 F) dias pós-injúria a inflamação e a celularidade gradualmente diminuíram e a interface entre a matriz recém-formada e o tendão original tornou-se menos distinta, indicando a recuperação do tecido lesionado. No tendão de 7 dias pós-injúria foi visto um tecido de granulação, contendo células arredondadas, com núcleo proeminente e muito citoplasma, além de inúmeras hemácias e vasos sanguíneos. Nesse tecido de granulação foram observados também muitos tipos de células inflamatórias, principalmente células com morfologia semelhante a macrófagos e

células mononucleares. Na análise dos cortes dos animais tratados com L-NAME e corados com HE todos os três tempos, 7 (Fig. 1 C), 14 (Fig. 1 E) e 21 (Fig. 1 G) dias pós-injúria, mostraram-se mais acentuadamente infiltrados por células inflamatórias, e diferiram muito do tendão controle (Fig.1 A). Basicamente não foram observadas diferenças relevantes na fase inicial da inflamação nos tendões de animais não tratados (Fig. 1 B) e tratados (Fig. 1 C) 7 dias pós-injúria. Contudo, notou-se que nos tendões de 14 e 21 dias pós-injúria (Fig. 1 E, G), essas células inflamatórias persistiram e a matriz ainda mostrou um arranjo caótico.

A análise dos cortes em AT, primeiramente de animais não tratados, mostrou no normal (Fig. 2 A), os núcleos de fibroblastos corados e as fibras orientadas de colágeno, que não se coraram. Em 7 dias pós-injúria, em ambos os grupos não tratados e tratados (Fig. 2 B, C) se observou a presença de mastócitos, indicando a ativação da fase inflamatória. Esta fase se mostrou semelhante nos animais não tratados e tratados. A diferença observada ficou por conta da análise dos cortes de 14 (Fig. 2 D, E) e 21 (Fig. 2 F, G) dias pós-injúria, onde se notou a presença constante de mastócitos, mesmo em 21 dias nos animais tratados (Fig. 2 G), o que não foi visto nos animais não tratados (Fig. 2 F). Portanto nos animais tratados houve uma continuidade da inflamação e a não deposição de matriz fibrosa, indicando o início de uma inflamação persistente com acúmulo principalmente de mastócitos. Esses mesmos cortes corados com XP mostraram fibras colágenas orientadas na mesma direção do eixo mais longo do tendão normal (Fig. 3 A). Em ambos os tendões, não tratados e tratados, com 7 dias pós-injúria (Fig. 3 B, C), na região de secção foi visto um intenso processo inflamatório com muitas hemácias, e a desorganização total da matriz colagênica. No grupo não tratado em 14 (Fig. 3 D) e 21 (Fig. 3 F) dias pós-injúria a inflamação gradualmente diminuiu e a interface entre o tendão

original e a nova matriz colagênica depositada tornou-se menos distinta. Do contrário na análise dos cortes dos animais tratados com L-NAME em 14 (Fig. 3 E) e 21 (Fig. 3 G) dias pós-injúria, foi observada que a matriz colagênica se mostrou caoticamente arranjada, indicando a não recuperação do tecido lesado.

Análise de mastócitos

O número de mastócitos foi significativamente maior no grupo de animais tratados com L-NAME, em todos os três tempos observados. Principalmente em 21 dias após a lesão em animais tratados, os mastócitos foram observados não somente na região de reparo, mas no tecido conjuntivo adjacente aderido ao tendão, e também se observou a presença de mastócitos desgranulando em todos os três tempos em animais tratados (Fig. 4).

Bioquímica

Dosagem de proteínas e GAGs

Os valores obtidos nas dosagens de proteínas e GAGs sulfatados, obtidos da região de secção dos tendões de animais não tratados e tratados com L-NAME, estão representados nas figuras 5 e 6 respectivamente. Com relação às proteínas totais não há diferenças significativas (Fig. 5). Uma maior quantidade significativa de GAGs foi observada nos tendões lesados sem tratamento com L-NAME (Fig. 6).

Eletroforese em Gel de SDS-PAGE

Na análise em SDS-PAGE dos componentes da MEC das diferentes regiões de tendão normal e de 7, 14 e 21 dias pós-injúria dos animais não tratados (Fig. 7 A) e tratados

(Fig. 7 B) foi notória a maior quantidade de colágeno no tendão normal comparado aos tendões lesados. Nos animais não tratados se observou uma maior presença de proteínas, com peso molecular entre 67 e 14 kDa, nos tendões de 7 e 14 dias pós-injúria. No tendão com 21 dias pós-injúria observou-se um padrão de bandas eletroforéticas semelhante ao normal. Nos animais tratados com L-NAME (Fig. 7 B), também se notou uma maior presença daquelas mesmas proteínas, contudo, ainda em 21 dias pós-injúria as bandas referentes a essas proteínas se mantiveram aumentadas.

Eletroforese em Gel de Agarose Propileno Diamino

Na região de secção dos tendões lesados dos animais não tratados e tratados com L-NAME, foi possível identificar a presença de dermatan-sulfato (DS), especialmente no tempo de 14 e 21 dias pós-injúria (fig. 8).

Discussão

O reparo tecidual é um complexo processo biológico essencial para que os tecidos lesados recuperem sua funcionalidade. A inflamação tem um importante papel neste processo. Vários fatores afetam este complexo processo atuando favorável ou desfavoravelmente. Diversas macromoléculas presentes na matriz e secretadas pelos fibroblastos residentes influenciam no reparo, dentre estas se podem citar a fibronectina, proteínas matricelulares, elastina e um pequeno radical livre conhecido por NO.

O fibroblasto é o principal tipo celular no reparo de tendão. Essas células são importantes na manutenção de uma adequada concentração de NO no tecido, pois, como visto no estudo de Lin e colaboradores (2001 a, b), somente este tipo celular tem habilidade para expressar todas as três isoformas da enzima NOS durante as fases de reparo do tendão.

Nossos dados morfológicos confirmaram os resultados obtidos em estudos anteriores sobre reparo em tendões (Murrel *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2001 a,b; Mello & Vidal, 2003), e serviram para embasar nossos conhecimentos práticos e teóricos, para analisarmos o efeito do NO sobre o processo de regeneração do tendão. Como se sabe o óxido nítrico é um radical livre que apresenta inúmeras funções biológicas e está envolvido nos processos de regeneração tecidual (Murrel *et al.*, 1997; Sharma & Maffulli, 2005). Nos animais tratados com o inibidor notamos que em algumas áreas as células inflamatórias se acumularam em “clusters” contendo numerosas células, principalmente mastócitos, e mesmo após 21 dias de injúria o animal tratado mostrou um severo e persistente acúmulo de células inflamatórias, como os mastócitos, e não se observou a organização da matriz colagênica. Com a retirada da ação do NO sobre o tecido em recuperação, notou-se que a inflamação tornou-se persistente e ocorreu a permanência das células inflamatórias durante um tempo maior no tendão calcanear, visto que uma das funções desta molécula mensageira é promover a apoptose de macrófagos e outras células inflamatórias (Darmani *et al.*, 2004).

Os mastócitos são células importantes envolvidas em numerosas atividades que vão desde o controle do tônus vascular até a participação no reparo tecidual, onde são capazes de sintetizar NO (Forsythe *et al.*, 2001). Durante o reparo tecidual, essas células apresentam habilidade para regular a ativação, migração e proliferação de células inflamatórias, a formação de tecido de granulação, angiogênese e proliferação de fibroblastos (Maurer *et al.*, 2003). Alguns estudos mostraram que a inibição da síntese de NO eleva o número de mastócitos, assim como sua desgranulação e liberação de histamina, que aumenta a permeabilidade micro-vascular e a infiltração leucocitária, indicando que a ausência de NO endógeno potencializa a atividade dos mastócitos (Masini *et al.*, 1991; Gaboury *et al.*,

1996, Amadeu & Costa, 2006). Esses achados podem explicar o aumento no número de mastócitos bem como sua desgranulação observada no grupo tratado com L-NAME, principalmente em 21 dias após a lesão onde se notou a permanência de inflamação. A contribuição significativa dos mastócitos para o dano tecidual e propagação da resposta inflamatória, torna vital o controle da função dos mastócitos em muitas condições patológicas (Forsythe *et al.*, 2001).

Nossos dados morfológicos corroboram outros estudos que afirmam que o bloqueio da produção de NO por inibidores como o L-NAME, traz prejuízos à recuperação do tecido lesado por inibir os efeitos biológicos benéficos do NO como a angiogênese, a vasodilatação, o aumento na síntese e deposição de colágeno e outras moléculas de matriz, estimulação da proliferação celular e apoptose de células inflamatórias (Szomor *et al.*, 2006).

Na análise das proteínas em SDS-PAGE, foi observada uma maior quantidade de colágeno tipo I, no tendão normal comparado aos tendões lesionados de animais não tratados e tratados com L-NAME, embora durante o processo de reparo haja um aumento na síntese de colágeno e outras proteínas não colagênicas (Woo *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004). Além disso, vale ressaltar que durante o reparo existe uma grande atividade de colagenases, que digerem moléculas de colágeno de fibras e fibrilas fragmentadas durante a secção. Entretanto, pode-se notar que aparentemente há menos quantidade de colágeno em 21 dias pós-injúria em ambos os casos (fase de remodelação) se comparado ao tendão normal. Esse fato indica que a fase de remodelação é uma fase muito longa, onde as fibras de colágeno no início apresentam-se em menor número e com diâmetro inferior às fibras de um tendão não lesado (Mathew & Moore, 1991). Nessa fase de remodelação também a síntese de novos componentes da MEC retorna ao seu nível normal (Sharma & Maffulli,

2005) e isso explica o padrão eletroforético das proteínas não colagênicas semelhante no tendão 21 dias pós-injúria e no normal, embora no tendão de 21 dias dos animais tratados a presença daquelas proteínas ainda seja mais acentuada. Com relação às proteínas não colagênicas, com massa molecular entre 67 e 14 kDa, notou-se a presença mais marcante dessas proteínas nos tendões lesados nas fases inflamatória (7 dias) e proliferativa (14 dias) de animais tratados e não tratados, e ainda notou-se a presença mais abundante dessas proteínas no tendão de 21 dias pós-injúria do animal tratado, fato indicativo da progressão da inflamação. Dentre essas proteínas têm-se um grupo chamado de proteínas matricelulares. Esse grupo inclui galectinas, osteopontina, SPARC (ou osteonectina ou BM-40), tenascina, trombospondina, vitronectina entre outras (Bornstein, 2001; Bradshaw & Sage, 2001; Denhardt *et al.*, 2001 a, b; Bornstein & Sage, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003). Esse grupo de proteínas matricelulares não contribui diretamente para a formação dos elementos estruturais em vertebrados, mas atua na modulação e interação célula-matriz e na função celular (Bornstein & Sage, 2002). *In vitro*, as proteínas matricelulares regulam a adesão, migração e sobrevivência celular, a atividade do fator NF- κ B, e a síntese de NO (Giachelli, 1999). Essas proteínas são expressas em altos níveis durante o desenvolvimento, mantêm-se em nível basal nos tecidos adultos e voltam a ser superexpressas nas regiões de remodelação tecidual e inflamação (Midwood *et al.*, 2004). A dosagem de proteínas concorda com o descrito acima e embora não haja diferenças significativas entre 7, 14 e 21 dias pós-injúria, comparando os animais tratados e não tratados, foi visto uma tendência a uma maior quantidade nos animais tratados com L-NAME, indicando que o tendão exibe uma inflamação persistente e talvez tente compensar a ausência de NO aumentando a expressão dessas proteínas.

Além de colágeno e outras glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos têm sido descritos em tendões, tanto em região de compressão como de tensão. Nos tendões calcanear e flexor digital profundo de ratos foram observadas as presenças de condroitim-sulfato (CS) e dermatan-sulfato (DS) em regiões que receberam compressão e apenas DS nas regiões de tensão (Covizzi *et al.*, 2001). Nos tendões seccionados observou-se a presença de DS e também foi notado um aumento na quantidade de GAGs nos animais não tratados, condizente com a recuperação do tecido lesado e ação benéfica do NO, onde durante as fases de recuperação há aumento na quantidade de fibronectina, glicosaminoglicanos, água, colágeno e outras macromoléculas, que conjuntamente darão estabilidade à nova matriz formada (Jozsa & Kannus, 1997, Woo *et al.*, 1999).

Com esses dados morfológicos e bioquímicos, pudemos confirmar que realmente o NO é benéfico para o tendão calcanear lesado em recuperação. É evidente que mais testes são necessários, pois tecidos diferentes se mostram responsivos ou não ao NO. Isto se deve principalmente ao fato que o NO é uma molécula com efeitos pleiotrópicos e antagônicos, ou seja, ora apresenta-se benéfica, ora se porta como um agente citotóxico.

Legendas das Figuras

Figura 1: Microscopia de luz do tendão calcâneo corado com HE. Comparação do tendão normal (A) e o processo reparativo em tendões de animais não tratados (B, D, F) e tratados (C, E, G) com o inibidor L-NAME em 7 (B, C), 14 (D, E) e 21 (F, G) dias pós-injúria. O tendão lesado, no tempo inicial, apresenta grande celularidade. O processo inflamatório pode ser visto com maior intensidade após 7 dias de lesão. Em 21 dias pós-injúria nos animais não tratados a inflamação é menos evidente e a nova matriz recém-sintetizada aparece mais organizada, ao passo que nos animais tratados a inflamação se continua nos períodos seguintes. Barra: 50 μ m.

Figura 2: Microscopia de luz do tendão calcâneo corado com AT. Comparação do tendão normal (A) e o processo reparativo em tendões de animais não tratados (B, D, F) e tratados (C, E, G) com o inibidor L-NAME em 7 (B,C), 14 (D,E) e 21 (F,G) dias pós-injúria. Observou-se a continuidade da inflamação nos tendões de animais tratados com o inibidor. No tempo de 21 dias pós-injúria do animal tratado (G), notou-se a manutenção dos mastócitos e não organização da matriz, diferindo do tempo de 21 dias do animal não tratado (E), que já se encontra na fase de remodelação. Barra: 50 μ m. Detalhe em G: barra 10 μ m.

Figura 3: Microscopia de luz do tendão calcâneo corado com XP. Comparação do tendão controle normal (A) e o processo reparativo em tendões de animais não tratados (B, D, F) e tratados (C, E, G) com o inibidor em 7 (B, C), 14 (D, E) e 21 (F, G) dias pós-injúria. Um maior alinhamento e maior compactação dos feixes de colágeno podem ser visto no tendão de animais não tratados em 21 dias comparados ao tendão de 14 dias pós-injúria, embora inferior ao normal. Em animais tratados, mesmo em 21 dias pós-injúria a matriz colagênica aparece desorganizada e a inflamação persiste. Barra: 50 μ m.

Figura 4: Mastócitos/campo em animais não tratados e tratados com L-NAME em 7, 14 e 21 dias após a lesão. * : $p < 0,05$, comparando animais tratados e não tratados.

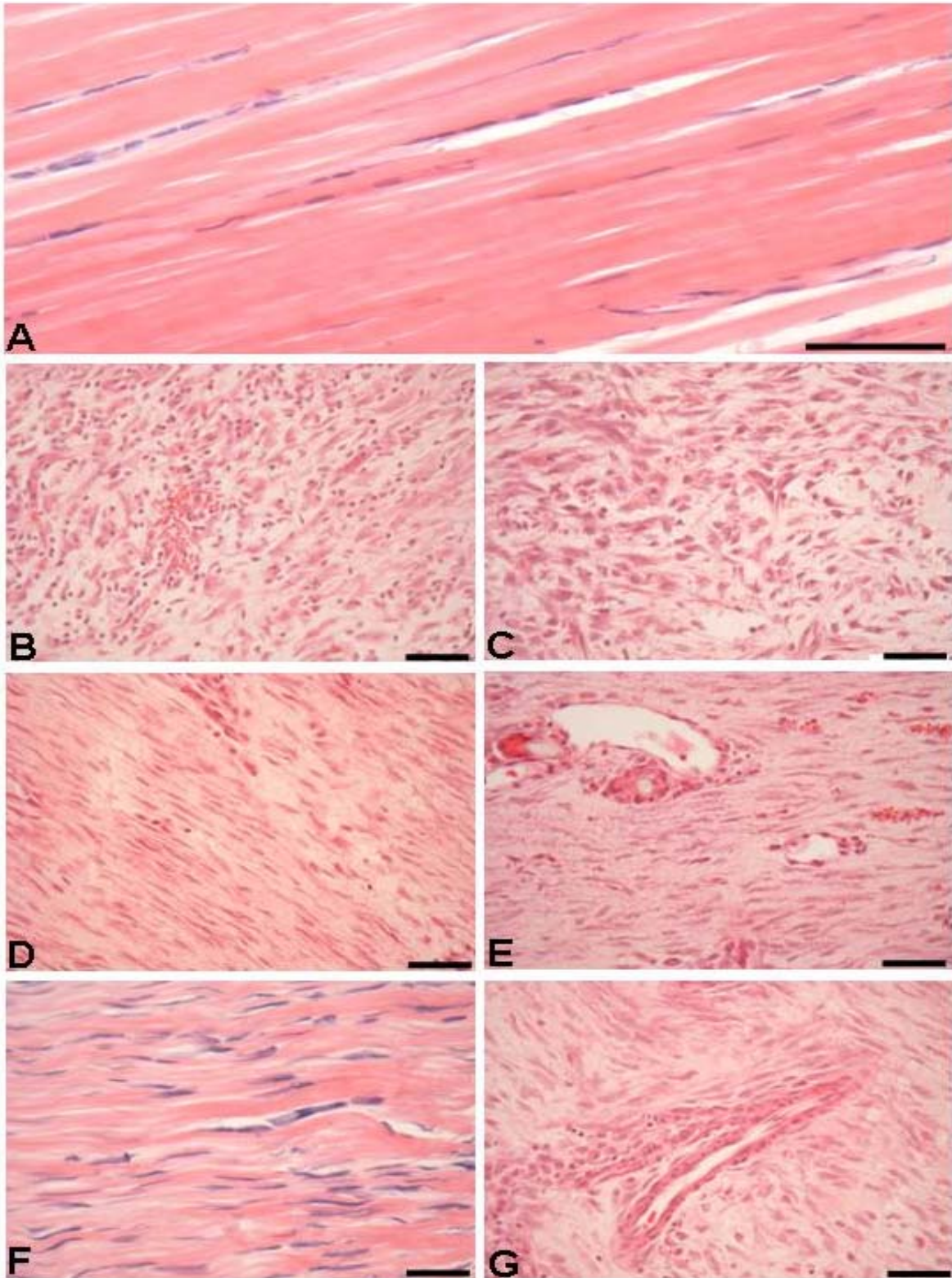
Figura 5: Dosagem de proteínas totais da região de secção de tendões não tratados e tratados com L-NAME em 7, 14 e 21 dias pós-injúria.

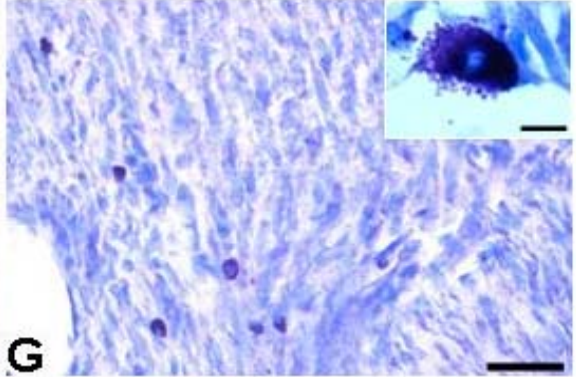
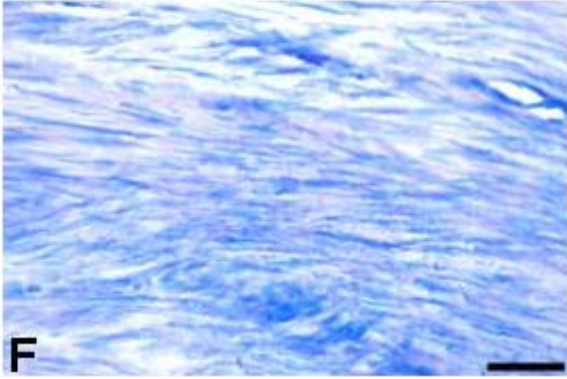
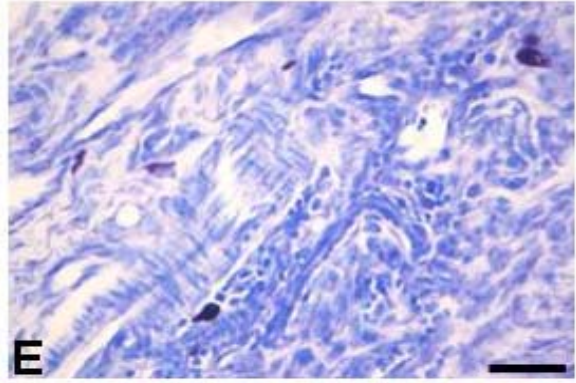
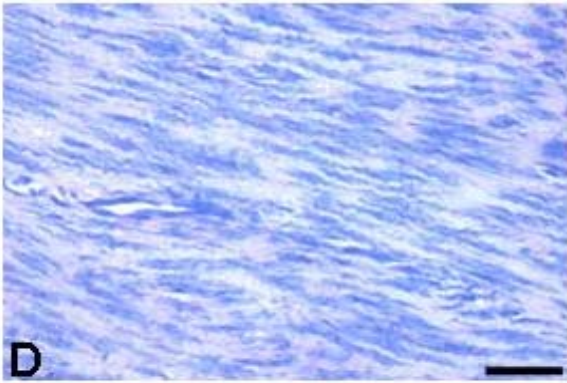
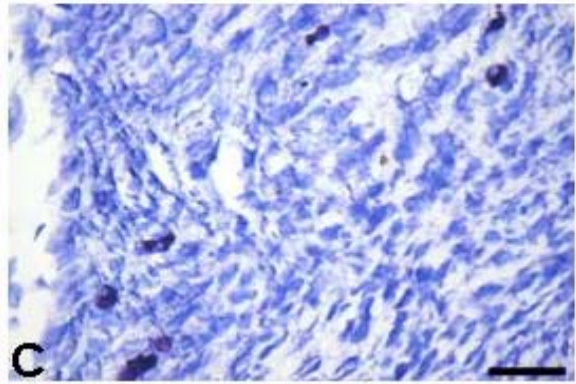
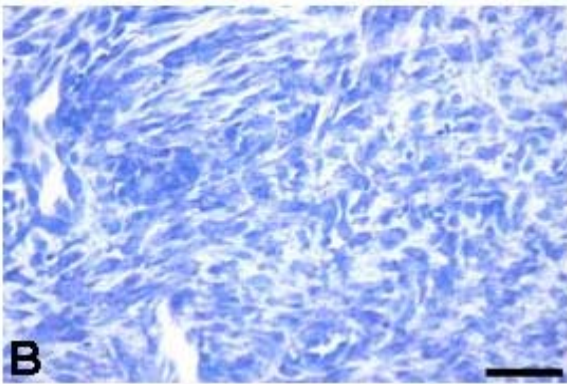
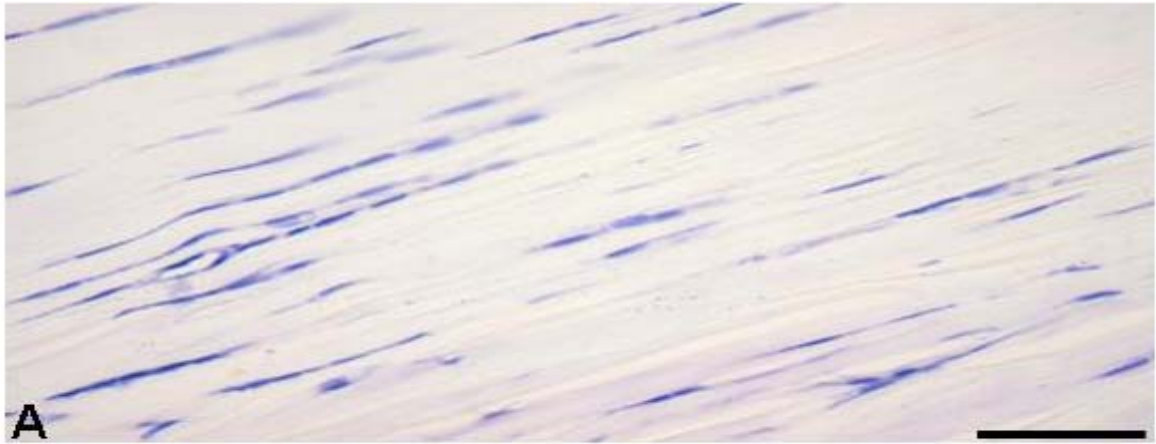
Figura 6: Concentração de GAGs da região de secção dos tendões não tratados e tratados com o inibidor de NOS em 7, 14 e 21 dias pós-injúria. Comparando-se os grupos, os tendões não tratados apresentaram uma maior quantidade de GAGs em relação aos tratados. (* : $p < 0,05$)

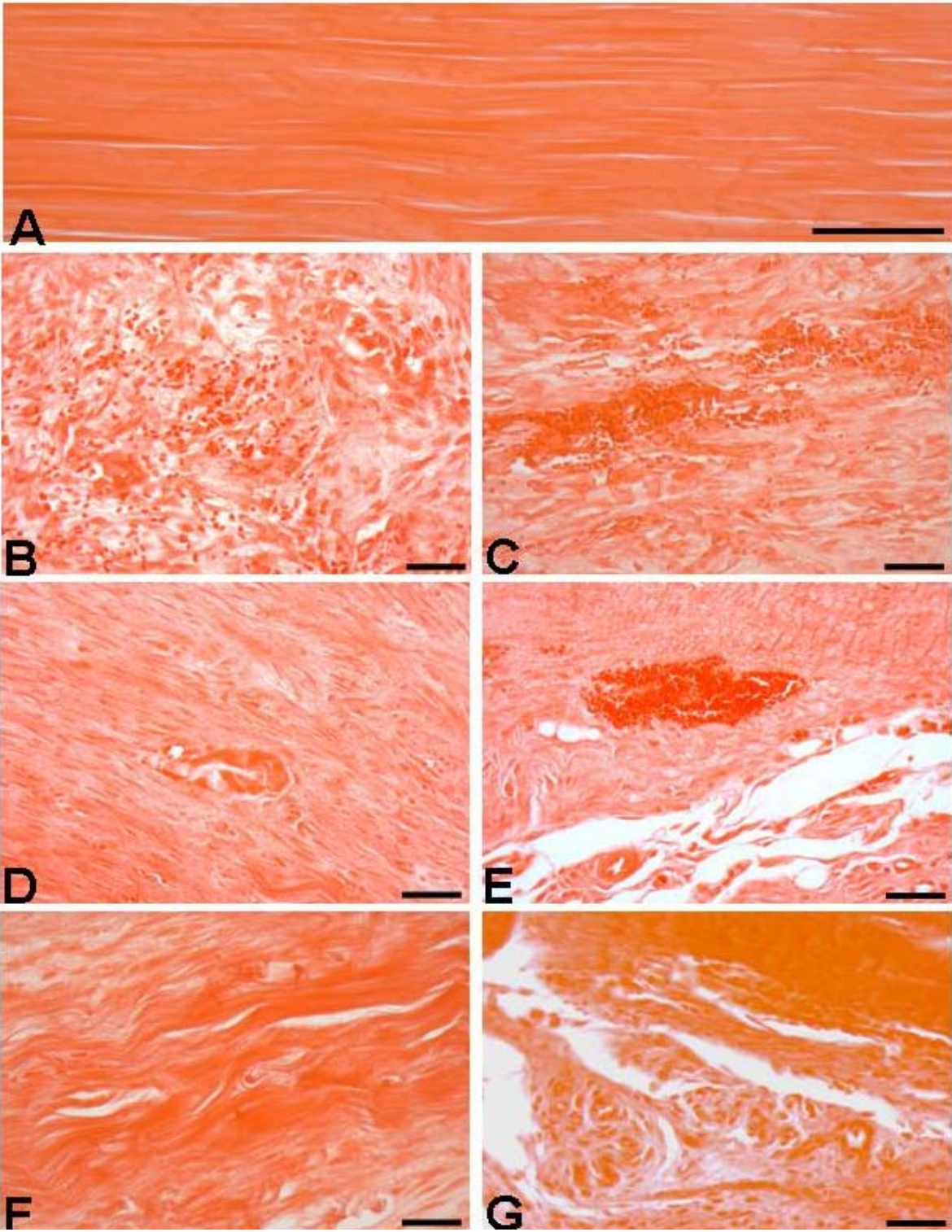
Figura 7: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida de tendão normal e de tendões pós-injúria de animais não tratados (**A**) e tratados (**B**) com L-NAME. Em **A** e **B** pode-se notar a maior quantidade de colágeno no tendão normal em relação aos tendões seccionados (seta). Ainda em **A** se observou a maior presença de proteínas não colagênicas, com peso molecular entre 67 e 14 kDa, nos tendões 7 e 14 dias pós-injúria, em 21 dias houve um retorno a níveis parecidos com os do tendão normal. Em **B** se notou a maior quantidade destas mesmas proteínas em todos os três tempos pós-injúria, e em 21 dias a presença dessas proteínas se manteve exacerbada, um indicativo da progressão da inflamação. **LMW**- Marcador de baixo peso molecular. **Col**- padrão de colágeno tipo I. **c, s, t**: região de compressão, secção e tensão, respectivamente.

Figura 8: Eletroforese em gel de Agarose-PDA de tendões não tratados e tratados com o inibidor de NOS em 7, 14 e 21 dias pós-injúria. Todos os grupos apresentaram DS, principalmente 14 e 21 dias pós-injúria.

- indica animal sem tratamento e + indica animal tratado com L-NAME.







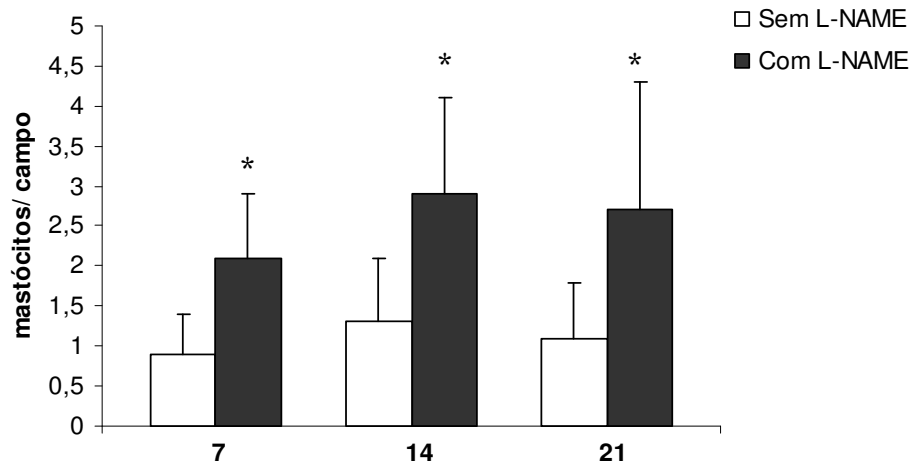


Fig. 4

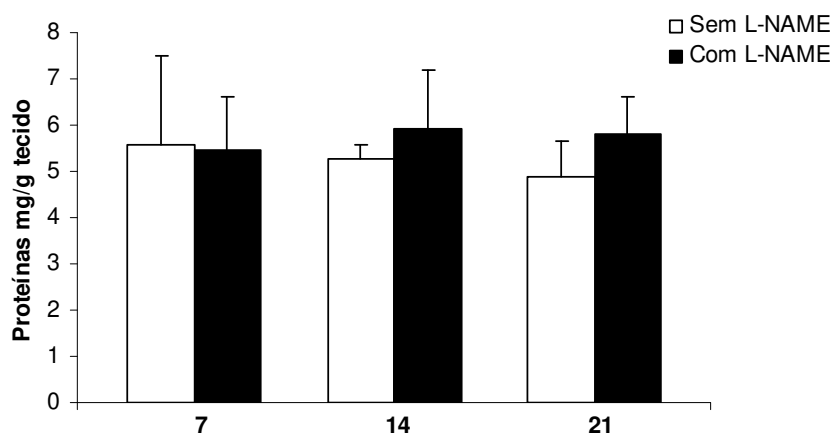


Fig. 5

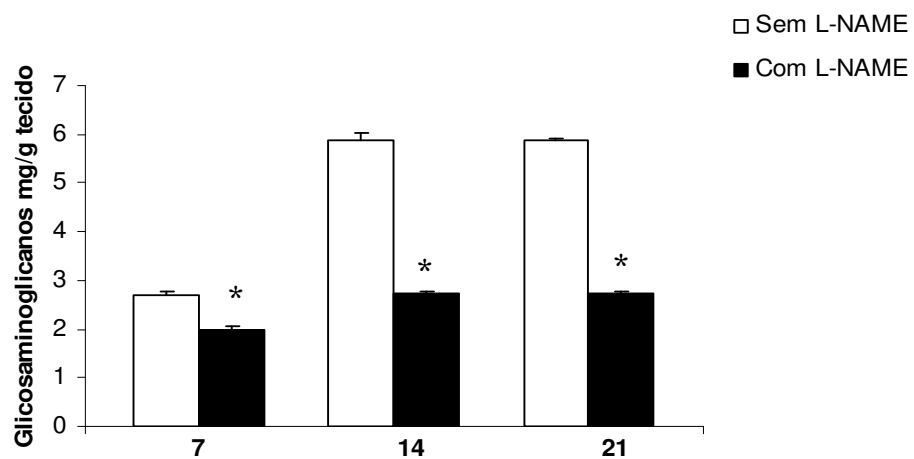
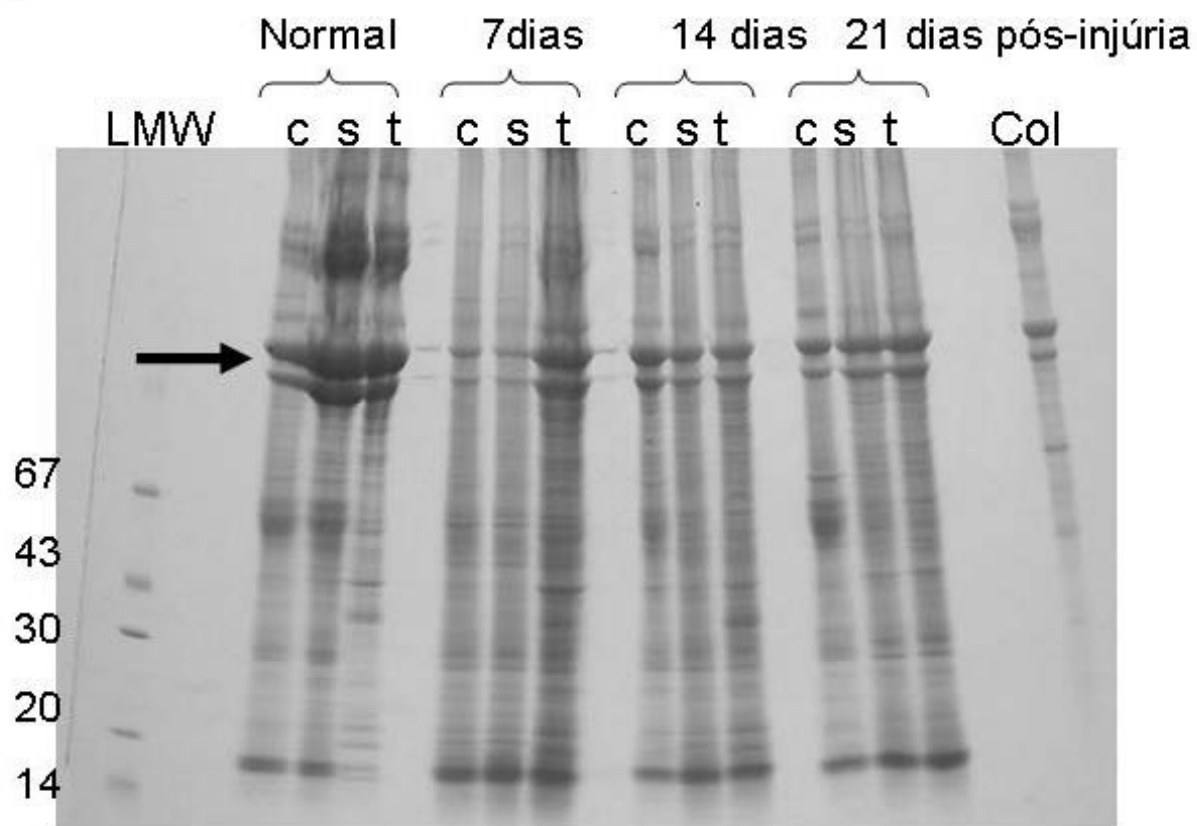
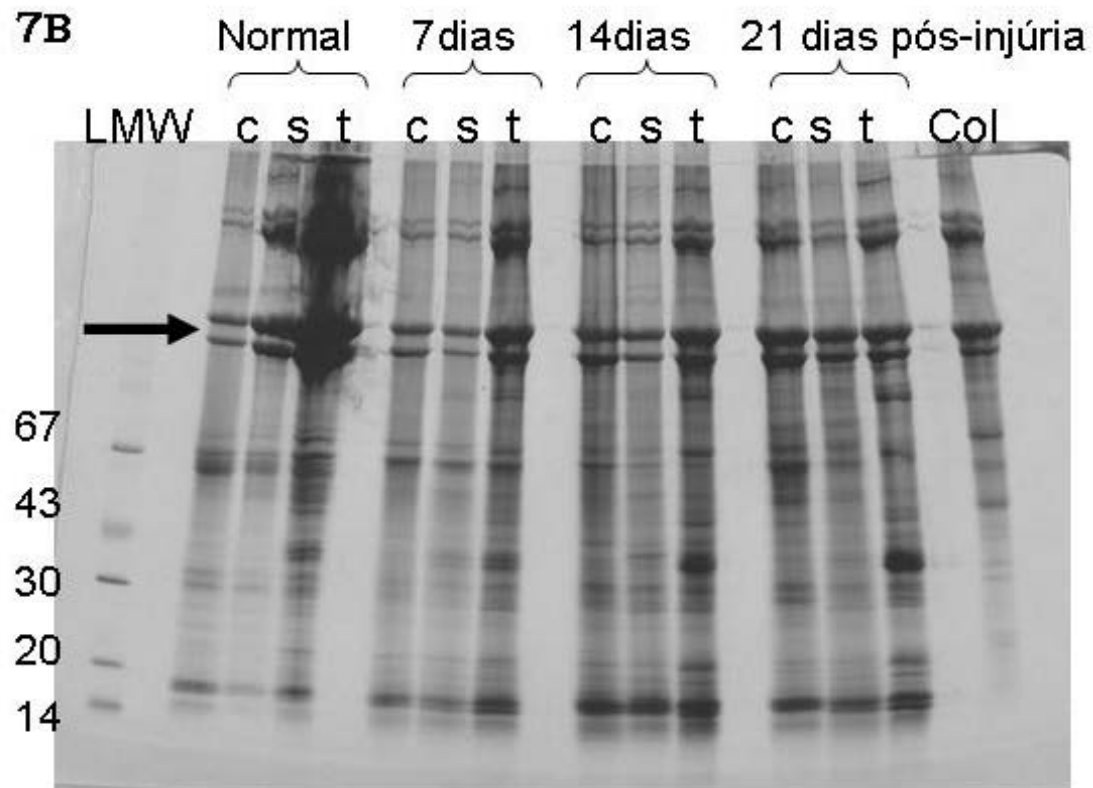


Fig. 6

7A**7B**

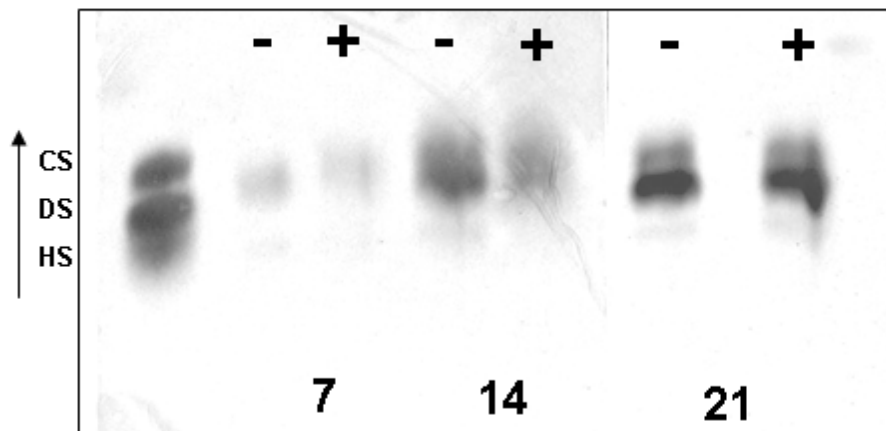


Fig. 8

Referências

AMADEU, T.P.; COSTA, A.M.J. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *Cutan Pathol.*, v.33, p. 465-73. 2006.

BENJAMIM, M.; RALPHS, J.R. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol.*, v.196, p 85-130. 2000.

BELENKI, S.N.; ROBBINS, R.A.; RUBISTEIN, I. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J Leukoc Biol.*, v.53, p. 498-503. 1993.

BORNSTEIN, P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest.*, v.107, p. 929-934. 2001.

BORNSTEIN, P.; SAGE, H.E. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.*, v.14, p. 608-616. 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein. *Anal Biochem.*, v.72. p. 248-254. 1976.

BRADSHAW, A.D.; SAGE, E.H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest.*, v.107, p. 1049-1054. 2001.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; CHIQUET, M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.*, v.200, p.,488-499. 2003.

COVIZI, D.Z.; FELISBINO, S.L.; GOMES, L.; PIMENTEL, E.R.; CARVALHO, H.F. Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell*, v.33, p. 483-490. 2001.

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.*, v.13, p. 157-164. 2004.

DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.41, p. 203-236. 2001.

DENHARDT, D.T.; GIACHELLI, C.M.; RITTLING, S.R. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.41, p.723-749. 2001 a.

DENHARDT, D.T.; NODA, M.; O'REGAN, A.W.; PAVLIN, D.; BERMAN, J.S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* v.107, p. 1055-1061. 2001 b.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, v.70, p. 645-647. 1976.

FARNDALE, R.W., BUTLE, D.J.; BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.883, p. 173-177. 1986.

FORSYTHE, P.; GILCHRIST, M.; KULKA, M.; BEFUS, A.D. Mast cells and nitric oxide: control of production, mechanisms of response. *Int Immunopharmacol.* v.1, p. 1525-1541. 2001.

FRANK, S.; KAMPFER, H.; WETZLER, C.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int.*, v.61, p. 882-888. 2002.

GABOURY, J.P.; NIU, X.F.; KUBES, P. Nitric oxide inhibits numerous features of mast cell-induced inflammation. *Circulation*, v.93, p. 318-261996

GIACHELLI, C.M. Osteopontin In *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. Kreis, T. and Vale, R. (eds), p.457-459. 2^a ed., Sambrook & Toozee Publishing Partnership. 1999.

KÄLEBO, P.; ALLENMARK, C.; PETERSON, L.; SWÄRD, L. Diagnostic value of ultrasonography in partial ruptures of the Achilles tendon. *Am J. Sports Med.*, v.20, p. 378-381. 1992.

KIERNAN, J.A. *Histological and Histochemical Methods. Theory and practice.* 3^a ed., Pergamo Press, p. 81-82. 1981.

HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y. Proteoglycans: an overview. *Methods in Enzymol.* v.144, p. 305-372. 1987.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. *Human tendons: Anatomy, Physiology and Pathology.* Human Kinetics, 574pp. 1997.

LAEMMLI, V.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage Ty. *Nature.* v.227 ,p. 680-685. 1970.

LESIC, A.; BUMBASIREVIC, M. Disorders of the Achilles tendon. *Cur Orthop.*, v.18, p. 63-75. 2004.

LIN, J-H.; WANG, M-X.; WEI, A.; ZHU, W.; DIWAN, A.D.; MURRELL, G.A.C. Temporal expression of nitric oxide synthase isoforms in healing Achilles tendon. *J Orthop Res.*, v.19, p. 139-142. 2001 a.

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

LIN, T.W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L.J. Biomechanics of tendon injury and repair. *J. Biomechanics,* v.37, p. 865-877. 2004.

LUO, J.; CHEN, A.F. Nitric oxide, a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin.*, v.26, p. 256-264.2005.

MASINI, E.; SALVEMINI, D.; PISTELLI, A.; MANNAIONI, P.F.; VANE, J.R. Rat mast cells synthesize a nitric oxide like-factor which modulates the release of histamine. *Agents Actions,* v.33, p. 61-63. 1991.

MAURER, M.; THEOHARIDES, T.; GRANSTEIN, R.D.; BISCHOFF, S.C.; BIENENSTOCK, J.; HENZ, B.; KOVANEN, P.; PILIPONSKY, A.M.; KAMBE, N.;

VLIAGOFTIS, H.; LEVI-SCHAFFER, F.; METZ, M.; MIYACHI, Y.; BEFUS, D.; FORSYTHE, P.; KITAMURA, Y.; GALLI, S. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol.*, v.12, p. 886-889. 2003.

MATHEW, C.A.; MOORE, M.J. Collagen fibril morphometry in transacted rat extensor tendons. *J. Anat.*, v.175, p. 263-268. 1991.

MELLO, M.L.; GODO, C.; VIDAL, B.C.; ABUJADI, J.M. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. *Ann. Histochem.*, v.20, p. 145-152. 1975.

MELLO, M. L. S.; VIDAL B. C. Práticas de Biologia Celular. São Paulo, Edgar Blücher, Campinas, SP, Funcamp. p. 71. 1980.

MELLO, M. L. S.; VIDAL B. C. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement newly synthesized collagen fibers. *Cell Molec. Biol.*, v.49, p. 579-585. 2003.

MIDWOOD, K.S.; WILLIAMS, L.V.; SCHWARZBAUER, J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, p. 1031-1037. 2004.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J. Med.*, v.329, p. 2001-2012. 1993.

MURRELL, G.A.C.; SZABO, C.; HANNAFIN, J.A.; JANG, D.; DENG, X.H.; MURRELL, D.F.; WARREN, R.F. Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflamm. Res.*, v.46, p. 19-27. 1997.

MUTSARES, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G.J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.29, p. 5-17. 1997.

RABINOVICH, G.A.; RUBISTEIN, N.; TOSCANO, M.A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1572, p. 274-284. 2002.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: Healing and Repair. *J. Bone Joint Surg.*, v.87, p. 187-202. 2005.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. *N Engl. J. Med.*, v.341, p.738-746. 1999.

SZOMOR, Z.L.; APPELYARD, R.C.; MURRELL, G.A.C. Overexpression of nitric oxide synthases in tendon overuse. *J Orthop Res.*, v.24, p. 80-86. 2006.

VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, p. 2046-2050. 1994.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol Chem.*, v. 244, p. 4406-4412. 1969.

WOO, S. L-Y.; HILDEBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A.; PAPAGEORGIOU, C.D.; WANG, J.H-C. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Orthop Tissue Engineer.*, v.367S, p. S312-S323. 1999.

ZINGALES, B. Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Genes and Antigens of Parasites* (ed. Morel, CM) Fiocruz, Rio de Janeiro, 1984

CONCLUSÕES

Analisando os resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir, que a inibição sistêmica da enzima NOS, pelo inibidor L-NAME, diminui a resposta à lesão em tendão calcâneo de ratos, em todos os três diferentes tempos de recuperação observados. O NO tem um papel importante na síntese de colágeno e organização da MEC neste modelo de lesão em tendão e a sua inibição do organismo trouxe prejuízos à recuperação do tendão lesado. Desta forma, a despeito do papel dúbio que o NO pode ter, hora atuando como um agente protetivo, hora como um agente tóxico, neste modelo de lesão em tendão calcâneo de ratos podemos afirmar que o NO é essencial para que o tecido consiga se recuperar.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada **“ESTUDO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO TENDÃO CALCANEAR APÓS TRANSECÇÃO PARCIAL, COM E SEM INIBIDOR DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE”**.

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

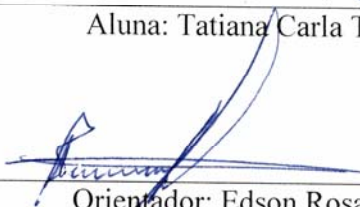
() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1388-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



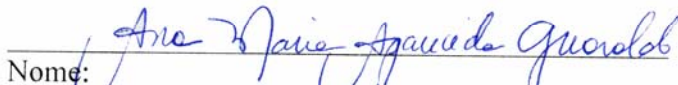
Aluna: Tatiana Carla Tomiosso



Orientador: Edson Rosa Pimentel

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome: 

Função:
 Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
 Presidente
 Comissão de Ética na Experimentação Animal
 CEEA/IB - UNICAMP