

Hernandes Faustino de Carvalho n.º 253 n.

Estrutura e composição de um tendão sujeito a forças de compressão

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas para obtenção do
título de Doutor em Ciências na
área de Bioquímica

Este exemplar corresponde à relação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Hernandes Faustino
de Carvalho.
e aprovada pela Comissão Julgadora. 1509.93

Orientador: Prof. Dr.  Vidal n.

Universidade Estadual de Campinas
Campinas
1993

Aos meus pais Emanuel e Teresa,
por toda a atenção filial que o tipo
de trabalho que escolhi lhes tira.

... estudara um pouco, entre as partes da filosofia, a lógica, e entre as matemáticas, a análise dos géometras e a álgebra, três artes ou ciências que pareciam dever contribuir alguma coisa para o meu propósito. Mas, ao examiná-las, repare que, para a lógica, os seus silogismos e a maior parte das suas outras instruções (como a dialética a respeito da arte de argumentar, ou a dos Tópicos, a respeito da arte de desenvolver lugares comuns) serviam mais para explicar a outrém as coisas que se sabem, ou mesmo, como a arte de Lulo, para falar sem critério daquilo que se ignora, do que para aprender. E ainda que ela contenha efetivamente numerosos preceitos muito verdadeiros e bons (como as regras do silogismo, o preceito de ir sempre do mais conhecido ao menos conhecido, de dividir bem os problemas antes de os examinar ou de os expor etc), encontram-se, porém, com eles misturados muito outros que são nocivos ou inúteis, e é quase tão difícil separá-los como tirar uma Diana ou uma Minerva de um bloco de mármore ainda não trabalhado. Depois, quanto à análise dos antigos géometras e à álgebra dos modernos, além de se aplicarem apenas a matérias muito abstratas e parecerem de pouca utilidade, a primeira está sempre tão ligada à consideração das figuras que não pode exercitar o entendimento sem fatigar muito a imaginação (os géometras gregos, considerando apenas as próprias linhas em vez de raciocinarem com os símbolos algébricos que a representavam, eram obrigados a raciocinar diretamente sobre as figuras e, por consequência, a aplicar continuamente a imaginação); e, na última está-se de tal maneira sujeito a certas regras e certos algarismos que se faz dela uma arte confusa e obscura que embaraça o espírito, em vez de ser uma ciência que o cultive. O que me levou a pensar que era necessário procurar um outro método que, compreendendo as vantagens desses três, estivesse isento dos seus defeitos.

René Descartes

O Discurso do Método

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo exemplo de iniciativa e de vivacidade, pelos ensinamentos constantes, pela paciência na discussão dos métodos experimentais e dos resultados. Em especial pela oportunidade e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, pela participação no exame de qualificação, pelo auxílio durante o experimento de ultracentrifugação e por fotografar os géis de eletroforese e alguns gráficos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e à Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva pela participação no exame de qualificação e pelas sugestões ao manuscrito inicial e pela participação na banca examinadora de Tese.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Maria Alice Cruz-Höffling, pelas facilidades obtidas, assim como às técnicas Sra. Antonia Maria Ferreira Lima e Adriane Cristina Sarti Sprogis, pela confecção dos cortes ultra-finos e pela operação do microscópio eletrônico de varredura, respectivamente.

Ao Prof. Dr. Fernando Gallembeck, pelas facilidades obtidas para o uso do microscópio eletrônico de varredura.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu, nas pessoas da coordenadora Dra. Elisa Aparecida Gregório e da Profa. Irani Quagio-Grassiotto pelas facilidades obtidas no uso do microscópio eletrônico de transmissão, e à técnica Maria Helena Moreno pelo auxílio junto ao microscópio, pela coloração de alguns dos cortes ultra-finos e pela revelação dos filmes.

Ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Ferraz de Carvalho pelas facilidades obtidas junto aos laboratórios do Departamento de Anatomia do ICB da USP e ao técnico A. Bolleta pela secagem do material ao ponto crítico e pelo "sputtering" das amostras.

Ao Prof. Dr. Paulo A.S. Mourão, pela atenção sempre dispensada e pelas dicas para análise dos glicosaminoglicanos.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pela atenção sempre dispensada aos problemas encontrados durante os experimentos bioquímicos, pela colaboração fundamental na implantação do sistema de preparo de géis de poliacrilamida em gradientes de concentração e pela amizade.

Ao Prof. Hiroshi Aoyama, pelo empréstimo do coletor de amostras e do sistema para preparo do gradiente de eluição, tão necessários ao desenvolvimento deste trabalho e pelo exemplo de desapego aos instrumentos e de confiança e, principalmente, pela amizade.

À Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles, pelo uso constante da microcentrífuga e pelas dicas junto ao curso de Pós-Graduação e aos experimentos bioquímicos realizados.

Ao Laboratório de Química de Proteínas do Departamento de Bioquímica, nas pessoas dos Prof. Dr. Sérgio Marangoni e Dr. Benedito Oliveira, pelas facilidades obtidas para as análises de aminoácidos e do Prof. Edmir R. Reis, pela realização dos experimentos.

À Profa. Denise Vaz de Macedo, pela amizade e companheirismo durante o Curso de Pós-Graduação e pelo empréstimo do circulador de água, necessário à realização da cromatografia de troca iônica do colágeno.

Ao Prof. Dr. Michael Benjamin, da Universidade de Cardiff, pelos comentários a respeito das estruturas fibrocartilaginosas observadas nos tendões e pela cordialidade no envio de separatas.

Ao Prof. José Lino Neto, pelo companheirismo constante, auxílio na inclusão de material para a microscopia eletrônica de transmissão e dicas no preparo dos diapositivos e reprodução das pranchas de micrografias.

Ao amigo Marcelo Chiarella, pelo montagem e instalação do computador utilizado neste trabalho e pelos ensinamentos em editoração eletrônica, sem os quais esta tese não teria adquirido este formato.

À amiga Nadja Cristina de Souza Pinto, pelas tentativas, mesmo que frustradas, de cultivo *in vitro*, de fragmentos das duas regiões do tendão.

Ao amigo Roberval C.S. Ribeiro, atualmente no Department of Life Sciences da Universidade de Nottingham, pelo envio de material bibliográfico não disponível no Brasil.

À Sra. Luiz Poghetti Burghi e ao Sr Mário Bianchi, pelas inclusões e cortes de parte do material aqui empregado e pelos conselhos técnicos sempre tão valiosos.

Aos Departamentos de Biologia Celular e de Bioquímica, aos seus professores e funcionários, sempre tão dispostos a colaborar e cujo auxílio foi sempre fundamental em todas as etapas deste trabalho.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP) da UNICAMP, pelos auxílios 352/91, 543/92, 959/92 e 097/93, sem os quais a realização deste trabalho estaria comprometida.

Abreviaturas

EDTA - **Ácido etilenodiaminotetraacético**

Gu-HCl - **Guanidina-HCl**

PAS - **Método do ácido periódico-Reativo de Schiff**

PBS - **Salina tamponada com fosfato**

PFG- β - **Fator de crescimento semelhante à progesterona**

PMSF - **Fluoreto de fenilmetilsulfonil**

PTC - **Feniltiocarbamil**

SDS - **Dodecil sulfato de sódio**

SDS-PAGE - **Eletroforese em gel de poliacrilamina em presença de SDS**

Tris - **Tris(hidroxiamino)etilmetano**

TGF-2 α - **Fator de crescimento tumoral**

Conteúdo

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	4
A supra-estrutura dos tendões	5
Os diferentes níveis da organização fibrilar	6
As modificações pós-traducionais do colágeno.....	9
Os proteoglicanos dos tendões.....	10
Modificações estruturais e fisiológicas dos tendões - Os tendões sujeitos a forças de compressão	13
Objetivos	16
Materiais e métodos	17
Obtenção do material	17
Análises morfológicas.....	17
Fixação e obtenção de cortes histológicos.....	17
Testes topoquímicos	17
Anisotropias ópticas	18
Microscopia Eletrônica de Transmissão	18
Microscopia Eletrônica de Varredura.....	18
Análises Bioquímicas.....	19
Determinação do conteúdo em água	19
Caracterização dos proteoglicanos.....	19
Extração.....	19
Quantificação de glicosaminoglicanos	19
Cromatografia de troca aniônica – DEAE-celulose	20
Eletroforese em gel de agarose-acrilamida.....	20
Filtração em gel de Sepharose CL4B	20
Ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο.....	20
Caracterização do material colagênico	21
Extração e purificação de colágenos.....	21
Cromatografia de troca catiônica - CM-celulose.....	21
Procedimento de eletroeluição das cadeias de colágeno I.....	21
Análise de aminoácidos	22
Resultados	23
Aspectos Anatômicos	23
Aspectos Histológicos.....	24
Histoquímica	27
Anisotropias Ópticas	27
Anisotropias do Material Corado.....	30

Aspectos da Organização ao Nível Ultraestrutural.....	32.
Aspectos Ultraestruturais dos Proteoglicanos	
Revelados pela Fixação em Presença de Vermelho de Rutênio	37.
Aspectos Ultraestruturais de Componentes Associados ao Sistema Elástico	44.
Aspectos de Morte Celular e de Degeneração da Matriz Extracelular	44.
Aspectos Bioquímicos.....	44.
Conteúdo em água e de ácido urônico.....	44.
Filtração em gel de Sepharose CL4B	47.
Cromatografia em DEAE-celulose	47.
Ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio.....	47.
Extração e caracterização de colágenos.....	49.
Características Bioquímicas do Colágeno Tipo I	54.
Composição em Aminoácidos do Colágeno I	54.
A Análise de Aminoácidos do Material Colagênico Distinto do Colágeno I.....	54.
Discussão	62
Considerações Gerais Sobre os Tendões Sujeitos a Forças de Compressão	62.
Aspectos da Organização Macromolecular e da Estrutura em "Crimp"	64.
Os Tipos Celulares da Região de Compressão	65.
A Presença de Componentes Associados ao Sistema Elástico	67.
Os Componentes Proteoglicânicos e sua Participação na Fisiologia do Tendão	68.
Características Ultraestruturais e Bioquímicas dos Componentes Colagênicos	72.
Conclusões.....	76
Referências.....	79

Resumo

O tendão do músculo plantaris longus de da rã-touro (*Rana catesbeiana*) está sujeito a forças de compressão, de torção e de fricção, em adição às forças de tensão exercidas pelo músculo. Este trabalho visou caracterizar as adaptações estruturais e composicionais apresentadas por este tendão frente a este complexo sistema biomecânico. Estruturalmente duas regiões principais foram delimitadas, uma região de tensão, tipicamente fibrosa e tida como responsável pela transmissão das forças de tensão, e uma região de compressão, de aspecto cartilaginoso, que se desenvolve na área em que o tendão contorna a articulação tibio-fibular distal. A região de compressão distingue-se do aspecto fibrocartilaginoso descrito para tendões de mamíferos encontrados em situações semelhantes e apresenta feixes primários e fibras extremamente onduladas e/ou contorcidas, na superfície dos quais deposita-se um material basofílico caracterizado como proteoglicanos. Ultraestruturalmente estes feixes apresentam-se formados por fibrilas associadas em grupos independentes que à semelhança dos feixes que formam são também contorcidas e sem direcionamento predominante. A fixação em presença de vermelho de rutênio faz com que os proteoglicanos precipitem-se como grânulos interligados por filamentos que formam estruturas aneladas. Além destes componentes encontrados nos espaços interfibrilares, existem grânulos que são encontrados em associação com as fibrilas de colágeno e distribuídos de forma periódica de acordo com o período d . A comparação dos tamanhos destes grânulos na região de compressão com aqueles observados na região de tensão demonstra que os primeiros são bem maiores que os últimos. Estudo morfométrico revelou que as fibrilas de colágeno da região de compressão apresentam diâmetros reduzidos e com distribuição de valores menos ampla que a região de tensão. As células da região de compressão podem ser distinguidas em três tipos, principalmente pelo conteúdo de filamentos intermediários que acumulam no citoplasma e no tipo de interação com componentes da matriz extracelular. Foi demonstrado que a região de compressão possui cerca de 7 vezes mais glicosaminoglicanos (quantificados pelo método do carbazol) que a região de tensão e que parte destes componentes estão associados na formação de grandes proteoglicanos, como revelado por filtração em gel de Sepharose CL-4B, eletroforese em gel de agarose-acrilamida e por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. Também os pequenos proteoglicanos foram identificados, sendo que o biglicam é encontrado na região de compressão e está virtualmente ausente da região de tensão, onde o decorim apresenta tamanho reduzido provavelmente por menor extensão do seu glicosaminoglicano. O menor tamanho do decorim é demonstrado também pela dimensão reduzida dos grânulos associados às fibrilas de colágeno que são revelados pelo vermelho de rutênio. Fibromodulim foi identificado nas duas regiões sem apresentar modificações estruturais evidentes entre elas. Foi demonstrado que o colágeno do tipo I é o principal componente das duas regiões do tendão, embora a presença de outros componentes de natureza colagênica tenha sido sugerida pela existência de fragmentos distintos obtidos por digestão com pepsina de material proveniente de cada região e por precipitação diferencial de colágenos, com conteúdo em aminoácidos diferente daquele apresentado pelo colágeno do tipo I. As análises

efetuadas permitem concluir que este tendão possui grande capacidade de deformação, possibilitada pelo arranjo dos elementos fibrilares e pelo conteúdo em grandes proteoglicanos, além da esperada resistência à compressão, comuns a outros tendões sujeitos a forças de compressão.

Abstract

The tendon of muscle plantaris longus of *Rana catesbeiana* is subjected to compressive, torsional and frictional forces in addition to the tension forces exerted by the muscle. This work was carried out to characterize the structural and compositional features of the tendon facing this complex biomechanical system. Two main regions can be distinguished structurally. The tension region, typically fibrous and assumed to be responsible for the transmission of tension forces, and the compression region, with cartilaginous aspect, which develops in the area where the tendon wraps the distal tibial joint. At histological level, the compression region differs from the fibrocartilaginous array described for mammalian tendons under compression and exhibits primary bundles and fibers extremely wavy and convoluted, with a coarse covering of basophilic material identified as proteoglycans. Ultrastructurally, these bundles are constituted by independent groups of convoluted fibrils without a predominant direction. Fixation in presence of ruthenium red precipitates the proteoglycans as granules associated by filaments in ring formations. Besides these granules of the interfibrillar spaces, there are granules associated with the collagen fibril surface and disposed periodically according to the d period. Comparison of the size of these granules in the compression regions with those of the tension regions demonstrated that the former are larger than the latter granules. A morphometric study demonstrated that the fibrils of the compression region show reduced diameters with a narrow distribution of values while fibrils of the tension region exhibit a wide dispersion of values reaching extremely large diameters. Cells of the compression region can be distinguished in three main types, differing essentially by the amount of intermediate filaments deposited in the cytoplasm and in the kind of association with extracellular matrix components. Biochemical analysis demonstrated that the compression region possess almost 7 times the amount of glycosaminoglycans found in the tension region. Part of these glycosaminoglycans are in the form of large proteoglycans as demonstrated by gel filtration in Sepharose CL-4B, composite agarose-acrylamide gel electrophoresis, and ultracentrifugation in cesium chloride gradient. DEAE-cellulose chromatography of material extracted by 4M GuCl unveil the existence of small proteoglycans in both region of the tendon, eventhough biglycan is virtually absent of the tension region and that decorin from this region migrates faster in SDS-PAGE, pointing to its smaller size. It agrees with the smaller size of fibril-associated granules revealed by fixation in presence of ruthenium red. Fibromodulin was also identified in both regions without remarkable structural modifications. It was shown that collagen type I is the main collagenous component of both regions, though other members of the family must be present as indicated by differences in fragments obtained by digestion with pepsin and by obtention of residues of collagenous material other than type I in differential precipitation by NaCl from neutral saline. The analysis allow us to conclude that this tendon has an increased deformability, which is guaranteed by the spacial arrangement of fibrillar components as well as by the content in large proteoglycans, besides the expected capacity to resist compressive forces, shared with different pressure-bearing tendons.

Introdução

Tendões representam sistemas com estrutura e composição aparentemente simples, facilitando o estabelecimento de relações entre estrutura e função. Definições anatômicas para tendões limitam-se a descrevê-los como estruturas fibrosas altamente resistentes que ligam os músculos aos ossos ou estendem-se em aponeuroses, sendo no geral estruturas brancas e brilhantes, compostas por fascias que por sua vez são formadas por feixes espessos de fibras de colágeno. Descrições histológicas restringem-se em descrever o aspecto básico do arranjo paralelo dos feixes de colágeno e dos fibroblastos que se alongam e se enfileiram segundo a direção dos feixes, posicionando-se entre eles. Às vezes descreve-se o sistema de cápsulas, sem muito detalhes (KRSTIC, 1985). Em várias outras, o tendão é tido como uma estrutura relativamente inerte (HAM, 1974; EVANS & BARBENEL, 1975).

Entretanto, esta aparente "simplicidade" estrutural merece ser questionada quando se verifica as propriedades biomecânicas dos tendões. A partir de experimentos biomecânicos, alguns autores descrevem os tendões como estruturas que possuem elevada resistência e flexibilidade, considerável inextensibilidade e quase perfeita elasticidade (VIIDIK, 1973; EVANS & BARBENEL, 1975; VILARTA, 1986).

Tal conjunto de propriedades biomecânicas leva a crer que a simplicidade anatômica e histológica do tendão seja na verdade o reflexo da combinação de diferentes domínios submicroscópicos com características específicas e que possibilitam associar as diferentes propriedades mencionadas acima numa única estrutura.

Na verdade, um indício de uma maior complexidade organizacional pode ser notada simplesmente pela observação de um corte histológico não corado de tendão à microscopia de polarização. Quando posicionado a 45° em relação aos filtros polarizadores o material normalmente exibe birrefringência, uma anisotropia óptica que reflete uma ordenação molecular dos elementos moleculares constituintes do objeto em análise. A birrefringência é uma característica usual de tendões e ligamentos normais e sua intensidade está diretamente associada ao grau de ordem interna exibida por estas estruturas. No caso dos tendões e ligamentos a maior parte da birrefringência detectada é devida às moléculas de colágeno do tipo I e, mais especificamente, à distribuição espacial ordenada das suas ligações peptídicas.

Quando o material é girado de 45° e é posicionado paralelamente a um dos filtros de polarização, a birrefringência deve extinguir-se, dada a coincidência do "eixo óptico" do material com o eixo do polarizador. Um corpo composto por um arranjo perfeitamente paralelo de elementos fibrilares mostra-se completamente negro nesta posição conhecida como posição de extinção paralela da birrefringência. Um exemplo de extinção total, ou seja de completa abolição da birrefringência é encontrado no sistema quitinoso das conchas resquiciais de lulas (CARVALHO & VIDAL, 1990). Embora os tendões e ligamentos sejam intensamente birrefringentes quando observados à luz polarizada, na maioria das vezes eles não exibem extinção total quando posicionados paralelamente a um dos filtros de polarização. Outrossim, estas estruturas exibem um bandado característico

de faixas brilhantes entremeadas por faixas negras. Este bandado, conhecido por "crimp" ou por morfologia em "crimp", é a manifestação de um arranjo diferenciado do padrão alinhado normalmente assumido para os tendões. O "crimp" reflete uma periodicidade de mudanças de direção dos elementos fibrilares e não descontinuidades de material ou de estrutura. Na verdade ele corresponde a uma unidade identificável ao microscópio de polarização e que apresenta uma variação organizacional periódica (GATHERCOLE & KELLER, 1991). Em outras palavras, o bandado ou "crimp" revela variações na orientação de componentes estruturais.

A presença de "crimp" é notada em diferentes tendões e ligamentos e é característica para cada um deles. Quanto maior o período de crimp, maior a capacidade de acomodamento do tendão frente a foças de tensão, antes que as fibras sejam tensionadas. Desta forma a mais provável função do "crimping" é prover o tendão de um mecanismo de absorção de choques (GATHERCOLE & KELLER, 1991).

O entendimento da função do "crimp" pode ser facilitado pela análise do comportamento de tendões e ligamentos em experimentos de estresse-deformação, quando o estiramento do tendão é medido em função da aplicação de cargas de tensão. Nos primeiros instantes da aplicação de cargas com valores crescentes, ocorre um acomodamento das fibras e seu alinhamento com o longo eixo do tendão, antes que elas comecem a exercer resistência à tensão (DIAMANT et alii, 1972; VIIDIK, 1973; VILARTA, 1986). Nesta fase, há uma deformação ou estiramento relativamente grande frente a cargas pequenas. Um tendão fixado neste estado de tensão perde o aspecto de "crimp" quando analisado à microscopia de polarização. Esta fase é reversível, ou seja, o tendão reassume a condição inicial caso a carga seja removida. Após esta fase, o tendão exibe pouca deformação frente à carga aplicada. O pequeno estiramento apresentado é normalmente atribuído a um ligeiro deslizamento entre os componentes fibrilares e é também reversível, desde que a distensão não tenha ultrapassado 4-10% do comprimento do tendão. Após um determinado limiar, os elementos fibrilares começam a se romper, de modo que o tendão volta a exibir estiramento relativamente grande frente à aplicação de carga. Esta fase é irreversível e nela ocorre o rompimento do tendão caso a aplicação de cargas continue.

Uma das características biomecânicas do tendão é a sua flexibilidade. Esta propriedade é comumente atribuída à capacidade de deslizamento entre as diferentes fibrilas que compõem os feixes mas é também devida a arranjos de ordem superior adotados pelos feixes e por outros componentes estruturais dos tendões.

A supra-estrutura dos tendões

Além do sistema de feixes de fibrilas de colágeno, existe um sistema de "cápsulas" que envolvem o tendão externamente e emitem prolongamentos que revestem grupos de feixes. A fina camada de tecido conjuntivo que reveste o tendão externamente corresponde ao epitenon. Esta camada estende-se por entre os feixes de colágeno, então recebendo o nome de endotenon. Esta última muitas vezes conduz pequenos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (ELLIOT, 1965). Cada tendão é revestido externamente por uma cápsula, o paratenon. Quando uma maior lubrificação é necessária frente a um aumento na fricção, o que pode ocorrer por uma mudança de direção, o paratenon divide-se nas camadas visceral e parietal (ELLIOT, 1965; MERRILLES & FLINT, 1980). Estas camadas delimitam um espaço conhecido por mesotenon que é preenchido por um fluido semelhante ao líquido sinovial (NISBIT, 1960).

Para os tendões de rabo de rato este sistema foi detalhado e aspectos ultraestruturais dos diferentes componentes de revestimento do tendão foram descritos (STROCCHI et alii, 1985). Alguns aspectos discordantes e provavelmente errôneos da denominação adotada por STROCCHI e colaboradores (1985) foram publicados por ROWE (1985a; b). Posteriormente foi demonstrada a existência de diferentes componentes do sistema elástico nos diferentes níveis do sistema de revestimento do tendão (CALDINI et alii, 1991), demonstrando que elasticidade é uma das propriedades destas estruturas.

As fibras de colágeno ou feixes primários são agrupados em feixes secundários, fascículos ou fascias, que apresentam diâmetros ao redor de 600 µm. Uma modificação gradual desta estrutura é observada nas inserções dos tendões nos ossos (VIIDIK, 1973). As fileiras de fibroblastos são transformadas em grupos de osteócitos, a princípio arranjando-se também em fileiras e depois dispersando na distribuição característica dos ossos. Numa posição intermediária entre estes dois tipos celulares são encontradas células semelhantes a condrócitos, alinhados à forma de uma fibrocartilagem. Outros aspectos da matriz extracelular garantem que entre o tendão e o osso existe uma região fibrocartilaginosa (RALPHS et alii, 1991; 1992; RUFAL et alii, 1992). Segundo ELLIOT (1965), na região de inserção, os elementos fibrilares que compõem os feixes do tendão abrem-se em leque, promovendo uma maior área de inserção, de modo a distribuir as forças de tensão, evitando assim a aplicação do estresse sobre uma área localizada.

Enquanto os ligamentos possuem inserções ósseas nas duas extremidades, os tendões possuem uma de suas extremidades ligadas ao músculo. A forma de ligação entre músculos e tendões parece ser bem mais complexa que a inserção no osso, uma vez que a força motora originada no interior da célula muscular deve ser transmitida para o tendão. Parece haver uma continuidade entre os elementos fibrilares do tendão com o tecido conjuntivo que compõe os elementos de revestimento das unidades musculares. Na transição mio-tendinosa, os componentes fibrilares colagênicos parecem estar intimamente associados à superfície das fibras musculares, de forma que as acompanham no momento da contração. Este efeito é somado por todo o músculo e transferido através do tendão até o osso, o que é possível através da inextensibilidade e resistência do tendão. JOZSA e colaboradores (1991) demonstraram que as fibrilas de colágeno do tendão inserem-se na lâmina basal das células musculares, especialmente em recessos da superfície celular, o que amplia enormemente as superfícies de contato entre a célula muscular e os componentes fibrilares do tendão, difundindo efeitos localizados. Inúmeras fibrilas com pequenos diâmetros são observadas na superfície da lâmina basal, de onde se direcionam para o tendão, passando por entre os fibroblastos da transição mio-tendinosa e misturando-se com as fibrilas espessas do tendão. A região composta por estas fibrilas mais finas tem sido chamada de "microtendão", correspondendo a um sítio frágil, onde são comuns os traumatismos causados por exercícios (MOORE, 1983; SWASDISON & MAYNE, 1991)

Os diferentes níveis da organização fibrilar

O principal responsável pelas características biomecânicas dos tendões e ligamentos é o arranjo fibrilar resultante da associação de moléculas de colágeno e alguns outros componentes da matriz extracelular.

A capacidade dos colágenos fibrilares em formar agregados é uma propriedade básica que lhes permitem formar fibrilas e/ou fibras. A agregação das moléculas de colágeno na formação de um elemento fibrilar depende de características como uma estrutura molecular

alongada e com sítios de interação presentes a espaços regulares, que permitam a agregação lateral, além de possibilitar o deslocamento axial de moléculas vizinhas na formação dos arranjos encontrados nas fibrilas

mais finas (MILLER, 1985). A formação de fibrilas no espaço extracelular ocorre por um processo de auto-agregação que é controlado principalmente pela sequência primária do colágeno, em especial pela distribuição dos resíduos polares carregados e dos hidrofóbicos (HOFMANN et alii, 1978).

As fibrilas de colágeno podem variar em diâmetro de 16 a 1500nm, dependendo do tecido (PIEZ, 1984), embora o menor arranjo visível ao microscópio eletrônico seja um fino filamento com cerca de 4nm de espessura, correspondente à associação lateral de 4 ou 5 moléculas (VIIDIK, 1973).

O diâmetro das fibrilas de colágeno é extremamente variável. O colágeno do tipo I, por exemplo, apresenta diferentes diâmetros médios e mesmo da distribuição de diâmetros, conforme a estrutura. Assim, na córnea as fibrilas apresentam diâmetro extremamente pequenos e uma distribuição bastante uniforme, o que também acontece em gengivas. Na pele e nos ossos as fibrilas possuem diâmetros com valores intermediários mas com ampla variação e nos tendões estes valores são bem maiores e também com uma distribuição bastante heterogênea, quase sempre bimodal (PARRY et alii, 1978a; 1978b; BRODSKY & EIKENBERRY, 1985).

Na verdade são também frequentes variações entre os diferentes tendões em diferentes estados fisiológicos (PARRY, 1978; PARRY et alii, 1978a; 1978b) e no mesmo tendão frente a diferenças nas forças mecânicas a que está sujeito ao longo de seu trajeto (MERRILLES & FLINT, 1980; OKUDA et alii, 1987a; 1987b).

BRODSKY & EIKENBERRY (1985) sugerem que seria improvável que a informação para controle do diâmetro das fibrilas resida nas moléculas colagênicas em tríplice hélice simplesmente e que este controle seja simplesmente o resultado de um processo de autoagregação, baseados principalmente na existência de diferentes estruturas com a mesma constituição básica no que se refere ao tipo de colágeno predominante e que exibem diferentes padrões de distribuição dos diâmetros dos componentes fibrilares. Ainda segundo BRODSKY & EIKENBERRY (1985), os fatores extrínsecos com participação provável no controle do diâmetro das fibrilas incluem a própria presença dos pró-colágenos e o seu processamento, a presença de proteoglicanos específicos, o controle celular e interações que ocorrem a nível de superfície celular e a presença dos colágenos que se associam às fibrilas formadas pelos tipo de colágeno predominante. Um fator essencial, que foi por eles negligenciado é o tipo e a extensão de alguns dos processamentos pós-traducionais que também podem ter influência no tipo de agregado e até mesmo no diâmetro final da fibrila. Estes fatores podem ser responsáveis pela variação do diâmetro das fibrilas formadas *in vitro* por colágeno do tipo I purificado de tendões provenientes de ratos de diferentes idades (VIDAL & CARVALHO, 1990). A remoção dos carboidratos associados às moléculas de colágeno, por exemplo, resulta em redução no grau de polimerização das moléculas de colágeno do tipo I (BRASS & BENSUSAN, 1976).

Especialmente nos estágios iniciais de formação dos feixes, foram detectadas fibras que se anastomosam, indicando a possibilidade de fusão entre fibrilas como um mecanismo relacionado com o espessamento das fibrilas (BIRK et alii, 1989).

Quaisquer que sejam os mecanismos de controle do diâmetro das fibrilas, tem-se que os componentes fibrilares correspondem às estruturas alongadas com diâmetro usualmente variando entre 20 e 60nm, podendo chegar aos 400nm. A distinção entre microfibrilas com diâmetro de 20 a 100nm e fibrilas com diâmetro de 200 a 500 nm é tida como um fator indutor de incoerências no tratamento destes elementos fibrilares (VIIDIK, 1973). Fibras ou feixes primários são os arranjos assumidos por fibrilas e que são visíveis ao microscópio óptico, com diâmetros de até 12 µm.

Longitudinalmente as fibras exibem um bandado periódico, que nos tendões e ligamentos está ao redor de 64nm. Variações neste padrão de periodicidade longitudinal foram reportadas para o mesmo tendão segundo

as forças de tensão a que está sujeito (FLINT & MERRILLES, 1977) e ao longo do desenvolvimento (SCOTT et alii, 1981). A origem deste padrão periódico de bandas detectadas ao nível ultraestrutural está na sequência primária das moléculas do colágeno, na qual os aminoácidos não estão dispostos uniformemente ao longo da cadeia mas estão distribuídos em grupos. As diferentes bandas corresponderiam então a grupos de aminoácidos com cadeias laterais de propriedades similares capazes de ligar ou de excluir os contrastantes empregados para a microscopia eletrônica. Análises da sequência primária do colágeno do tipo I demonstraram que a associação dependente de interações hidrofóbicas ao longo da cadeia é mais forte quando cada molécula é defasada de 67 nm da molécula vizinha, o que coincidiria com resultados de investigações ao microscópio eletrônico e de difração de raios X (HOFMANN et alii, 1978).

Além do diâmetro da fibra, o estado de agregação molecular dentro de cada fibra e o espaço ocupado por elas também têm influência nas propriedades biomecânicas dos tendões e ligamentos. Isto faz sentido a partir do momento em que se reconhece algumas das propriedades materiais de elementos fibrilares. O espaço ocupado pelos componentes fibrilares, por exemplo, refere-se à fração volumétrica das fibrilas. Isto corresponde à quantidade de elementos fibrilares e à área ocupada por elas em corte transversal por unidade de espaço, o que tem reflexo sobre as suas propriedades de resistência. Por outro lado, aumentos na fração volumétrica dos componentes fibrilares resulta em uma birrefringência mais intensa. Tanto na resistência mecânica quanto na birrefringência, não somente a fração volumétrica tem importância, mas também a orientação dos fibrilas dentro da estrutura. Desta forma, se as fibrilas são os elementos responsáveis pelo "reforço" ou resistência de um tendão ou ligamento, a eficiência deste reforço depende do direcionamento destes elementos, que é definido pela expressão:

$$\eta = \cos^4 \phi,$$

onde η é a contribuição de uma dada fibrila à resistência da estrutura ("reforço"), e ϕ corresponde ao ângulo formado entre a direção de transmissão de forças e a direção da fibrila. Isto significa que uma fibrila colabora na resistência de um tendão no momento em que seu direcionamento coincide com o trajeto das forças a que o tendão está sujeito (HUKINS & ASPDEN, 1985; PARRY, 1978). Como nos tendões estes elementos estão essencialmente paralelos entre si e em concordância com o longo eixo da estrutura, variações no estado de agregação molecular lateral (VILARTA & VIDAL, 1989; VIDAL & CARVALHO, 1990) são de importância, ao lado de variações nos diâmetros das fibras (PARRY et alii, 1978a; 1978b). Na verdade estes dois fatores têm sido interrelacionados com base em características anisotrópicas ópticas, i.e. na birrefringência exibida pelos tendões (VIDAL & CARVALHO, 1990). Os parâmetros interrelacionados acima foram adicionalmente confirmados por resultados de difração de raios-X (NARESH & BRODSKY, 1992).

Uma vez que as moléculas de pró-colágeno atingem o espaço extracelular e parte das extremidades da cadeia são removidas (KÜHN, 1987), existe uma tendência espontânea de auto-agregação que resulta na formação de elementos fibrilares.

Sabe-se hoje que em várias situações, como na pele (FLEISCHMAJER et alii, 1985; KEENE et alii, 1987), na córnea (LINSENMAYER et alii, 1985; KEENE et alii, 1988), e nas cartilagens (EYRE et alii, 1987; VAUGHAN et alii, 1988), as fibrilas são formações híbridas entre diferentes tipos de colágeno. Nestes sistemas, as fibrilas são na verdade biocompostos estruturados não somente por colágenos mas também por outros componentes como, por exemplo, os pequenos proteoglicanos. Nos tendões em particular, parece haver uma predominância do colágeno do tipo I, sem exclusão dos pequenos proteoglicanos. Colágeno do tipo III é

encontrado em tendões mas fazendo parte do endotenon (BECKER et alii, 1976; HERMANN et alii, 1980). Já o colágeno do tipo V foi purificado de tendão de embriões (JIMENEZ et alii, 1978), mas não foi detectado em tendões adultos. Há também indicação da presença de colágeno tipo VI nos tendões onde atua como um "adaptador", conectando elementos da matriz extracelular com as células (TIMPL & ENGEL, 1987). Colágenos da classe FACIT (colágenos associados às fibrilas com trílice hélice interrompidas - SHAW & OLSEN, 1990), em especial o tipo XII (SUGRUE et alii, 1989) e tipo XIV (CASTAGNOLA et alii, 1992) foram encontrados em tendões de fetos. A análise ultra-estrutural dos elementos fibrilares em diversas situações demonstrou existir dois tipos de arranjos dos elementos subfibrilares (BOUTEILLE & PEASE, 1971; LILLIE et alii, 1977; REALLE et alii, 1981). No primeiro, os elementos subfibrilares estariam arranjados paralelamente ao longo eixo da fibrila e, no segundo, eles estariam arranjados de forma helicoidal. O arranjo helicoidal de componentes fibrilares dos tendões foi também sugerido por MELLO & VIDAL (1975), através de análises de dispersão da birrefringência e do dicroísmo linear extrínseco obtido por coloração com azul de toluidina em pH 5.0. Segundo RASPANTI e colaboradores (1990), as fibrilas compostas por componentes helicoidais estariam melhor organizadas para resistir a flexões, compressão e deformação multidirecional, enquanto as fibrilas compostas por componentes paralelos estariam adaptadas somente à transmissão de tensão, sendo menos capazes de resistir à compressão, frente à qual facilmente se romperiam.

Como detalhado acima, os fatores que controlam a espessura que a fibrilas atingirão são diversos e possivelmente variáveis entre os diferentes tecidos, sendo que ao menos as primeiras etapas da associação entre as moléculas de colágeno e a capacidade de agregação lateral é dependente das modificações pós-traducionais pelas quais passam as moléculas de colágeno.

As modificações pós-traducionais do colágeno

Um das características essenciais dos colágenos é observada já na sua estrutura primária. Cerca de um terço da molécula é composta pelo aminoácido glicina, que é encontrado na seqüência -X-Y-Gly-. A probabilidade de que X seja uma prolina e que Y seja uma lisina é grande, o que faz destes dois aminoácidos dos mais frequentes no colágeno. Além disto estes dois aminoácidos são tipicamente hidroxilados pós-traducionalmente. A hidroxilação da prolina pode ser por uma prolil-3-hidroxilase ou uma prolil-4-hidroxilase. A posição de adição do grupamento hidroxila depende da posição do resíduo uma lisil-hidroxilase. Estas hidroxilações são inibidas se as cadeias estão em trílice hélice (KIVIRIKKO & MYLLYLÄ, 1985). Por outro lado, a ocorrência destas hidroxilações é fundamental para que três cadeias alfa enrolem-se numa hélice tripla, que é uma característica estrutural primordial dos colágenos (KÜHN, 1987). Uma vez que houve a formação da hélice tripla, ocorre a adição de resíduos de galactose por galactosil-transferases e de glicose por galactosil-glicosil-transferases aos resíduos de lisina hidroxilados. Neste momento, a molécula é denominada de pro-colágeno e possui extensões em ambas extremidades das cadeias que impedem a agregação lateral. É nesta forma que o colágeno é secretado pela célula. Uma vez fora da célula as extremidades da moléculas são cortadas por peptidases específicas encontradas na face externa da membrana das células produtoras. O colágeno então formado pode associar-se lateralmente na formação de fibrilas. Como já mencionado, a capacidade de formar fibrilas resulta da estrutura alongada da molécula, com sítios de interação múltiplos e capacidade de interação lateral com pelo menos 4 outras moléculas (MILLER, 1985).

O espessamento e a manutenção do diâmetro das fibrilas dependem da formação de ligações cruzadas entre diferentes moléculas, dentre outros fatores. As ligações cruzadas são de diferentes ordens e envolvem a

complexação de resíduos de hidroxilisina com resíduos de lisina. A primeira ligação formada é denominada de dehidrolisinonorleucina. Até quatro resíduos de lisina podem ser comprometidos e, neste caso, tem-se a formação de complexos de ligação com estrutura cíclica, capaz de emitir fluorescência com pico em 540nm (MILLER, 1984). Enquanto as primeiras etapas da formação destas ligações cruzadas dependem de enzimas como a lisil-oxidase, as seguintes ocorrem espontaneamente, e acumulam-se com a idade do indivíduo (EYRE et alii, 1984). O principal efeito da formação destas ligações cruzadas é o de polimerizar e tornar insolúvel as moléculas envolvidas. As diferentes etapas do processamento pós-traducional têm importância em diferentes passos da formação e na capacidade de auto-agregação das moléculas de colágeno (Tabela I). Destas etapas as que parecem ser importantes na determinação do diâmetro das fibrilas por influenciarem na capacidade de auto-agregação e na formação de ligações cruzadas e provavelmente na capacidade de interação com outras moléculas são as de hidroxilação de resíduos de prolina e de lisina e a de glicosilação dos resíduos de hidroxilisina.

Como já mencionado, os proteoglicanos são também tidos como sendo de importância na manutenção ou regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno e, além disto, devem estar envolvidos em outras propriedades dos tendões.

Os proteoglicanos dos tendões

ANDERSON (1975) descreveu um pequeno proteoglicano de tendão composto por dermatam sulfato e que foi separado em baixas concentrações de cloreto de céso após ultra-centrifugação.

Depois disto, o mesmo autor (ANDERSON, 1982) analisou a presença de grandes proteoglicanos em tendões flexores de bovinos, embora mencionando apenas sutilmente que a presença destes grandes proteoglicanos nos tendões devia-se ao fato de que, na verdade, os tendões flexores estão sujeitos a forças de compressão e que talvez seja esta a razão da presença deste proteoglicanos.

A presença de proteoglicanos contendo dermatam sulfato em animais adultos e a predominância de proteoglicanos contendo condroitim sulfato e de ácido hialurônico nos animais recém-nascidos foi demonstrada por SCOTT et alii (1981) em tendões de cauda de ratos.

Já VOGEL e HEINEGÅRD (1985) caracterizaram os grandes e pequenos proteoglicanos de tendões bovinos, justamente procurando distinguir as regiões sujeitas a tensão daquelas sujeitas a compressão. Os grandes proteoglicanos da região de tensão são divididos em duas subpopulações e são ligeiramente menores que os grandes proteoglicanos de cartilagem. Ao contrário do que acontece com os proteoglicanos de cartilagens, aqueles encontrados nos tendões não possuem queratam sulfato. Os pequenos proteoglicanos, decorim e biglicam, primeiramente descritos em cartilagens foram também descritos para estes tendões. Estes dois pequenos proteoglicanos possuem porções protéicas com grande homologia no conteúdo e na seqüência de aminoácidos e possuem uma (decorim) ou duas (biglicam) cadeias de dermatam sulfato (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989; HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992). Enquanto o decorim é capaz de se ligar às fibras de colágeno e inibir a progressão da fibrilogênese *in vitro*, o biglicam não interage com colágeno e fica disperso nos espaços entre as fibras (VOGEL et alii, 1984; LONGAS & FLEISCHMAJER, 1985; HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992; FLEISCHMAJER et alii, 1991). A interação do decorim com o colágeno não depende dos glicosaminoglicanos mas sim do componente protéico (VOGEL et alii, 1984) e, principalmente, de uma conformação nativa estabilizada por pontes de dissulfeto (SCOTT et alii, 1986). Decorim e biglicam correspondem a cerca de 95% dos proteoglicanos dos tecidos fibrosos e

Tabela I. As modificações pós-traducionais do colágeno e os eventos a que estão relacionadas (modificada de KIVIRIKKO & MYLLYLÄ, 1985)

Etapas	Eventos relacionados
Intracelulares	
Hidroxilação de resíduos de prolina	Formação da tríplice hélice
Hidroxilação de resíduos de lisina	Glicosilação da hidroxilisina
Glicosilação da hidroxilisina	Possível influência na interação entre cadeias e resultante agregação lateral das fibrilas, formação de ligações cruzadas
Associação das cadeias e formação de pontes dissulfeto	Formação da tríplice hélice
Formação da tríplice hélice	Formação da proteína funcional
Extracelulares	
Remoção dos N- e C-propeptídeos	Autoagregação e formação de fibrilas
Agregação ordenada	Crescimento das fibrilas em espessura e comprimento
Formação de ligações cruzadas	Polimerização do colágeno e estabilização das fibrilas

atingem apenas cerca de 2% em cartilagem (HEINEGÅRD & SOMMARIN, 1987a; GALLAGHER, 1989). Posteriormente foi identificado um terceiro pequeno proteoglicano, primeiramente purificado de cartilagem, o fibromodulim (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989). Este pequeno proteoglicano possui quatro cadeias de queratam sulfato, sua porção protéica é também homóloga àquelas do decorim e biglicam (OLDBERG et alii, 1989) e, como o decorim, interage com o colágeno de forma a impedir a fibrilogênese (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989). A interação do fibromodulim com colágeno não depende das cadeias de glicosaminoglicanos da molécula, uma vez que o core protéico por si só é capaz de ligar-se ao colágeno e de afetar a fibrilogênese (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989). Esta ligação do fibromodulim sem as cadeias de glicosaminoglicanos ao colágeno dá-se provavelmente através de ligações eletrostáticas entre resíduos de tirosina sulfatada, presentes no fibromodulim, e resíduos básicos na molécula do colágeno.

A distribuição dos grandes proteoglicanos nos tendões é pouco conhecida. A demonstração inicial de que os grandes proteoglicanos podem ser extraídos com NaCl 0,1M (PEARSON & GIBSON, 1982) sugere que estes componentes não estejam associados aos feixes ou o fazem debilmente. É provável que eles ocupem os espaços entre os feixes, embora esta suposição necessita de resultados imunocitoquímicos para ser aceita. Já os pequenos proteoglicanos, em especial o decorim, exibem interação forte com os componentes fibrilares e necessitam de condições mais fortes de extração. SCOTT & ORFORD (1981) demonstraram que um pequeno proteoglicano rico em dermatam sulfato (muito provavelmente o decorim) associa-se intimamente com as fibrilas de colágeno com distribuição periódica coincidente com o período *d*. A distribuição deste componente foi determinada com o uso do corante catiônico azul cupromerônico. A distribuição do fibromodulim junto às fibrilas de colágeno e a sua contribuição ao padrão de precipitação de corantes como o azul cupronílico ou o

vermelho de rutênio permanece desconhecida, mesmo embora tenha sido sugerido (OLDBERG *et alii*, 1989) que ao menos um dos componentes proteoglicânicos demonstrados em associação com as bandas *a* e *c* do colágeno de córnea (SCOTT & HAIGH, 1988) possa ser o fibromodulim. Embora o biglicam não seja encontrado em associação com as fibrilas colagênicas, a necessidade de condições drásticas para sua extração sugere que ele possa estar associado a outros elementos da matriz extracelular (OLDBERG *et alii*, 1989).

A intimidade da associação de alguns destes pequenos proteoglicanos com as fibrilas de colágeno e a capacidade que possuem em impedir ou retardar a formação de fibrilas fez com que alguns autores atribuíssem a estas moléculas a capacidade de modular o processo de fibrilogênese e ainda a organização das fibrilas de colágeno. A íntima associação entre determinados tipos de glicosaminoglicanos e determinados padrões de distribuição dos diâmetros das fibrilas de colágeno foram revistos por PARRY *et alii*, 1982). Na verdade, foi demonstrado através de experimentos *in vitro*, que o decorim não impede a formação de fibrilas mas sim inibe a associação lateral e o espessamento, mantendo um diâmetro relativamente reduzido (VOGEL & TROTTER, 1987).

A complexação entre proteoglicanos e colágeno dá-se de forma altamente ordenada e promove a base da integridade e da manutenção das propriedades de diferentes estruturas (HALL, 1978; SCOTT, 1988).

Parte da ordem molecular detectada nos tendões pela birrefringência exibida por estas estruturas foi associada à ordenação molecular exibida pelos glicosaminoglicanos ácidos, através da detecção de uma outra anisotropia óptica, o dicroísmo linear extrínseco (VIDAL, 1963). Neste trabalho foi demonstrado que os tendões apresentam dicroísmo linear extrínseco negativo após coloração com azul de toluidina, o que revela uma distribuição ordenada das moléculas do corante, demonstrando que os glicosaminoglicanos ácidos apresentam-se ordenadamente distribuídos nos tendões (VIDAL, 1963) e que a birrefringência exibida pelos tendões reflete ao menos em parte a ordenação destes componentes (VIDAL, 1964; 1980). Além da ordenação exibida pelos glicosaminoglicanos, a ordenação dos carboidratos associados à própria molécula de colágeno foi também demonstrada, novamente através de medidas de birrefringência e de oxidação pelo ácido periódico (VIDAL, 1986). A ordenação dos glicosaminoglicanos e dos carboidratos, que podem inclusive pertencer a proteínas estruturais não colagênicas (VIDAL, 1980; 1986), associada àquela exibida pelo colágeno propriamente dito (MELLO & VIDAL, 1972; VIDAL *et alii*, 1975; MELLO *et alii*, 1975; VIDAL, 1984), serviu de base para a formulação de uma teoria sobre o mecanismo de controle das características bioquímicas e biomecânicas do tendão pelos fibroblastos (VIDAL, 1966; 1969) e que recebeu um tratamento teórico recente (VIDAL, 1993). Por esta teoria as células seriam capazes de detectar alterações de cargas expostas na superfície dos feixes devidas a disrupções na associação ordenada destes dois componentes principais do tecido conjuntivo, frente às forças biomecânicas às quais a estrutura estaria sujeita, de modo a expor com "cargas de cisalhamento" (VIDAL, 1993). Este desbalanço de cargas foi também explorado por outros pesquisadores na elaboração de teorias semelhantes, envolvendo mecanismos eletroquímicos de monitoração da matriz extracelular pelas células (GILLARD *et alii*, 1979a).

A ordem molecular dos proteoglicanos em tendões foi também demonstrada em tendões de ratos recém nascidos, novamente através do dicroísmo linear e de análises de dispersão da birrefringência, e ultraestruturalmente pelo tratamento com o vermelho de rutênio (VIDAL & MELLO, 1984). Este último tratamento produziu imagens nítidas dos padrões helicoidais demonstrados pelas anisotropias ópticas estudadas.

Modificações estruturais e fisiológicas dos tendões - Os tendões sujeitos a forças de compressão

O tendão elástico das asas das aves representa um sistema em que a presença de fibras elásticas compatibiliza-se com a recuperação elástica de uma posição inicial das asas após a ação dos músculos alares. Estes tendões foram caracterizados biomecânica e ultraestruturalmente (OAKES & BIALKOWER, 1977). A presença de um sistema elástico desenvolvido permite ao tendão sofrer uma grande distensão antes de que as fibrilas de colágeno possam exercer qualquer efeito útil de resistência à tensão. Desta forma a curva de estresse-deformação obtida para este tendão possui uma região inicial muito longa que é eliminada caso o tendão seja tratado por elastase. Além disso este tendão exibe um padrão de feixes ondulados muito característico que é perdido com o mesmo tratamento pela elastase. Isto sugere que, ao menos em parte, o sistema elástico possa ser responsável por arranjos supraorganizacionais adotados pelas feixes de colágeno e principalmente pela modulação das características biomecânicas de estruturas fibrosas.

Na verdade estes tendões alares constituem-se numa exceção quanto ao acúmulo de elementos do sistema elástico, pois embora fibras do sistema elástico tenham sido identificadas junto aos elementos da cápsula do tendão de rabo de rato (CALDINI et alii, 1991), sua presença é rara e praticamente inexistente dentro dos feixes primários.

Recentemente, foi caracterizada uma proteína que faz parte da constituição das microfibrilas do tecido conjuntivo, a fibrilina (SAKAI et alii, 1986; KEENE et alii, 1991), e sua localização imunocitoquímica em tendões demonstrou que estas microfibrilas são mais frequentes nos tendões do que as análises histoquímicas e ultraestruturais até então revelaram (FULLMER & LILLIE, 1958; GAWLIK, 1965; PARRY & CRAIG, 1978; PARRY et alii, 1978a; CALDINI et alii, 1990). Entretanto, a única figura referente à distribuição da fibrilina no tendão (SAKAI et alii, 1986) é pouco ilustrativa e não demonstra qualquer aspecto de distribuição preferencial. Nos tendões sujeitos a forças de compressão, foi demonstrada a existência de uma quantidade relativamente grande de feixes de microfibrilas em íntima associação com os feixes primários (CARVALHO et alii, 1993). A presença destes componentes nos tendões que estão sujeitos a forças de compressão parece estar relacionado à capacidade de deformabilidade destes tendões o que seria ao menos em parte permitido por elementos fibrilares com elasticidade moderada, que atuariam no reestabelecimento da forma original após deformações causadas pelo deslizamento do tendão contra uma superfície curva.

Alguns tendões exibem variações em composição ao longo de sua estrutura, algumas vezes sem caracterizar alterações morfológicas evidentes, o que é tido como adaptações a diferentes situações biomecânicas que devem ocorrer ao longo de seu percurso da inserção mio-tendinosa à inserção óssea (JONES & BEE, 1990). Na verdade, como mencionado anteriormente, a própria inserção óssea representa um sistema que envolve mudança de direção e de modificações estruturais que garantem uma melhor distribuição de forças, otimizando a sua transmissão aos ossos.

Um exemplo notável de variações internas em função da otimização do papel biomecânico é observado em tendões que sofrem mudanças de direção, contornando uma extremidade óssea ou articulação. Esta situação faz com que o tendão seja comprimido, recebendo forças adicionais durante a sua atuação. Além disso, o tendão também sofre torções e também está sujeito a forças de fricção. Desta forma, além de resistir à compressão, o tendão deve ser relativamente flexível e ainda hábil em desempenhar seu papel na transmissão de forças de tensão.

Em mamíferos a região submetida a forças adicionais de compressão e de fricção apresenta alterações bioquímicas, detectadas até mesmo a nível histológico que a caracterizam como uma fibrocartilagem (VOGEL & KOOB, 1989).

Nos coelhos, os tendões flexores digitais profundos desenvolvem uma estrutura fibrocartilaginosa na região em que contornam a articulação tibial distal (PLÖTZ, 1938). Este tendões foram objeto de diversos experimentos biomecânicos, prestando-se à demonstração das respostas do tendão frente a diferentes situações e forças biomecânicas (GILLARD *et alii*, 1979b; MERRILLES & FLINT, 1980).

Na região em que recebem forças de compressão, os tendões flexores digitais profundos de coelhos apresentam uma região de aspecto fibroso típico de tendões, duas regiões transicionais, uma região de compressão e um paratenon visceral desenvolvido (MERRILLES & FLINT, 1980). As células das regiões transicionais, da região de compressão e do paratenon visceral são semelhantes a condrócitos e estão imersas numa matriz pericelular desenvolvida, rica em filamentos finos e fibrilas de colágeno delgadas. No paratenon visceral os feixes de colágeno estão dispostos perpendicularmente ao longo eixo do tendão. Conforme sugerido, este paratenon visceral desenvolvido atuaria facilitando a articulação do tendão com a superfície da articulação tibial distal (MERRILLES & FLINT, 1980). Um aspecto ultraestrutural típico das células destas regiões diferenciadas do tendão corresponde ao acúmulo de filamentos intermediários citoplasmáticos (MERRILLES & FLINT, 1980).

Dos experimentos realizados com os tendões de coelho, salientam-se aqueles em que a remoção das forças de compressão culminaram em perda de cerca de 60% dos glicosaminoglicanos, em sua maior parte devida à diminuição do conteúdo em condroitino sulfato, e aqueles em que a aplicação de forças de compressão a uma região normalmente sujeita à tensão resultou em aumento no conteúdo de glicosaminoglicanos (GILLARD *et alii*, 1979b).

OKUDA e colaboradores (1987a) desenvolveram estudos com o tendão flexor digital de cães, que foram primeiramente descritos por RETTERER & LELIÈVRE (1911) e demonstraram que a região sujeita a forças de compressão exibe aumento no conteúdo de glicosaminoglicanos e, conseqüentemente, acumulam mais água que outras regiões normalmente sob tensão. Estes autores demonstraram ainda haver uma relação hidroxilisina/hidroxiprolina aumentada nesta região, o que indica variações no grau de modificações pós-traducionais sofridas pelos componentes colágênicos ou variações nos tipos de colágenos presentes nesta região, que também possui aspecto fibrocartilaginoso típico. Ultraestruturalmente a região sujeita a forças de compressão dos tendões de cães exibem aspectos típicos de fibrocartilagens (OKUDA *et alii*, 1987b), e são muito semelhantes aos aspectos descritos para os tendões flexores digitais de coelhos (MERRILLES & FLINT, 1980).

Um outro modelo onde a mesma situação biomecânica está presente em bovinos. Os tendões flexores digitais profundos destes animais sofrem uma bifurcação para se estender aos dedos e, logo após a bifurcação, submetem-se a forças de compressão. Da mesma forma que nos coelhos e nos cães, este tendão diferencia-se em uma fibrocartilagem cujos aspectos estruturais foram descritos por EVANKO e VOGEL (1990). Estes autores também investigaram os componentes proteoglicânicos deste tendão e demonstraram que tanto os grandes quanto os pequenos proteoglicanos estão presentes. Demonstraram ainda que um grupo de grandes proteoglicanos está presente já na vida fetal e se mantém nos primeiros meses de vida, até que um novo grupo de grandes proteoglicanos são depositados na matriz a partir do momento em que o animal começa a caminhar e, portanto, o tendão é submetido a forças mecânicas características do adulto. O pequeno proteoglicano decorim foi identificado tanto na região de tensão quanto na região de compressão. Além dele também o

fibromodulim foi encontrado. É importante salientar que deste estudo foram delineados alguns aspectos típicos dos tendões de adultos mas que são encontrados no feto, principalmente no que concerne ao arranjo dos feixes de colágeno, que já são característicos desta região do tendão mesmo embora as forças de compressão estejam ausentes ou apenas supostamente presentes, indicando um caráter morfogenético na diferenciação desta área do tendão.

Recentemente a suprapatela de ratos foi descrita como uma região tendão reto femoral que também está sujeita a forças de compressão (BENJAMIN et alii, 1991; RALPHS et alii, 1991; 1992). A suprapatela corresponde a uma região fibrocartilaginosa que se localiza imediatamente antes da inserção do tendão na patela e que, devido à mudança de direção que o tendão sofre antes da inserção, recebe forças de compressão da extremidade femoral distal. Foram descritos alguns aspectos desta fibrocartilagem, como o seu desenvolvimento a partir de um grupo diferenciado de células já presentes no animal recém nascido e que se desenvolve em fibrocartilagem (BENJAMIN et alii, 1991), além da identificação de alguns dos componentes de sua matriz extracelular (RALPHS et alii, 1991; 1992). Além disto um importante achado relacionado com este material refere-se à determinação imunocitoquímica da presença de filamentos intermediários de vimentina. Estes filamentos intermediários, que já haviam sido identificados nos tendões de coelhos (MERRILLES & FLINT, 1980), foram sugeridos como marcadores para células de tecido conjuntivo que estão sujeitas a forças de compressão (RALPHS et alii, 1991; BENJAMIN M, comunicação pessoal).

Estudos adicionais no tendão calcâneo de ratos (RUFAl et alii, 1992) demonstraram que na verdade existe um gradiente de modificações que são encontradas nos tendões e que refletem a existência de forças de compressão com diferentes intensidades. Desta forma pode-se encontrar tecidos tipicamente fibrosos, com deposição de condroitim sulfato na matriz extracelular e de vimentina no citoplasma das células, como modelo mais simples, que pode sofrer modificações adicionais até atingir o arranjo fibrocartilaginoso (BENJAMIN et alii, 1991; RALPHS et alii, 1991; RALPHS et alii, 1992; RUFAl et alii, 1992).

As modificações sofridas por estas regiões de diferentes tendões, que em adição à função de transmitir as forças geradas pelos músculos suportam forças de compressão, refletem a capacidade das células em reconhecer os sinais biomecânicos e traduzi-los em alterações metabólicas hábeis em estabelecer novas propriedades biomecânicas para o tecido (RETTNER, 1918a, 1918b; GILLARD et alii, 1979; MERRILLES & FLINT, 1980; VOGEL et alii, 1986; VOGEL & KOOB, 1989).

Modificações biomecânicas desta natureza são encontradas no tendão do músculo plantaris longus de rãs. Nestes animais o movimento de extensão da pata, exigido nos saltos e durante o nado, faz com que o tendão submetam-se a forças de compressão exercidas pela extremidade distal do osso formado pela fusão tibio-fibular. Da mesma forma que os equivalentes dos mamíferos, estes tendões exibem duas regiões bem distintas, relacionadas com transmissão das forças de tensão e com resistência às forças de compressão.

Este sistema torna-se bastante interessante no que se refere à avaliação do grau de conservação do tipo de resposta da matriz extracelular de tendões, em diferentes grupos sistemáticos, a estímulos biomecânicos semelhantes, tendo como modelo os tendões flexores de mamíferos.

Objetivos

O objetivo deste trabalho é descrever a organização do tendão do músculo plantaris longus de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) que lhe permite suportar forças de compressão, sem comprometimento da transmissão de forças de tensão. Diferentes níveis organizacionais serão investigados através de análises estruturais e bioquímicas, buscando-se estabelecer correlações entre a composição, a estrutura e a fisiologia do tendão.

Com respeito à estrutura será desenvolvido um estudo de parâmetros anatômicos, histológicos, histoquímicos e ultraestruturais das regiões de tensão e de compressão. As mesmas regiões serão submetidas a uma série de análises bioquímicas que permitam definir características básicas dos componentes colagênicos e dos proteoglicanos.

Materiais e métodos

Obtenção do material

Exemplares de rã-touro, *Rana catesbeiana*, foram adquiridos de ranário comercial, localizado na cidade de Artur Nogueira. Foram utilizados machos adultos em idade de abate, com 100 a 120 gramas. Os animais foram sacrificados por decapitação e espinhalados. Procedeu-se a dissecação dos tendões do músculo plantaris longus (NOBLE, 1955) que foram imediatamente congelados quando destinados aos experimentos bioquímicos ou fixados de diferentes formas quando destinados aos estudos morfológicos.

Análises morfológicas

Fixação e obtenção de cortes histológicos

Após dissecação os tendões foram fixados em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 adicionando-se glutaraldeído 25% na proporção de 6:4 (v:v). O material foi então lavado em água destilada corrente e desidratado em série etanólica crescente. Seguindo um banho rápido em xilol P.A., os tendões foram diafanizados em óleo de cedro e embebidos em Paraplast Plus Embedding Medium. Cortes sagitais ou perpendiculares ao longo eixo do tendão foram preparados em micrótomo Reichert. A remoção da resina de inclusão foi efetuada por banhos em xilol (2x30 min.) e misturas de álcool-xilol (1:1)(1h) e metanol-clorofórmio (1:1) (2 a 24h).

Testes topoquímicos

Proteínas: Radicais eletropositivos totais foram investigados pelo uso dos corantes xylydine ponceau 3RS 0,1% a pH 1,7 (VIDAL, 1970), sirius red F3B 0,1% a pH 2,7 (VIDAL et alii, 1982) e pelo picrossírius (Sirius red 0,1% em solução saturada de ácido pícrico)(SWEAT et alii, 1964).

Polissacarídeos neutros e glicoproteínas: Foi utilizado o teste de PAS, com oxidação pelo ácido periódico 0,5% por 30 min. e tratamento pelo reativo de Schiff por 40 min. Este teste foi empregado após tratamento por boroidreto de sódio 1% em água por 30 min., visando o bloqueio de aldeídos teciduais e mesmo de resíduos do fixador.

Glicosaminoglicanos ácidos: Foram empregados o azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine em pHs 2,5 e 4,0 e o azul de alcian aos pH 2,5 e pH 1,0 (LISON, 1960; LEV & SPICER, 1964). Testes de metilação

e de metilação seguida de saponificação, acompanhados de coloração pelo azul de alcian a pH 2,5 (LILLIE, 1958) foram utilizados para distinção entre glicosaminoglicanos sulfatados e carboxilados. Também o método de concentração crítica de eletrólitos, utilizando o azul de alcian e cloreto de magnésio em diferentes concentrações foi empregado (SCOTT & DORLING, 1965).

O efeito de remoção enzimática foi testado empregando-se hialuronidase testicular (Merck) 1% em salina fisiológica tamponada com fosfato (PBS) por 2 horas a 37°C.

Anisotropias ópticas

Birrefringência e dicroísmo linear foram investigados em microscópio de polarização Zeiss.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos de tecido obtidos das regiões de tensão e de compressão foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Esta etapa foi seguida por lavagens com o mesmo tampão e por tratamento pelo ácido tânico 1% no mesmo tampão por uma hora. Seguiram-se lavagens sucessivas antes da pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% também no mesmo tampão. O material foi então desidratado em concentrações crescentes de acetona, e deixado por uma noite em uma mistura de acetona e Epon 812 (1:1), sendo finalmente incluídos em Epon 812. Cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante e corados com acetato de uranila a 2% em água e com citrato de chumbo a 0,2% em NaOH 0,1N (REYNOLDS, 1963).

Como variantes da fixação foram empregados o ácido tânico 1% e glutaraldeído 2,5% em tampão de Millonig, seguido de pós-fixação em tetróxido de ósmio, mantendo-se o procedimento de COTTA-PEREIRA e colaboradores (1976a) e o vermelho de rutênio segundo LUFT (1971). Observações e micrografias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Phillips 301.

As análises morfométricas foram efetuadas com auxílio de equipamento Kontron MOP Videoplan em ampliações fotográficas de negativos obtidos na microscopia eletrônica de transmissão, com aumento final de 68.000X.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Logo após a remoção, os tendões foram congelados em nitrogênio líquido e fraturados em plano sagital, mantendo-se o procedimento de MINNS & STEVEN (1977). As superfícies expostas foram então fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 ao qual adicionou-se glutaraldeído 25% na proporção de 6:4 (v:v). O material foi então lavado em água destilada e desidratado em série etanólica crescente. Para observação dos elementos celulares, os tendões foram primeiro fixados como acima e só então fraturados. Alguns tendões foram submetidos a tratamentos enzimáticos pela papaina (Merck) a 0,26% em tampão fosfato 50mM, pH 6,5, contendo NaCl 0,9%, cisteína 0,08% e EDTA 0,9% por 2 horas a 37°C ou pela hialuronidase testicular (Serva/Merck) a 1% em salina fisiológica tamponada (PBS) por 45 minutos a 37°C, logo após a fratura e antes da fixação. Após o tratamento enzimático o material foi lavado com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e então fixado como acima.

Parte do material foi fraturado e fixado imediatamente na mistura de paraformol-glutaraldeído preparada como acima contendo vermelho de rutênio a 1500 ppm por uma noite a 4°C. Alguns tendões foram também tratados pela papaína da mesma forma descrita acima, antes do tratamento pelo vermelho de rutênio.

Após fixação o material foi lavado com água destilada, desidratado em série etanólica crescente e tratado por etanol P.A. por pelo menos 1 hora. Seguiu-se o procedimento de secagem ao ponto crítico e vaporização com ouro em atmosfera de argônio. As observações foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL T300, com 20 kV de aceleração de voltagem. Micrografias foram obtidas com o emprego de filme Neopan 100 ASA, 120mm.

Análises Bioquímicas

Determinação do conteúdo em água

Fragmentos da região de tensão e da região de compressão foram imersos em acetona por 24 horas e então deixados secar por 48-72h. O conteúdo em água foi determinado pela razão entre o peso seco e o peso do material fresco utilizado.

Caracterização dos proteoglicanos

Extração

Fragmentos de ambas as regiões do tendão foram extraídos com 10-12 volumes de cloreto de guanidina (Gu-HCl) 4M em tampão acetato 50 mM, pH 6,0, contendo EDTA 20mM e PMSF 1mM, como inibidores de proteases endógenas, por 48 horas sob agitação a 4°C. O material não solubilizado foi removido por centrifugação a 15.000 rpm em rotor Beckman JA20. Este procedimento solubiliza mais de 95% da matéria seca do tendão.

Quantificação de glicosaminoglicanos

Fragmentos de tecido foram tratados com acetona por 24 horas e deixados secar ao ar por 24-48 horas. Um miligrama de tecido seco foi incubado em 1ml de tampão acetato 0,1M, pH 5,5 contendo 1 mg de papaína, EDTA 5mM e cisteína 5mM, de acordo com HARAB & MOURÃO (1989) por 24 horas a 37°C. O material foi centrifugado por 10 minutos a 1000xg, o sobrenadante foi recolhido e ao precipitado foi adicionado mais 1ml da solução de papaína. Após 24 horas adicionais de digestão a 37°C o material foi novamente centrifugado e o sobrenadante reunido com aquele obtido anteriormente. Os glicosaminoglicanos foram então precipitados com 2 volumes de etanol P.A. gelado e então deixados por 24 horas a -20°C. O precipitado foi recolhido por centrifugação e diluído em 1ml de água destilada. Alíquotas desta solução foram submetidas ao teste do carbazol segundo DISCHE (1947). Resumidamente o volume das alíquotas contendo os glicosaminoglicanos foi acertado para 0,5ml com água e de 3ml de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados. Ferveu-se a

mistura por 20 minutos. Após amostras terem sido resfriadas em água corrente foram adicionados 100 µl de solução de carbazol (1mg/ml em solução de acetona a 4% em etanol). Após 2 horas determinou-se a absorbância da solução final em 530nm. Os padrões empregados continham de 10 a 100 µg de condroitino sulfato (mistura de isômeros, Sigma).

Cromatografia de troca aniônica – DEAE-celulose

O material extraído por Gu-HCl foi dialisado contra uréia 7M em tampão acetato 50mM, pH 6,0, e submetido a cromatografia de troca aniônica em DEAE-Servacel (15 ml de volume total). A aplicação do material foi feita segundo a relação de cerca de 1mg de ácido urônico por 10 ml de coluna. O material não ligado foi removido por lavagem com o tampão contendo uréia (3 volumes da coluna), enquanto o material ligado à coluna foi eluído com gradiente de NaCl (EVANKO & VOGEL, 1990) de 0 a 1M no mesmo tampão. Aliquotas de 2.0ml foram coletadas. O fluxo da coluna foi de 0,5ml/min..

Eletroforese em gel de agarose-acrilamida

Os glicosaminoglicanos solubilizados por tratamento pela papaína e os proteoglicanos extraídos por Gu-HCl foram submetidos a eletroforese em gel de agarose(0,6%)-acrilamida (1,2%) (MCDEVITT & MUIR, 1972), adaptado para o sistema em placas da forma descrita por MCDEVITT (1990).

Filtração em gel de Sepharose CL4B

O material extraído por Gu-HCl 4M de cada região do tendão foi submetido a filtração em gel de Sepharose CL-4B equilibrada com Gu-HCl 4M em tampão acetato 50mM, pH 6,0. As dimensões da coluna foram de 0,6X50cm e a eluição foi efetuada com Gu-HCl 4M, com fluxo de 12ml/hora (EVANKO & VOGEL, 1990). Aliquotas de 2ml foram coletadas e analisadas quanto a absorção em 280nm. O volume morto da coluna foi determinado com azul de dextrana (2.000; Sigma) em corrida prévia, onde 200 µg de dextrana foi dissolvida em 200 µl do tampão contendo Gu-HCl e submetido à filtração nas mesmas condições descritas acima.

Ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο

Fragmentos de ambas as regiões do tendão foram extraídos com 12 volumes de Gu-HCl 4M como acima. Após remoção do resíduo insolúvel por centrifugação adicionou-se CsCl na proporção de 0,35g por grama de sobrenadante (VOGEL & HEINEGARD, 1985; HEINEGARD & SOMMARIN, 1987b). O material foi então submetido a ultracentrifugação em rotor 80Ti (Beckman), a 34.000 rpm por 62 horas a 15°C. Após centrifugação o material foi dividido em quatro frações (D1-D4) cuidadosamente separadas por aspiração com uma seringa. A densidade das frações obtidas foi determinada gravimetricamente. As frações foram analisadas quanto à absorbância em 235 e 280nm, conteúdo em ácido urônico pelo método de DISCHE (1947) e de proteínas pelo método de BRADFORD (1976), e submetidas a eletroforese em gel preparado com gradiente de poli(acrilamida de 3 a 15% ou em gel de agarose-acrilamida da forma descrita acima.

Caracterização do material colagênico

Extração e purificação de colágenos

A extração de colágenos foi levada a efeito por incubação de fragmentos de tecido de cada uma das regiões do tendão com pepsina 1% em ácido acético 0,5M por 20 horas a 4°C sob agitação, após a extração dos proteoglicanos com Gu-HCl 4M como acima. Como este procedimento resultou em fragmentação das moléculas de colágeno, procedeu-se com a incubação com pepsina nas mesmas condições como acima, sem o tratamento prévio por Gu-HCl. O material solubilizado foi submetido a precipitação diferencial por NaCl em diferentes concentrações (0,9M, 1,0M, 1,2M e 2,0M) em ácido acético 0,5M, através de diálise contra um grande volume de solução na concentração desejada, segundo o procedimento descrito por MILLER & RHODES (1982). Alternativamente o material extraído em meio ácido foi dialisado contra NaCl 1M em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 e então submetido à precipitação diferencial (MILLER & RHODES, 1982, MILLER, 1984). O material precipitado em cada concentração foi então recolhido por centrifugação a 20.000 rpm em rotor Beckman JA-20 por 25 minutos a 4°C e resuspenso em 100 a 200 µl de ácido acético 0,2M. Os diferentes materiais obtidos foram submetidos a eletroforese em poliacrilamida em presença de SDS, em gel preparado a 6% ou com gradiente de concentração de 3-15% e revelados pela prata ou corados pelo Coomassie Blue R250. O teste do PAS foi aplicado aos géis após eletroforese para a identificação de carboidratos associados aos polipeptídeos (GERARD, 1990).

Cromatografia de troca catiônica - CM-celulose

Colágeno tipo I obtido de pele de rã pelo procedimento acima foi submetido a cromatografia de troca catiônica (MILLER & RHODES, 1982). O material foi dialisado contra tampão acetato de sódio 0,06M, pH 4,8 e aplicado em coluna contendo 10ml de resina (CM-Servacel), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Todo o procedimento é realizado a 43°C e o material a ser aplicado é previamente denaturado mantendo-o a 43°C por 15 minutos. Após a aplicação da amostra (cerca de 5 mg), a coluna é lavada com 4-5 volumes de tampão de aplicação e eluído com gradiente de NaCl de 0,025 a 0,1M. O volume total do gradiente foi de 100ml. O gradiente utilizado foi estabelecido experimentalmente, visando uma melhor distinção dos picos resolvidos pela cromatografia. As frações obtidas foram analisadas quanto à absorbância a 221nm e alíquotas foram precipitadas com 5-10 volumes de etanol PA, dissolvidas em tampão de amostra próprio para material colagênico (MILLER & RHODES, 1982) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em presença de SDS.

Procedimento de eletroeluição das cadeias de colágeno I

Após purificação do colágeno I por precipitação com NaCl 1.5M em salina neutra, as suas cadeias alfa foram obtidas por eletroeluição, segundo o protocolo de HARRINGTON (1990). Resumidamente, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em presença de SDS e em condições redutoras obtidas pela adição de 2-mercaptoetanol a 0,5% no tampão de amostra, coradas pelo Coomassie Blue (0,1% em solução de metanol 40% e ácido acético 10% em água) por cerca de 30 minutos e descoradas rapidamente na mesma solução acima sem o corante. As bandas de interesse são então recortadas do gel e colocadas em tubos de eletroforese vertical vedados por fragmentos de sacos de diálise nas duas extremidades e adaptados

a sistema de eletroforese em disco. Os polipeptídeos são então removidos do gel por eletroforese (4mA por tubo). Após eletroeluição, os fragmentos de gel são removidos e os polipeptídeos são então precipitados por etanol (5-10 volumes). Pequenas frações dos materiais obtidos foram submetidas a nova eletroforese revelada pela prata para verificação da sua pureza.

Análise de aminoácidos

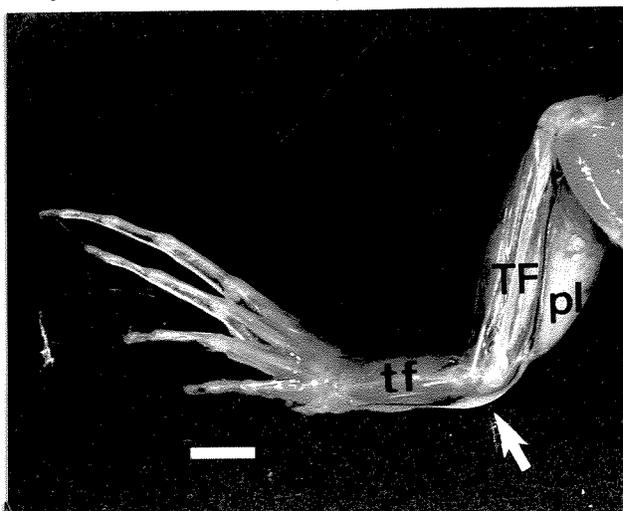
Análises de aminoácidos foram efetuadas em sistema Pico-Tag Waters. As amostras foram hidrolisadas por 24 horas a 105°C por vapores de HCl em atmosfera de N₂. O material hidrolisado foi então lavado com 20 ml de solução de metanol:água:triethylamina (2:2:1) (v:v:v), submetido a secagem a vácuo. A solução de derivatização foi preparada a fresco e consistiu de metanol:triethylamina:água:fenilisotiocianato na proporção de 7:1:1:1 (v:v:v:v), sendo que 20 µl foram aplicados a cada amostra. A reação prosseguiu por 30 minutos à temperatura ambiente. O material foi novamente seco a vácuo para a completa remoção do fenilisotiocianato. Cada amostra foi dissolvida em 50 µl de solução de 5% acetonitrila em fosfato de sódio 0,4M titulado por ácido fosfórico 10% até pH 7,4. Os derivados de feniltiocarbamil (PTC) dos aminoácidos foram aplicados no analisador e separados por HPLC com coluna C18/uBondapack em cromatografia de fase reversa, com um gradiente linear de 20,5 minutos de 0 a 100% de acetonitrila a 60%. Os derivados PTC-aminoácidos são detectados a 254 nm a níveis de 1 picomol.

Foram utilizados padrões de aminoácidos, inclusive de hidroxiprolina. A identificação e quantificação de cada aminoácido foram feitas por comparação com uma corrida padrão de PTC-aminoácidos. O tempo de retenção da hidroxilisina foi determinado por exclusão após adição de hidroxiprolina aos aminoácidos padrões. Para o cálculo do conteúdo absoluto de aminoácidos foram empregados os valores obtidos com a prolina e com a lisina para a hidroxiprolina e para a hidroxilisina, respectivamente.

Resultados

Aspectos Anatômicos

O tendão do músculo plantaris longus empregado neste estudo é similar anatomicamente aos tendões de mamíferos e representam, ao menos a princípio, o mesmo modelo biomecânico. Estes tendões passam sob uma extremidade óssea ou articulação em seu trajeto do músculo até a sua inserção. No local específico de curvatura, eles recebem forças de compressão durante o movimento da pata. No caso dos bovinos e de cães, o tendão flexor digital profundo contorna os ossos sesamóides da articulação metatarsofalangeal, enquanto o tendão contorna a articulação tibial distal. Na rã são observados alguns aspectos peculiares, como a fusão da tíbia e da fíbula, constituindo um osso único, e o alongamento dos ossos tibial e fibular, que chegam a constituir um segmento adicional (ROMER, 1970). Os ossículos dos dedos também são bastante alongados. A movimentação dos dedos é bastante restrita face à existência de uma membrana interdigital. Além disso, a flexão dos dedos é realizada pelo próprio tendão do músculo plantaris longus que se divide e estende-se a cada um deles. Este arranjo faz com que a pata funcione como um todo, em especial nos saltos e durante o nado. Este tendão sofre uma mudança brusca de direção para inserir-se na pata. Na região em que o tendão muda de direção ele submete-se às forças de compressão exercidas pela extremidade distal do osso tibio-fibular (Fig. 1). A maior parte do tendão está recoberta por uma cápsula sinovial que delimita o espaço sinovial. Esta cápsula é resistente e esbranquiçada e atua mantendo o tendão fixo na posição, embora permitindo o seu deslizamento durante a movimentação da pata.



1). A maior parte do tendão está recoberta por uma cápsula sinovial que delimita o espaço sinovial. Esta cápsula é resistente e esbranquiçada e atua mantendo o tendão fixo na posição, embora permitindo o seu deslizamento durante a movimentação da pata.

Fig. 1 - Aspectos anatômicos das patas de rãs

Nesta figura salienta-se a posição ocupada pelo tendão (seta) do músculo plantaris longus (pl), que foi empregado neste estudo. TF - Tíbia e fíbula; tf - ossos tibiale e fibulare. Barra = 1cm.

A região do tendão que recebe as forças de compressão exibe um espessamento. Cerca de 3/4 desta região espessada sofre modificações que a fazem lembrar de alguma forma uma estrutura cartilaginosa, quer seja por sua cor e resistência ao toque (ou mesmo por seus aspectos histoquímicos tratados a seguir). Embora imediatamente reconhecida como uma região do tendão que se modifica frente à existência de forças mecânicas distintas, e que se assemelha em muitos aspectos aos seus equivalentes em mamíferos, este tendão diferencia-se deles já a nível anatômico, sendo que a principal diferença está na formação de uma saliência desenvolvida, com margens bem definidas, ao contrário dos tendões flexores de mamíferos que apesar de também se espessarem, o fazem gradual e menos proeminente, assumindo um aspecto lenticular.

Aspectos Histológicos

A porção do tendão que recebe forças de compressão apresenta duas regiões diferenciadas (Figs. 2-5). A primeira, com aspecto típico de tendão e que se designará simplificada de região de tensão é a responsável pela transmissão da força muscular que movimentam a pata nos saltos e durante o nado. Como na maioria dos tendões, esta região é composta por feixes espessos alinhados entre si. Suas células são alongadas, com aspectos típicos de fibroblastos (Fig. 2) e localizam-se entre os feixes, acompanhando sua direção. Sua periferia é diferenciada num paratenon visceral, onde os feixes de colágeno são mais finos e arrançados de outra maneira. A segunda região, que se articula com a extremidade óssea e recebe as forças de compressão, exibe uma organização complexa de feixes e fibras associados com material de aspecto não fibrilar. Inúmeros feixes são encontrados em continuidade com a região de tensão e dispendo-se perpendicularmente a ela (Figs. 4-5). Estes são os feixes mais espessos encontrados na região de compressão e, quando penetram nela, assumem aspecto torcido ou ondulado. Entretanto, a maioria dos feixes desta região são bem mais delgados que aqueles da região de tensão e são encontrados ao lado de inúmeras fibras extremamente finas e livres. Este conjunto de feixes primários e de fibras finas forma uma trama tridimensional sem qualquer indício de organização mais definida ou regular. Em algumas zonas desta região observa-se uma organização ligeiramente semelhante à cartilagem fibrosa (Fig. 10). As células da região de compressão são arredondadas, com citoplasma abundante e núcleo esférico, organizando-se em grupos entre os feixes mais espessos (Figs. 3, 6 e 7). Na região em que se observa uma predominância de elementos fibrosos, as células são mais alongadas e mais parecidas com fibroblastos. Na superfície dos feixes da região de compressão pode-se observar a deposição de material corado pela hematoxilina (Fig. 3). Além disto, a matriz da região de compressão apresenta intensa basofilia, o que indica a presença de grande quantidade de glicosaminoglicanos (Fig. 8). Existe ainda uma região de transição onde os feixes de colágeno ainda estão alinhados mas com aspectos distintos. Nesta região já existe uma ligeira deposição de glicosaminoglicanos entre os feixes e as células não são mais tão alongadas (Figs. 4 e 5) e acumulam grânulos metacromáticos no citoplasma.

A observação de cortes transversais do tendão demonstrou a existência de um arranjo aparentemente mais organizado dos componentes fibrosos (Figs. 8 e 9), o que não foi identificado nos cortes sagitais. Foi verificado que a região de compressão é praticamente envolvida pela região de tensão e que existe um conjunto de feixes de colágeno que atravessa a região de compressão (Fig. 8).

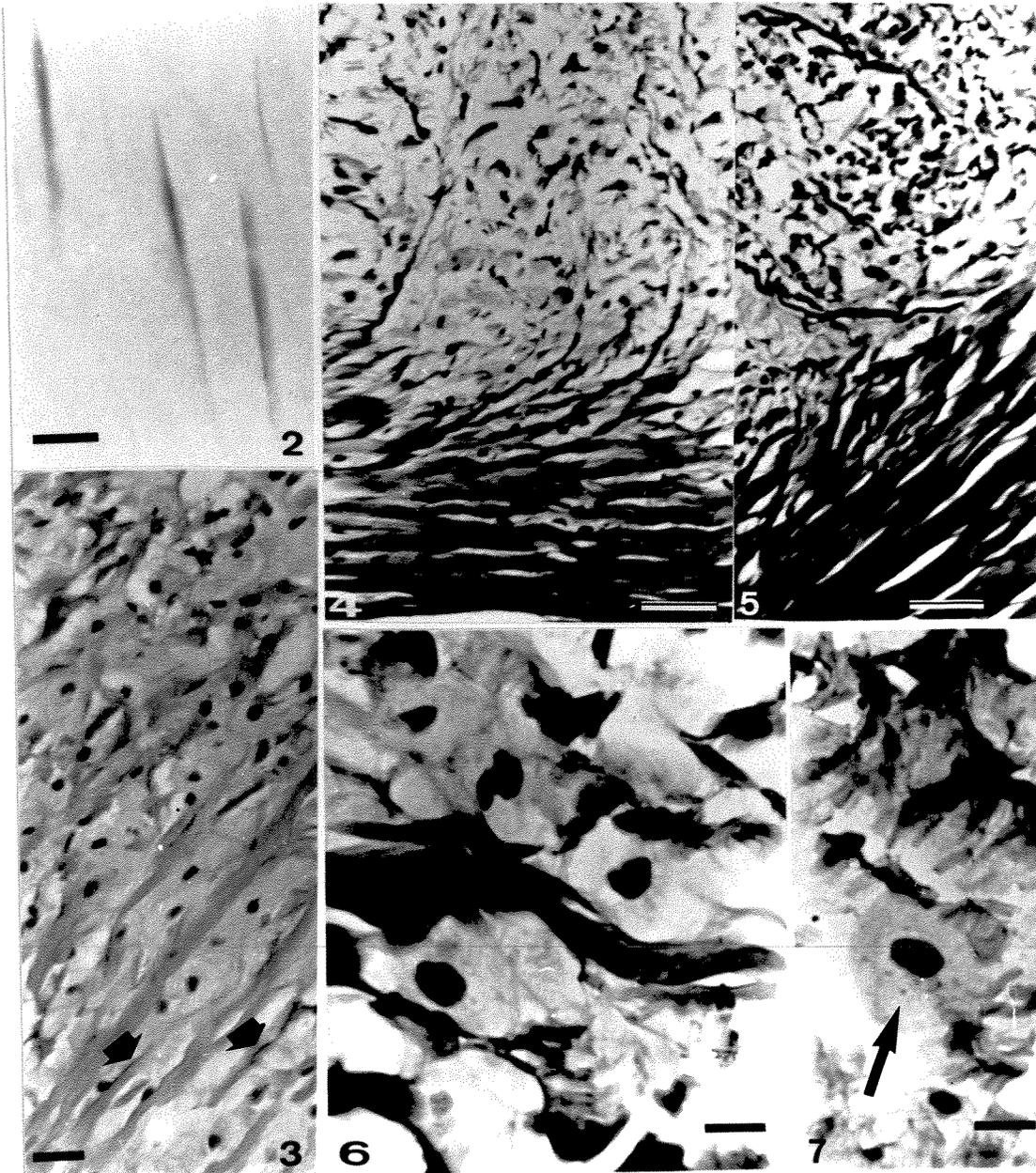
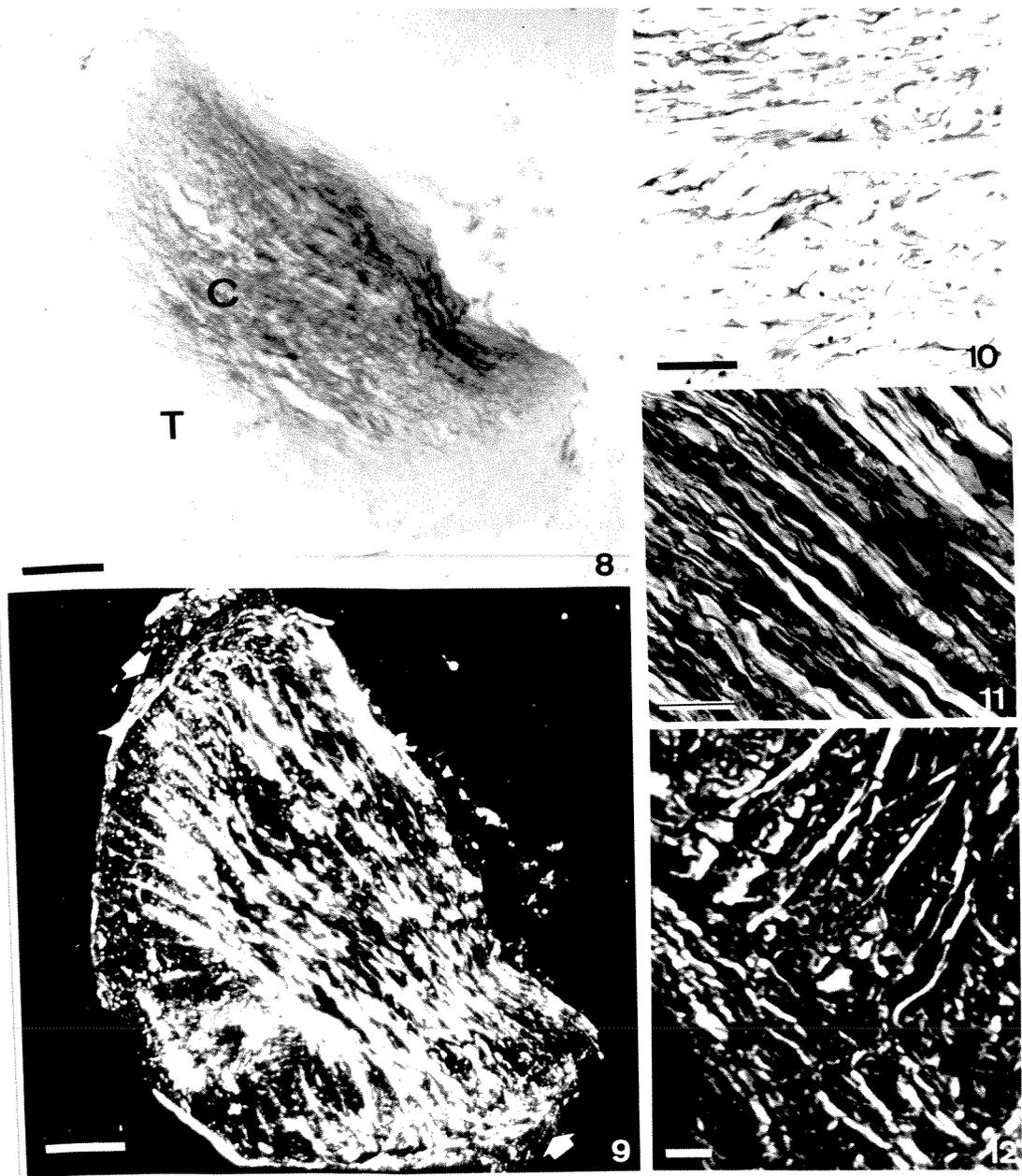


Fig. 2 e 3 - Corte histológico de tendão de rã corado pela hematoxilina-eosina.

A Fig. 2 mostra aspectos típicos dos fibroblastos da região de tensão. As células alinham-se com os feixes de colágeno que praticamente não se coram. A Fig. 3 exhibe aspecto típico da região de compressão, composta por feixes pouco compactos entre os quais encontram-se células arredondadas, com citoplasma abundante e núcleo aparentemente condensado. Em alguns pontos observa-se a deposição de material corado pela hematoxilina na superfície dos feixes (seta). Fig. 2, Barra = 10 μ m; Fig. 3, Barra = 20 μ m.

Figs. 4-7 - Corte histológico de tendão de rã submetido a coloração pelo tricrômio de Masson.

As Figs. 4 e 5 mostram aspectos das regiões de tensão e de compressão do tendão. Os feixes de colágeno de ambas as regiões coram-se da mesma cor (vermelha), à exceção das fibrilas mais finas da região de compressão que exibem coloração distinta (verde). É também aparente que alguns dos feixes da região de compressão originam-se na região de tensão e que, ao deixarem esta última eles assumem trajeto sinuoso e estão dispersos numa matriz não fibrosa. As Figs. 6 e 7 são detalhes da região de compressão, onde é observado um feixe de aspecto ondulado. As células possuem citoplasma ligeiramente corado e, algumas vezes, granulações citoplasmáticas (seta). Figs. 4 e 5, Barras = 100 μ m. Figs. 6 e 7, Barras = 10 μ m.



Figs. 8 e 9 - Corte transversal na posição mediana de tendão de rã, corado pela azul de toluidina a pH4,0.

No corte transversal da Fig. 8 observa-se que a região de tensão (T) praticamente envolve a região de compressão (C), que é muito mais basofílica. Neste corte observa-se a predominância de componentes fibrosos dispostos paralelamente entre si e transversalmente com relação ao longo eixo do tendão, fazendo a ligação entre as extremidades da região de tensão. Nota-se ainda que o paratenon visceral apresenta fibras paralelas ao plano de corte, i.e. perpendiculares ao longo eixo do tendão. A Fig. 9 corresponde ao mesmo corte da Fig. 8, agora observado à microscopia de polarização. Além de ser salientada a direção dos componentes fibrosos, nota-se também que alguns destes elementos têm origem no paratenon visceral (setas). Figs. 8 e 9, Barras = 500 μ m.

Figs. 10-12 - Detalhes de um corte transversal do tendão de rã, corado pelo azul de toluidina a pH4,0.

A Fig. 10 mostra a existência de uma área mais fibrosa ao lado de uma área com células semelhantes a condrocitos. Observa-se a deposição de material basofílico entre os feixes de colágeno, em especial na suas superfícies. As células associadas à região mais fibrosa têm aspectos semelhantes a fibroblastos. A Fig. 11 exhibe um detalhe da porção fibrosa da região de compressão, destacando o aspecto pouco compacto dos feixes, bem como a ondulação típica que apresentam nesta região. Na Fig. 12 observa-se que alguns dos elementos fibrosos que atravessam a região de tensão e inserem-se na região de compressão têm origem no paratenon visceral. Figs. 10-12, Barras = 50 μ m.

Histoquímica

Intensas respostas ao xylydine ponceau (Fig. 15-17), ao sÍrius red e ao picosÍrius foram verificadas na região de tensão. Feixes espessos e fibras dispersas da região de compressão são reativos aos mesmos corantes (Figs. 13,18-22). Algumas zonas de coloração moderada, aparentemente de caráter não fibrilar são identificadas entre os feixes da região de compressão. Feixes, fibras e este material não fibrilar coram-se pelo sÍrius red (Fig. 21). A resposta ao picosÍrius é distinta, sendo que os feixes e fibras coram-se em vermelho enquanto o material não fibrilar apresenta coloração amarela, não sendo aparente na figura em preto e branco (Fig. 22). Após coloração pelos corantes acima, o material apresenta incremento na intensidade de birrefringência e passam a exibir dicróismo linear, que são parâmetros associados à ordenação molecular do substrato, capaz de induzir a deposição ordenada das moléculas do corante. A região de tensão assemelha-se aos tendões típicos no que se refere a estas anisotropias.

A observação de cortes transversais do tendão demonstrou a existência de um arranjo aparentemente mais organizado dos componentes fibrilares (Figs. 8 e 9), o que não foi identificado no corte sagital. Foi verificado que a região de compressão é praticamente envolvida pela região de tensão e que existe um conjunto de feixes de colágeno que atravessa a região de compressão, unindo duas extremidades da região de compressão (Fig. 8).

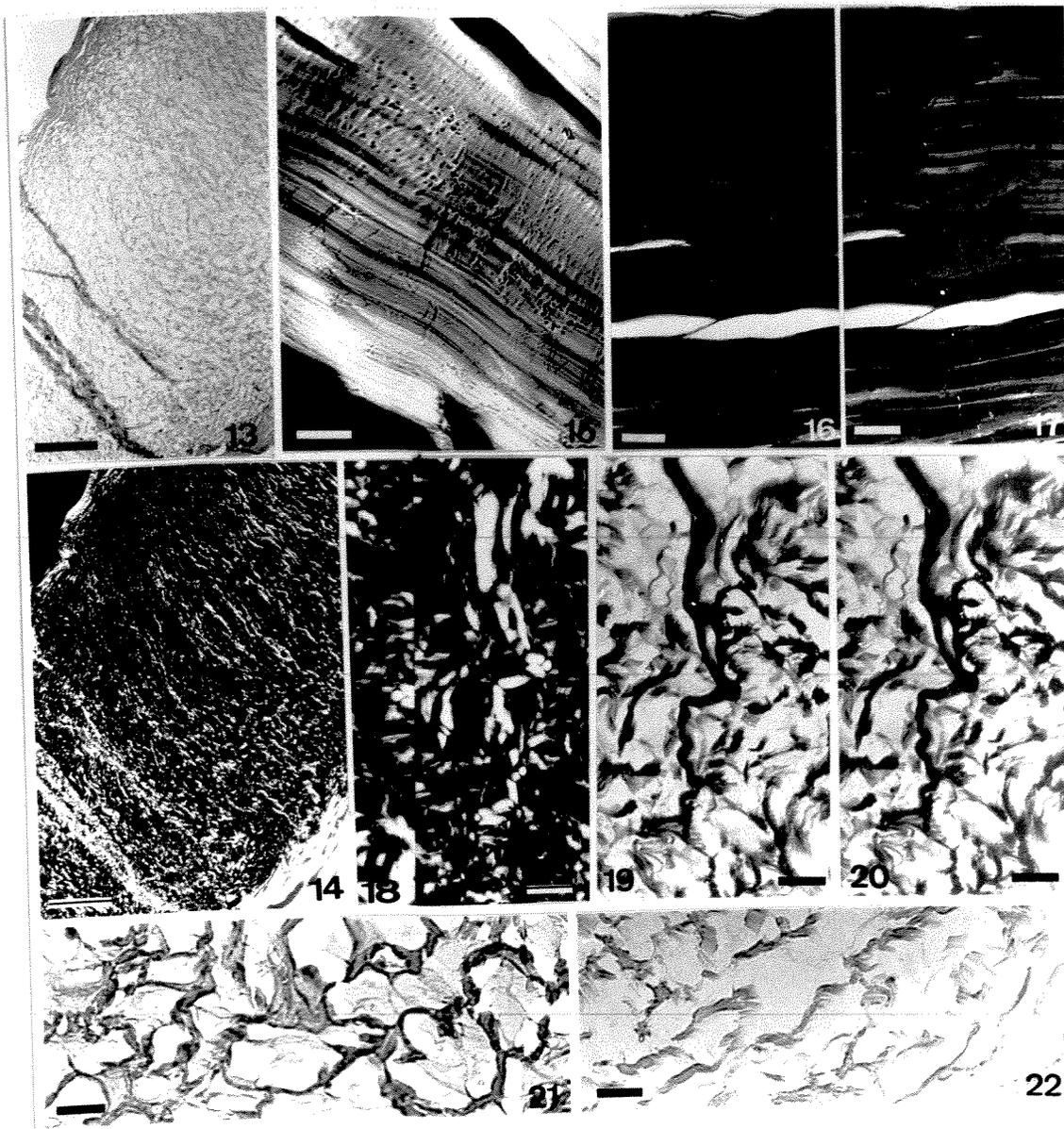
A região de tensão cora-se fracamente pelo PAS. O mesmo padrão é apresentado pelos feixes da região de compressão. Além disto, uma intensa reatividade foi observada em material intimamente associado à superfície dos feixes e fibras nesta região. Também o paratenon justaposto à região de compressão exibe alta reatividade ao PAS.

Após tratamento pelo azul de alcian verificou-se intensa coloração da região de compressão, em especial junto à superfície dos feixes e em material disperso entre eles (Fig. 23). Não foram notadas diferenças de coloração entre os pH 2,5 e pH 1,0. Reações de metilação e de metilação seguida de saponificação resultaram em perda de reatividade ao azul de alcian, sugerindo que a coloração observada na região de compressão deve-se principalmente à presença de glicosaminoglicanos sulfatados.

As respostas à coloração pelo azul de toluidina seguindo variações de pH são mostradas nas Figuras 8, 10 e 24-29. Adicionalmente, os tratamentos pela hialuronidase testicular e pela papaina removem toda a reatividade ao azul de toluidina aos pH 4,0 e pH 2,5, exceto pela presença de grânulos citoplasmáticos, corados metacromaticamente em células na vizinhança do tendão (prováveis mastócitos) e pela coloração dos núcleos, que também não se altera. A coloração pelo azul de alcian no sistema azul de alcian/Mg²⁺ é praticamente inalterada nas concentrações menores de Mg²⁺ e abolida na concentração de 0,9M, sugerindo mais uma vez a natureza sulfatada dos glicosaminoglicanos da região de compressão.

Anisotropias Ópticas

Observações à microscopia de polarização revelaram a distribuição preferencial dos componentes fibrilares observados em corte transversal do tendão (Fig. 9). Além disto, esta microscopia também mostrou que as fibras que estão preferencialmente alinhadas no corte transversal possuem trajeto sinuoso e aspectos de desagregação (Fig. 11), e que estas mesmas fibras originam-se no paratenon visceral e atravessam a região de tensão (onde se dispõem perpendicularmente às fibras principais) antes de atingirem a região de compressão (Fig. 12).



Figs. 13-20 - Cortes histológicos de tendão de rã, corados pelo Xylidine Ponceau a pH 2.5.

A Fig. 13 exibe aspectos gerais da região de compressão do tendão, cujos feixes de colágeno identificados pela coloração formam um rendilhado. A Fig. 14 corresponde a imagem obtida à microscopia de polarização da mesma região mostrada na figura anterior, onde salienta-se uma ligeira organização dos feixes da região de compressão, de modo perpendicular aos feixes da região de tensão. Figs. 13 e 14, Barras = 200 μ m. As figuras 15 a 17 são detalhes da região de tensão observada ao microscópio de polarização. Após coloração, a birrefringência observada é mais intensa (15). Após coloração o material exibe dicróismo linear extrínseco positivo bastante intenso, detectado pelo posicionamento do material paralela (16) e perpendicularmente (17) ao eixo de propagação da luz polarizada. As figuras 18-20 são detalhes da região de compressão, observada ao microscópio de polarização. Apesar de contorcidos e pouco compactos os feixes da região de compressão ainda exibem birrefringência (18) e dicróismo linear extrínseco positivo (Fig. 19 - absorção paralela; Fig. 20 - absorção perpendicular ao plano de propagação da luz polarizada). Figs. 15-20, Barras = 20 μ m.

Fig. 21 - Aspecto da região de compressão em corte histológico de tendão de rã corado pelo sírius red.

Após coloração pelo sírius red, os feixes da região de compressão coram-se intensamente vermelhos. Além disto observa-se que entre os feixes existe ainda um material aparentemente não fibrilar que também cora-se em vermelho. Barra = 20 μ m.

Fig. 22 - Aspecto da região de compressão em corte histológico de tendão de rã corado pelo picrosírius.

A coloração pelo picrosírius salienta os feixes da região de compressão, corados em vermelho-alaranjado, e o material aparentemente não fibrilar corado em amarelo (não aparente na fotografia). Barra = 20 μ m.

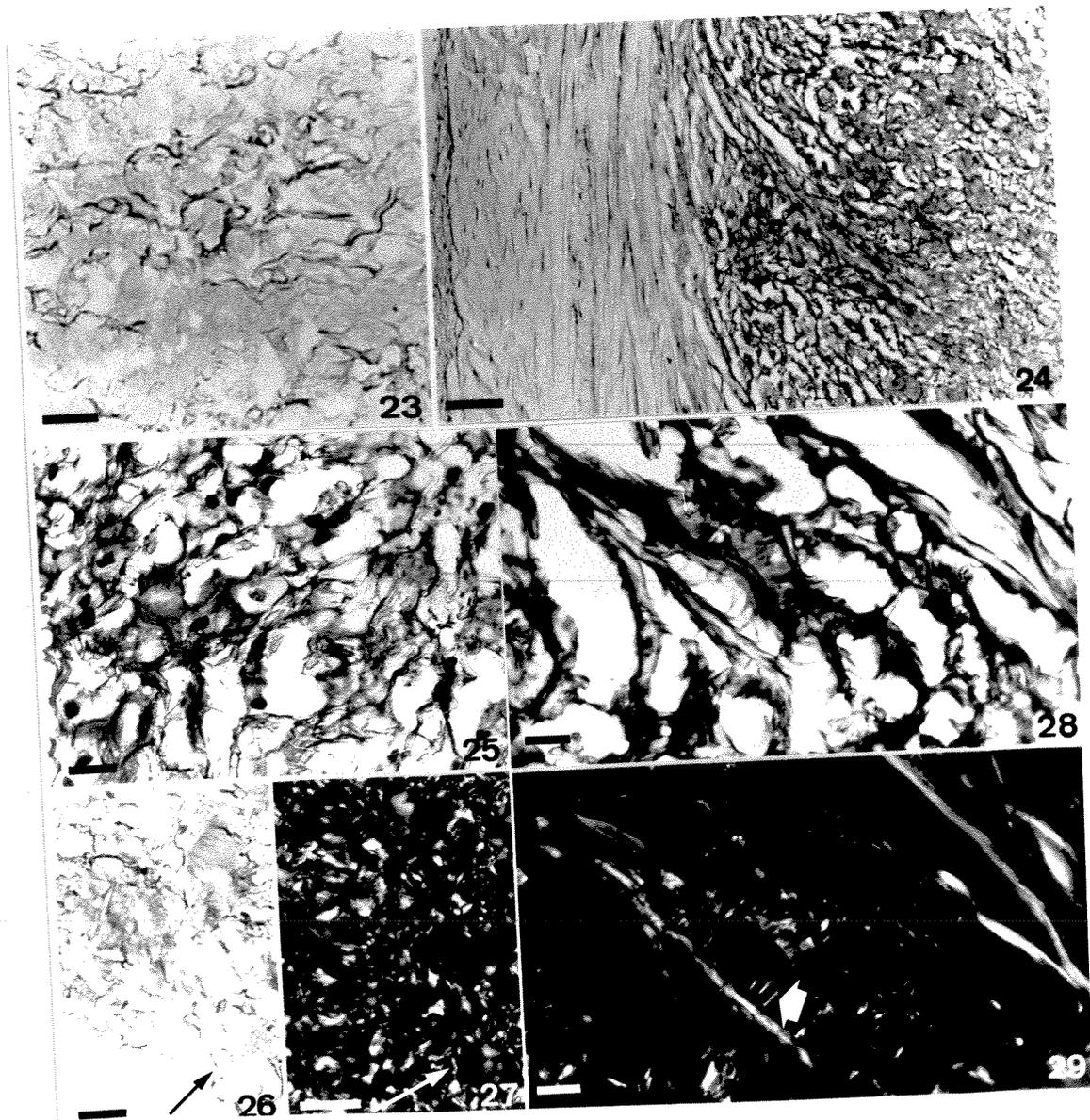


Fig. 23 - Aspecto da região de compressão em um corte histológico de tendão de rã após coloração pelo azul de alcian a pH2,5.

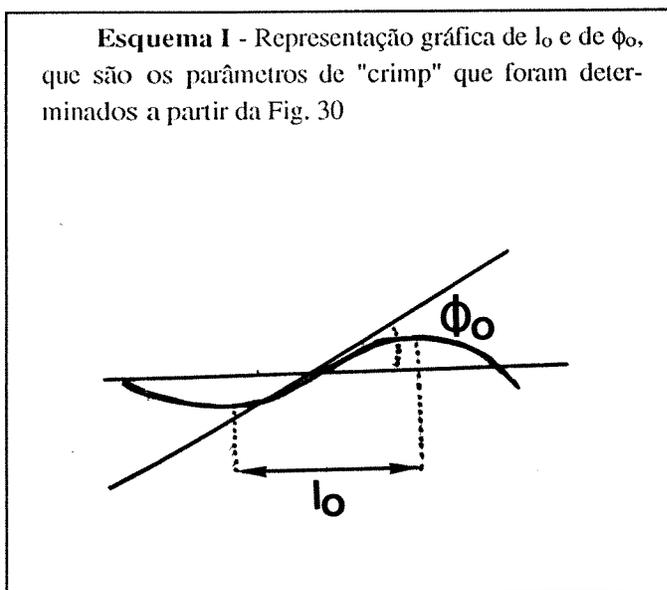
O azul de alcian revela a existência de material basofílico que acumula-se na superfície dos feixes de colágeno e de um material aparentemente não fibrilar e fracamente corado, disperso entre eles. Barra = 50 μm .

Figs. 24-29 - Aspectos de cortes histológicos de tendão de rã corados pelo azul de toluidina.

Na Fig. 24 pode-se comparar a coloração exibida pelas regiões de tensão e de compressão do tendão, após tratamento pelo azul de toluidina a pH2,5. Salienta-se o acúmulo de material basofílico na região de compressão e a virtual ausência de coloração da região de tensão. Barra = 100 μm . A Fig. 25 mostra um aspecto da região de compressão após coloração pelo azul de toluidina a pH 4,0. A coloração de componentes da matriz é salientada, em especial do material associado às superfícies dos feixes e de um material aparentemente não fibrilar. Nestas condições, o citoplasma das células exibe uma fraca coloração. Barra = 50 μm . A Fig. 26 e 27 mostram aspectos da coloração pelo azul de toluidina à luz ordinária e ao microscópio de polarização, respectivamente. Nota-se que o material associado aos feixes exibe birrefringência (setas) e que, também o material aparentemente não fibrilar apresenta birrefringência, atestando uma distribuição preferencial dos componentes que se coram pelo azul de toluidina, ou seja, os glicosaminoglicanos. Barras = 50 μm . As Figs. 28 e 29 são detalhes das duas figuras anteriores, salientando-se o carácter fibrilar do material basofílico encontrado entre os feixes de colágeno (setas). Barras = 20 μm .

Tabela II. Parâmetros de "crimp" das três diferentes áreas da região de tensão na porção mediana do tendão de rã, apontadas na Fig. 30.

Zona	$2l_0$ (μm)	ϕ_0
I	43	12-15°
II	36	19-20°
III	12	22-24°



A região de tensão do tendão apresenta aspectos típicos dos tendões em geral. Além de intensa birrefringência, a região de tensão exibe pelo menos três áreas distintas com relação ao padrão de "crimp" (Fig. 30), considerando-se a porção mediana do tendão. Nestas três regiões os padrões de crimp foram caracterizados segundo os parâmetros de $2l_0$ e ϕ_0 (Esquema I e Tabela II). Embora esteja sendo considerado o padrão de "crimp" da região de tensão apenas na porção mediana do tendão, cumpre ressaltar que o padrão de "crimp" é mais complexo, apresentando variações ao longo do tendão. Na região de compressão as fibras mais espessas exibem birrefringência não tão homogênea como a observada na região de tensão (Fig. 18). Este mesmo material exibe um padrão distinto de crimp (Fig. 30), com valores de $2l_0=3,6\mu\text{m}$ e $\phi_0 = 27^\circ$. Neste caso o crimp aproxima-se de uma estrutura em zig-zag.

Anisotropias do Material Corado

Conforme já mencionado, os feixes de colágeno das regiões de tensão e de compressão do tendão exibem incrementos da birrefringência após coloração com os corantes azóicos empregados. Isto revela a ligação ordenada dos corantes aos sítios de ligação que devem apresentar distribuição ordenada ao longo das moléculas em que estão presentes. Além disto a birrefringência do material corado exibe cores anômalas de interferência, que revelam certa heterogeneidade no estado de agregação dos componentes identificados pela coloração. O dicroísmo linear detectado (Figs. 16 e 17) também revela a ordenação da disposição dos componentes colagênicos capazes de reagir com o corante.

Por outro lado, a observação dos cortes corados com o azul de alcian ou com o azul de toluidina revelou que não só os componentes basofílicos associados à superfície dos feixes, mas também o material aparentemente não fibrilar, possuem ordem molecular. Principalmente estes últimos, que carecem da associação com colágeno, também exibem carácter finamente fibrilar e orientado.

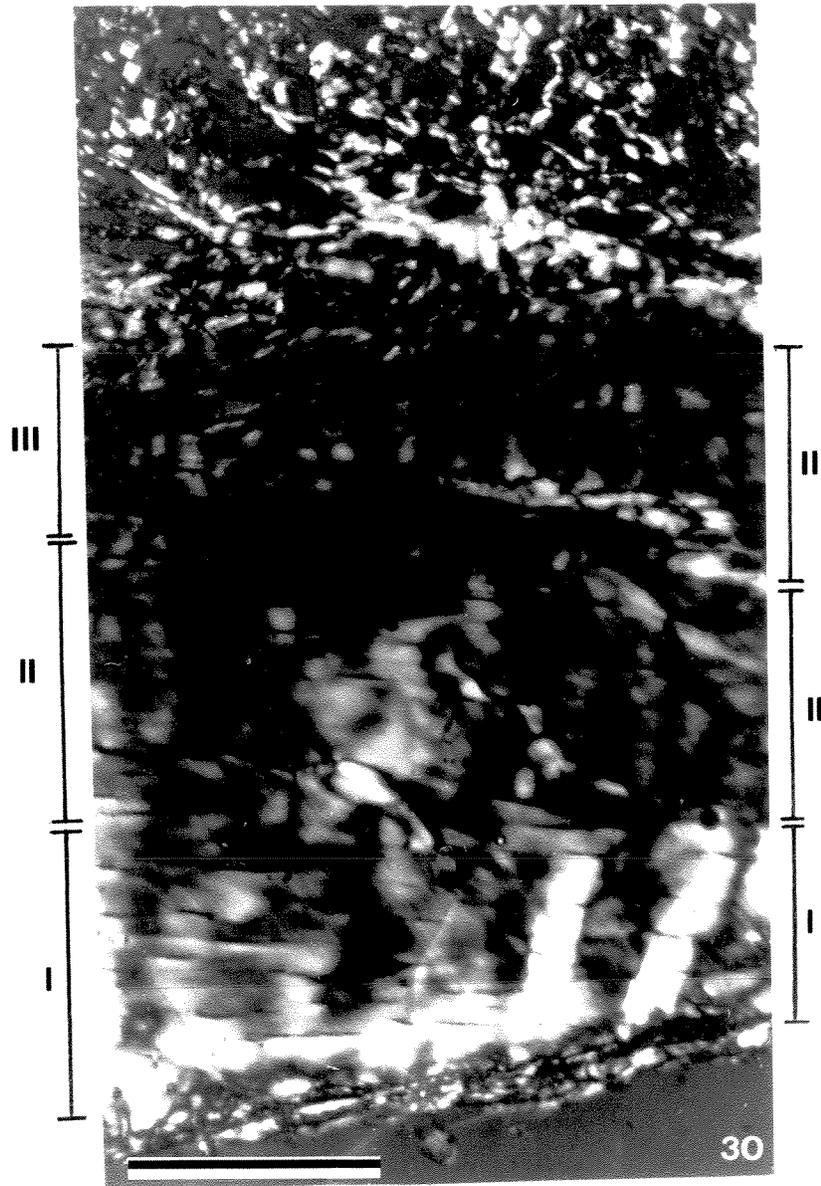


Fig. 30 - Aspecto de um corte histológico não corado de tendão de rã, observado à microscopia de polarização, em posição de extinção.

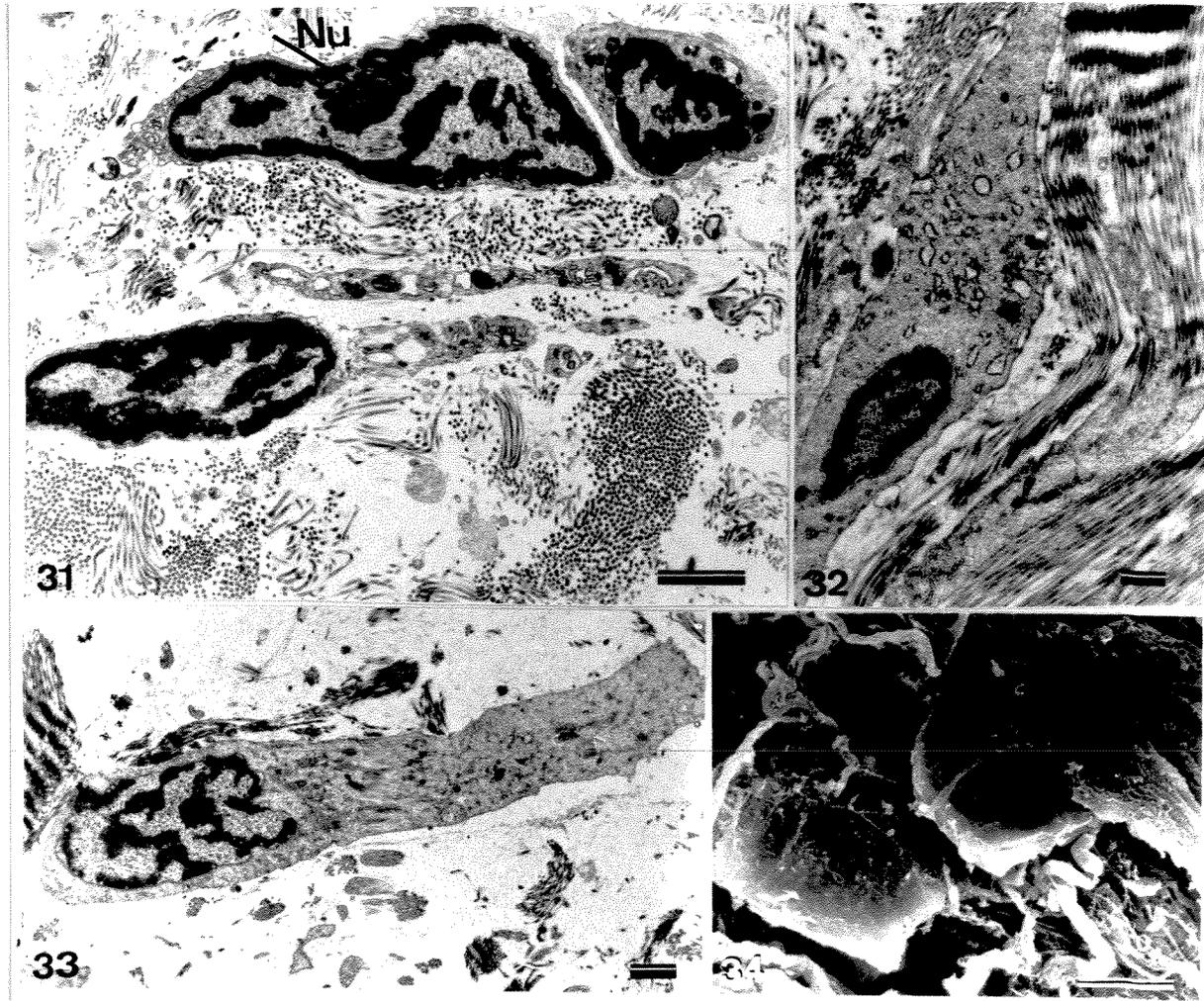
Quando o material é posicionado paralelamente a um dos filtros polarizadores, o material encontra-se em posição de extinção. Nesta condição pode-se observar a estrutura em "crimp" da região de tensão do tendão. Podem-se distinguir três zonas distintas (I, II e III) dentro da região de tensão, caracterizadas por diferentes padrões de "crimp", cujos parâmetros são mostrados na Tabela I. É visível que a extensão das faixas brilhantes e escuras é maior nas zonas mais distantes da região de compressão. Nesta última pode-se observar a estrutura em "crimp" de alguns de seus feixes. Neste caso a estrutura aproxima-se de um zig-zag. Barra = 50µm.

Aspectos da Organização ao Nível Ultraestrutural

A região de compressão possui diferentes tipos celulares. A análise histológica já havia demonstrado a existência de células semelhantes a fibroblastos nas proximidades dos feixes da região de compressão. À microscopia eletrônica, estas células apresentam aspectos típicos de fibroblastos com citoplasma bastante reduzido, onde predominam elementos do retículo endoplasmático granular (Fig. 31) e estão intimamente associadas aos feixes de colágeno. Como os fibroblastos, estas células emitem prolongamentos que se estendem por entre as fibras de colágeno e mesmo dentro delas. Destas células fibroblásticas até as células arredondadas típicas da região de compressão, existe um gradual aumento do volume citoplasmático, com acúmulo de quantidades crescentes de filamentos intermediários (Figs. 32 e 33). As células arredondadas observadas na análise histológica têm aspecto discóide, com superfície relativamente lisa e com poucas figuras indicativas da associação com elementos da matriz extracelular, quando observadas à microscopia eletrônica de varredura (Fig. 34). À microscopia eletrônica de transmissão, estas células mostram citoplasma abundante, preenchido com filamentos do tipo intermediário (Fig. 35). Maiores aumentos mostraram que estes filamentos não são lisos, mas apresentam decoração lateral (Fig. 38). Microtúbulos são apenas ocasionalmente encontrados, geralmente próximos à superfície celular. Os elementos do retículo endoplasmático exibem cisternas ligeiramente dilatadas (Fig. 36) e ficam dispersos, às vezes restritos à periferia do núcleo ou então reunidos numa pequena região citoplasmática (Fig. 35). As mitocôndrias são escassas e geralmente com a matriz mitocondrial pouco evidente. São observadas algumas gotículas de lipídios e pequenos grânulos de glicogênio. O núcleo celular caracteriza-se pelo acúmulo de cromatina condensada junto ao envelope nuclear, circundando uma pequena quantidade de cromatina frouxa central. Raramente consegue-se distinguir o nucléolo em associação com a cromatina condensada. Os complexos de poro são relativamente escassos, enquanto a lâmina nuclear é proeminente pela intensa eletrodensidade (Figs. 33, 35, 37 e 40). O envoltório nuclear delimita um espaço perinuclear ligeiramente dilatado e possui grande quantidade de ribossomos associados à sua superfície externa (Figs. 33, 35, 37 e 40).

O complexo de Golgi apresenta-se atípico, constituindo-se de um aglomerado de vesículas e cisternas (Figs. 35, 37), sem o clássico arranjo de cisternas empilhadas associadas a vesículas. Uma infinidade de grânulos estão associados à face interna da membrana plasmática. Figuras típicas de processos endocitóticos são distinguidas, algumas sendo vesículas recobertas (Figs. 38-40). Já os grânulos de secreção são diversos, alguns com conteúdo finamente fibrilar (Figs. 37, 39, 40) ou denso. Estranhamente, alguns dos grânulos de secreção apresentam ribossomos aderidos à sua superfície, mesmo quando os grânulos já estavam fundidos com a membrana plasmática (Fig. 39). A superfície celular não mostra qualquer tipo mais proeminente de associação com componentes da matriz extracelular.

As células da região de tensão são fibroblastos típicos, ocupando espaços reduzidos entre as fibras de colágeno e emitindo prolongamentos que se estendem por entre elas (Fig. 41). A microscopia eletrônica de varredura de superfícies do tendão expostas por fraturas após a fixação mostrou que estas células são alongadas e exibem uma infinidade de projeções na forma de filopódios (Fig. 42) ou de expansões (Fig. 43). Estes fibroblastos encontram-se dispostos entre fibras compostas por fibrilas paralelas entre si em direção coincidente com o longo eixo do tendão (Fig. 41). O arranjo paralelo das fibras e de suas fibrilas pode ser verificado nas superfícies de fratura observadas à microscopia eletrônica de varredura (Figs. 44-46). Pode-se ainda observar que as fibrilas são às vezes ligeiramente torcidas dentro de uma mesma fibra, à maneira de uma corda. São observadas ainda fibrilas que possuem comportamento diferente da maioria, adotando direção diferente



Figs. 31-34 - Aspectos ultraestruturais de células da região de compressão.

A Fig. 31 mostra células intimamente associadas a elementos fibrosos e com aspecto tipicamente fibroblástico. São salientes a existência de prolongamentos celulares e uma estreita faixa de citoplasma ao redor do núcleo. O núcleo celular caracteriza-se por possuir cromatina condensada em sua maior parte associada ao envelope nuclear. O nucléolo (Nu) pode ser observado em uma das células. O envoltório nuclear possui um espaço perinuclear às vezes dilatado e o citoplasma possui áreas de concentração de elementos do retículo endoplasmático também com sistemas dilatados. Barra = 1 μ m. As Figs. 32 e 33 mostram células com citoplasma mais abundante que aquelas da figura anterior, rico em filamentos intermediários, onde ficam dispersos elementos do retículo endoplasmático com sistemas dilatados. Algumas mitocôndrias podem ser observadas. Este tipo celular pode ser encontrado em associação aos feixes (32) ou disperso numa matriz finamente fibrilar (provavelmente composta por proteoglicanos) com componentes fibrosos esporádicos (33). Figs. 32 e 33, Barras = 1 μ m em ambas as figuras. A Fig. 34 mostra células da região de compressão observadas à microscopia eletrônica de varredura. Estas células apresentam aspectos discóide e superfície bastante lisa, com poucas associações com elementos da matriz extracelular. Barra = 10 μ m.

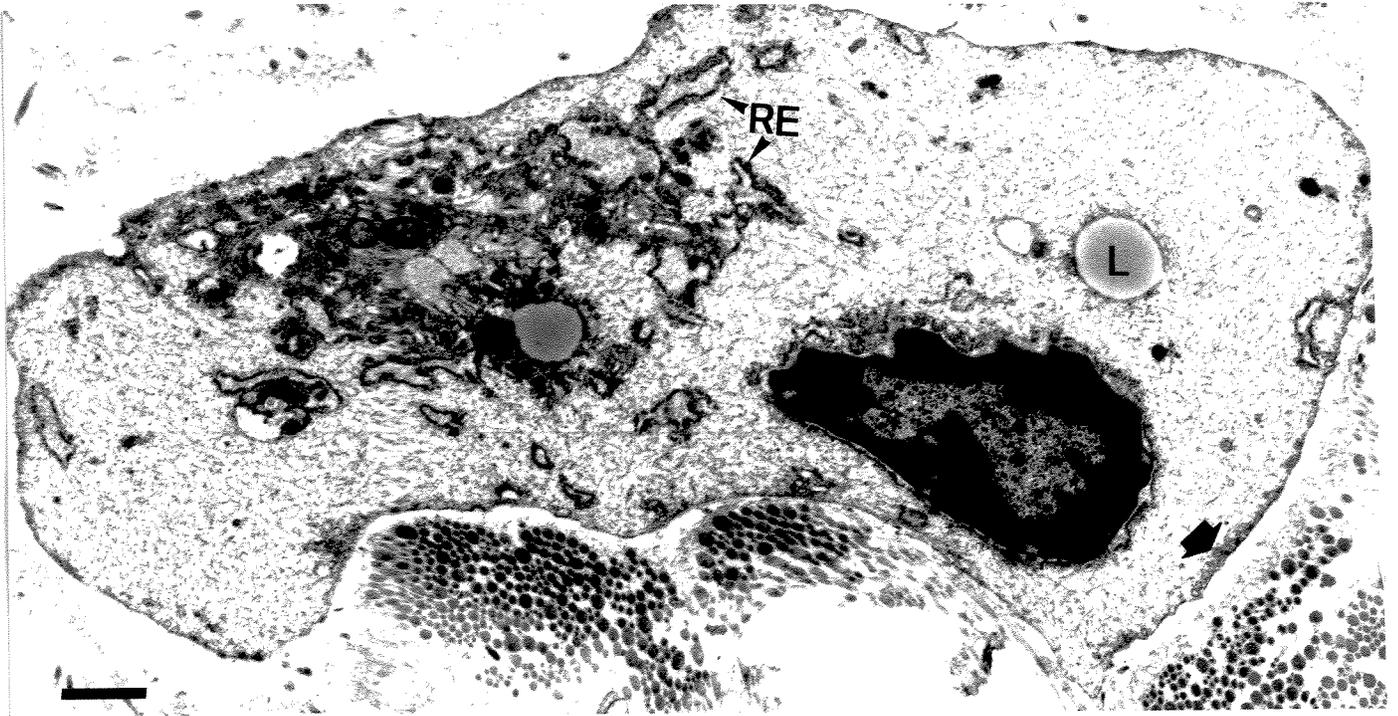
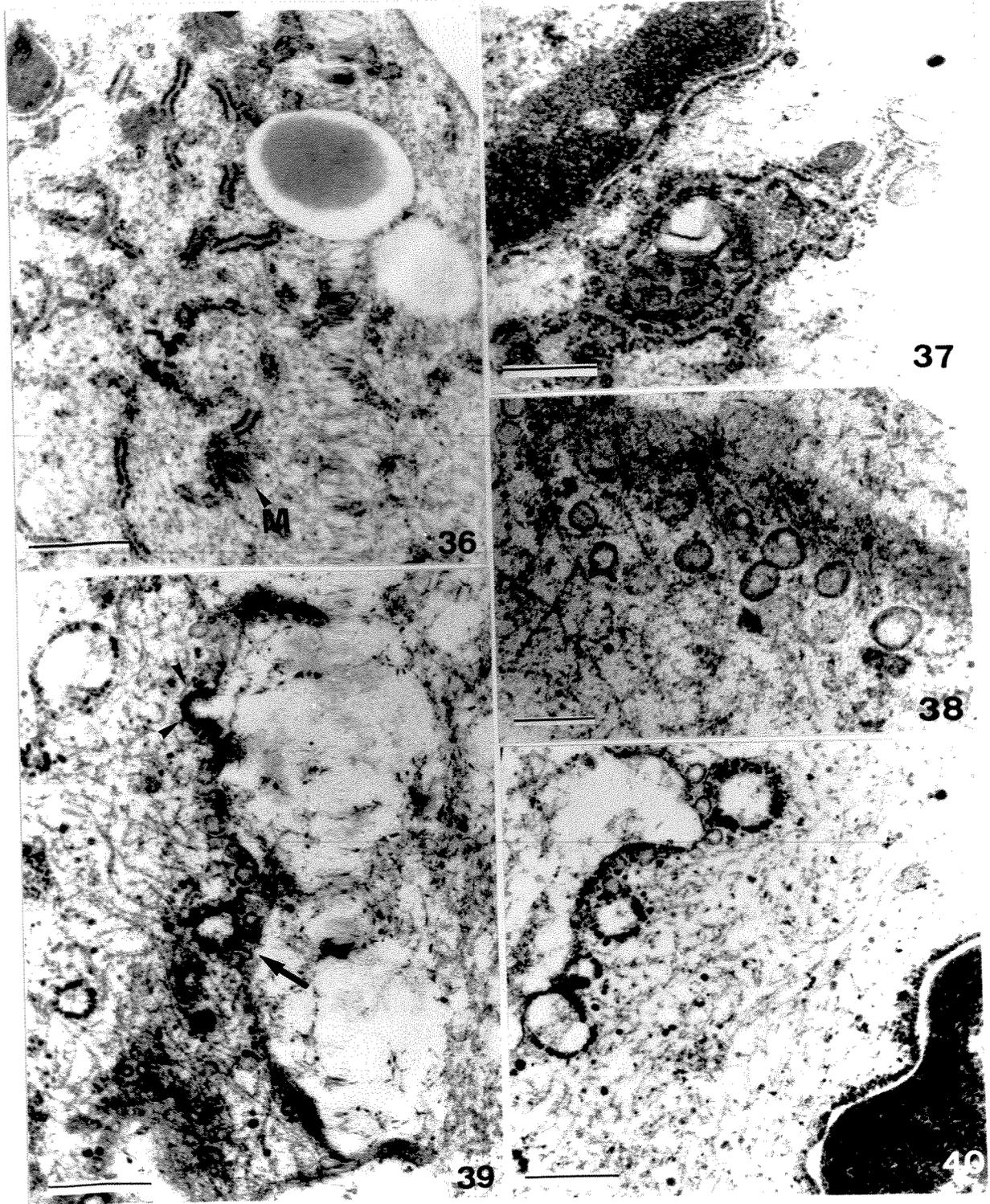


Fig. 35 - Aspectos ultraestruturais de uma célula típica da região de compressão.

Esta figura mostra uma célula típica da região de compressão, na qual pode-se observar como característica principal um citoplasma desenvolvido e preenchido por filamentos do tipo intermediário, provavelmente vimentina. Observa-se também a concentração das organelas citoplasmáticas numa região restrita do citoplasma e numa estreita faixa ao redor do núcleo. As cisternas do retículo endoplasmático granular (RE) são dilatadas e o complexo de Golgi (CG) consiste de um acúmulo de elementos tubo-vesiculares. Algumas gotículas de lipídios (L) estão presentes e pequenos grânulos de glicogênio podem ser identificados. Em alguns sítios podem ser observadas pequenas vesículas em associação com a superfície celular (seta). Não são observados qualquer tipo de interação mais definido entre a célula e componentes da matriz extracelular. Barra = 1 μ m.

e associando-se em fibras também distintas, às vezes associadas com material sem carácter fibrilar aparente (Fig. 45) e que é removido pelos tratamentos enzimáticos pela hialuronidase testicular ou pela papaina. Estas fibrilas parecem conectar as diferentes fibras do tendão (Fig. 45). Em algumas situações pode-se verificar que algumas fibras adotam a conformação em zig-zag, responsável pelo "crimp" de alguns tendões (Fig. 46).

As fibras ou feixes primários da região de compressão apresentam aspectos bastante peculiares, perdendo o arranjo paralelo de distribuição das fibrilas, observado na região de tensão. Nestes feixes as fibrilas associam-se em pequenos grupos que dispõem-se de maneira aparentemente desorganizada, de forma a aparecerem lado a lado, em secções longitudinais, oblíquas e transversais (Fig. 47-50). Além dos feixes propriamente ditos serem ondulados, as fibrilas que os estruturam também apresentam aspectos torcidos ou ondulados, estando bastante livres dentro do feixe. Deste modo elas são observadas em corte oblíquo quando o corte é paralelo à direção do feixe (Figs. 49-50). Um aspecto bastante interessante é que, embora desorganizadas dentro dos feixes, as fibrilas são restritas a um único feixe e que este exhibe limites bem definidos (Fig. 51). A delimitação destes feixes é realizada por um material pouco evidente à microscopia eletrônica de transmissão pelos métodos convencionais de fixação, mas que é identificado à microscopia eletrônica de varredura como uma cobertura sem carácter fibrilar aparente (Fig. 52). Esta cobertura é sensível ao tratamento pela hialuronidase testicular (Fig. 53) ou pela papaina (Fig. 54), que revelam o aspecto emaranhado e/ou torcido das fibrilas de colágeno. A associação das fibrilas em grupos dentro de um feixe é aparente na Figura 54. Foi também notada a



Figs. 36-40 - Aspectos ultraestruturais de componentes associados à síntese e secreção pelas células da região de compressão

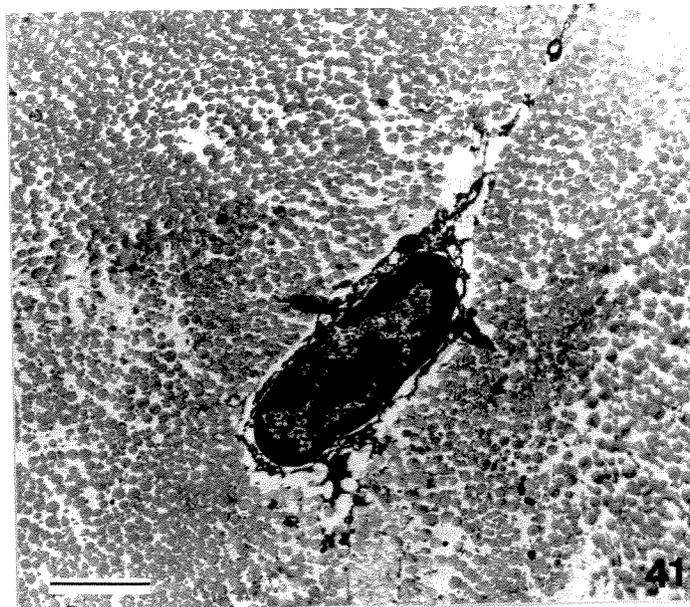
A Fig. 36 exibe um detalhe dos elementos do retículo endoplasmático granular que apresentam cisternas moderadamente dilatadas e estão dispersas por entre uma trama de filamentos intermediários. O conteúdo das cisternas parece ser finamente fibrilar. São raras as mitocôndrias (M) e são frequentes os grânulos de glicogênio dispersos entre os elementos do retículo endoplasmático. Barra = 500 nm. A Fig. 37 mostra um detalhe de um provável complexo de Golgi, de aspecto completamente atípico, em associação com o retículo endoplasmático e formado por vesículas de conteúdo de aspecto variável, às vezes mais fibrilar, às vezes mais denso. Barra = 250 nm. A Fig. 38 mostra inúmeras vesículas aparentemente recobertas, encontradas na região adjacente à superfície celular e provavelmente envolvidas com processos de endocitose. Nesta figura observa-se que os filamentos intermediários exibem decorações por toda a sua extensão. Barra = 250 nm. Fig. 39. Detalhe da superfície de uma célula da região de compressão, mostrando aspectos da associação de vesículas com a membrana plasmática. Algumas vesículas são nitidamente do tipo recoberto (pontas de seta) enquanto outras, semelhantes àsquelas da figura anterior apresentam espessamento da membrana porém não tão nítido. Um aspecto bastante anômalo refere-se à existência de vesículas com granulações semelhantes aos ribossomos aderidos à superfície citoplasmática.

associação de prolongamentos celulares dentro destes feixes da região de compressão (Fig. 48 e 50). Além das fibras ou feixes primários, a região de compressão possui também algumas fibras extremamente finas, já observadas pela microscopia de luz ordinária e de polarização. A nível ultraestrutural estas fibras finas são observadas como associações de 3 a 4 fibrilas com bandado periódico e aparentemente distinto daquele exibido pelas fibrilas que formam os feixes primários e que possuem um grande acúmulo de material fibroglobulares (Figs. 55, 56). Estas fibras finas apresentam regiões de dobradura e estão dispersas numa matriz que mostra componentes finamente fibrilares e bastante dispersos (Fig. 55).

Quando observadas em corte transversal, as fibrilas da região de compressão são aparentemente bem mais finas que as fibrilas da região de tensão (Figs. 57 e 58). Esta observação foi complementada pela morfometria que mostrou a existência de fibrilas extremamente expensas na região de tensão que, entretanto, possui também fibrilas extremamente finas. O padrão de distribuição dos diâmetros das fibrilas das duas regiões é mostrado na Figura 59. Nesta figura observa-se que a região de tensão possui uma enorme variação de diâmetros, que não estão distribuídos em populações distintas. Já a região de compressão possui fibrilas com menores diâmetros distribuídos em duas populações pouco definidas.

Figs. 41-43 - Aspectos ultraestruturais de células da região de tensão.

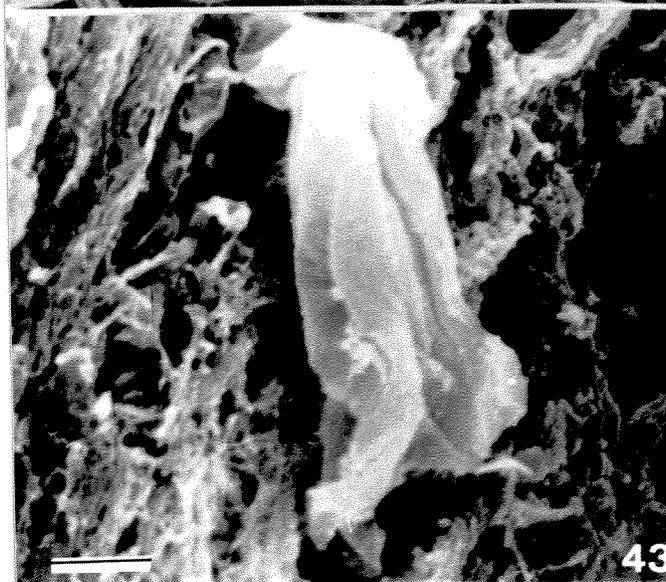
Fig. 41. Um fibroblasto da região de tensão é observado em corte transversal. A célula apresenta um citoplasma residual ao redor do núcleo e expansões que se estendem e delimitam grupos de fibrilas de colágeno, aqui vistas em corte perpendicular. Pode-se notar a regularidade no direcionamento das fibrilas. Barra = 2 μ m. Fig. 42. Imagem obtida ao microscópio eletrônico de varredura de um fibroblasto da região de tensão. São observadas inúmeras expansões citoplasmáticas na forma de filopódios. Barra = 20 μ m. Fig. 43. Célula da região de tensão, em uma área mais próxima à região de compressão. Nesta área as células são menos alongadas e apresentam amplas expansões citoplasmáticas, sem os filopódios observados na célula da figura anterior. Barra = 10 μ m.



41



42



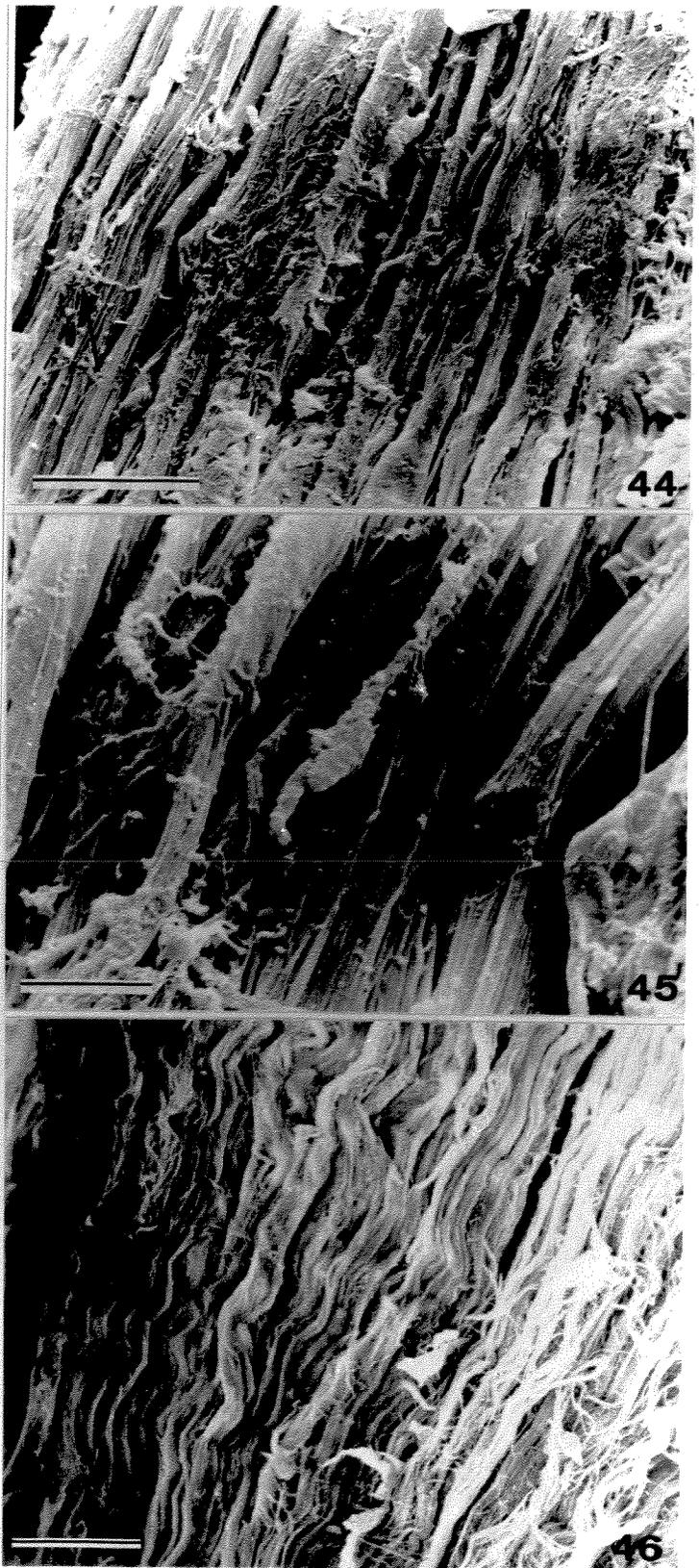
43

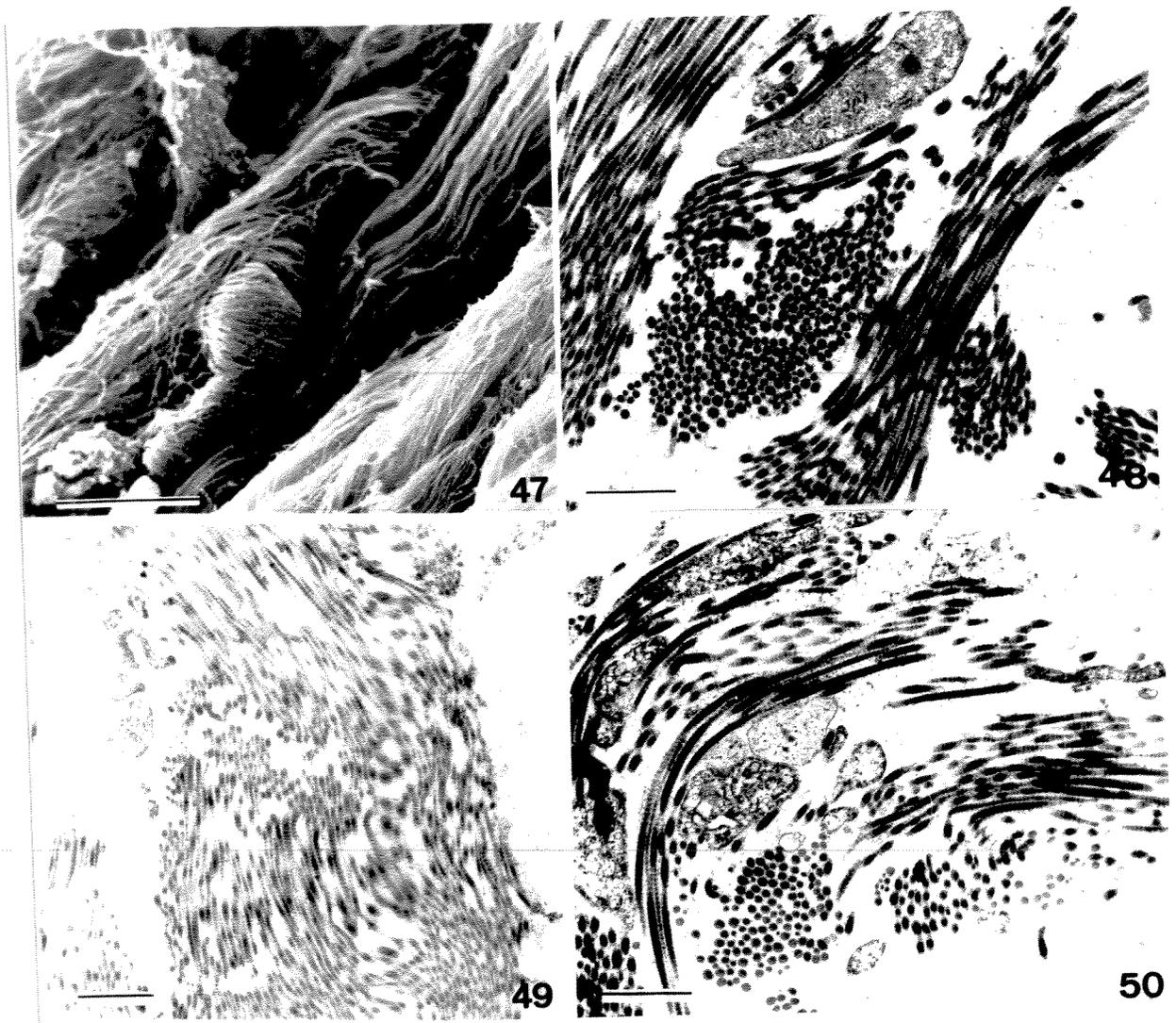
Aspectos Ultraestruturais dos Proteoglicanos Revelados pela Fixação em Presença de Vermelho de Rutênio

A adição de vermelho de rutênio ao fixador e demais soluções das etapas iniciais de preparo do material para a microscopia eletrônica revelou que os grandes espaços ocupados por material finamente fibrilar encontrados entre as células e entre os feixes são compostos por componentes proteoglicânicos. Os grânulos típicos formados pelos proteoglicanos na presença de vermelho de rutênio são observados por toda a região de compressão e são unidos por finos filamentos de maneira a formarem construções aneladas (Figs. 60A e 60B). Além disto, foi também observada a íntima associação destes componentes granulares unidos por filamentos à superfície das células (Fig. 60A) e das fibras e/ou fibrilas de colágeno (Fig. 60B). Além destes grânulos dispersos na matriz da região de compressão, são também observados alguns grânulos menores ordenadamente associados à superfície das fibrilas de colágeno e

Figs. 44-46 - Aspectos dos componentes fibrosos da região de tensão, observados à microscopia eletrônica de varredura.

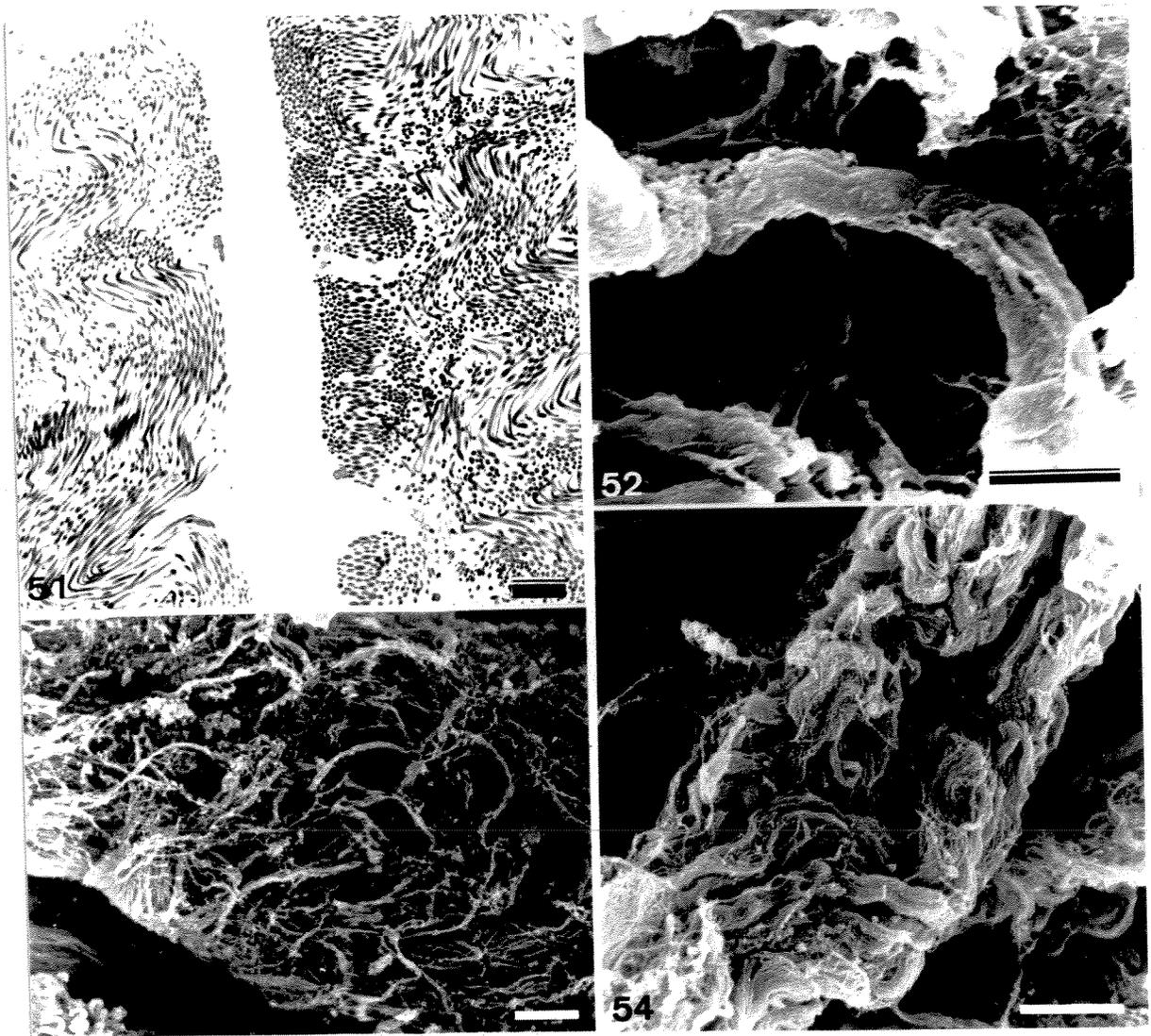
Fig. 44. Aspecto geral da distribuição paralela de feixes compostos por fibrilas de colágeno. Observa-se que cada feixe mantém sua integridade mesmo após o procedimento de fratura. Nota-se também a presença de componentes de aspecto não fibrilar em algumas regiões, assim como fibrilas que não fazem parte dos feixes e que direcionam-se perpendicularmente a eles. Um dos feixes parece possuir uma extremidade afilada da qual partem alguns componentes fibrilares, ligando a extremidade aos feixes adjacentes (seta). Barra = 50 μ m. Fig. 45. Detalhe da região mostrada na figura anterior, salientando o feixe com extremidade afilada do qual partem fibrilas que se conectam com os feixes vizinhos. Pode-se observar que a estrutura mais íntima deste feixe distingue-se do carácter fibrilar dos demais, por possuir fibrilas mais torcidas e mais material interfibrilar conectando-as. Barra = 10 μ m. Fig. 46. Outra visão geral dos feixes da região de tensão, na qual podem ser observados aspectos em zig-zag





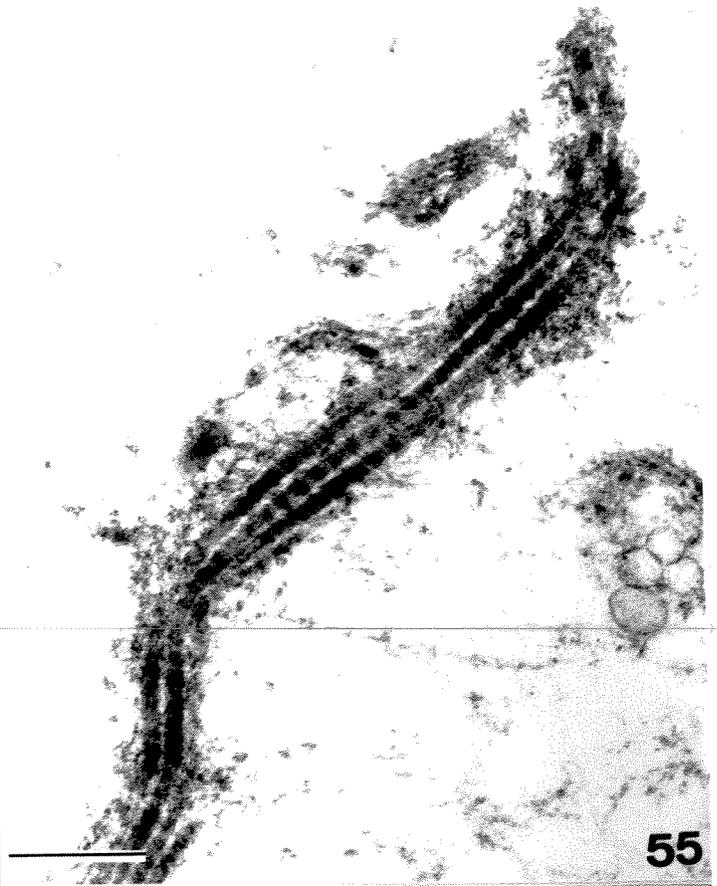
Figs. 47-50 - Aspectos ultraestruturais de feixes da região de compressão.

Fig. 47. Imagem obtida à microscopia eletrônica de varredura, mostrando imagens típicas dos feixes da região de compressão, com feixes contorcidos, sem qualquer parâmetro de ordenação com relação aos feixes adjacentes. Nota-se um feixe que faz um turno completo, voltando-se sobre si mesmo. Barra = 10 μm . Fig. 48-50. Aspectos dos feixes da região de compressão observados em corte, salientando-se a existência de grupos de componentes fibrilares perpendiculares uns aos outros, a falta de alinhamento entre as fibrilas, às vezes com trajeto ondulado. Salienta-se a existência de prolongamentos celulares observados por entre os diferentes grupos de fibrilas, dentro de alguns feixes, sugerindo o constante monitoramento destas estruturas pelas células. Figs. 48-50, Barras = 1 μm .



Figs. 51-54 - Aspectos ultraestruturais de feixes da região de compressão e o efeito de alguns tratamentos enzimáticos.

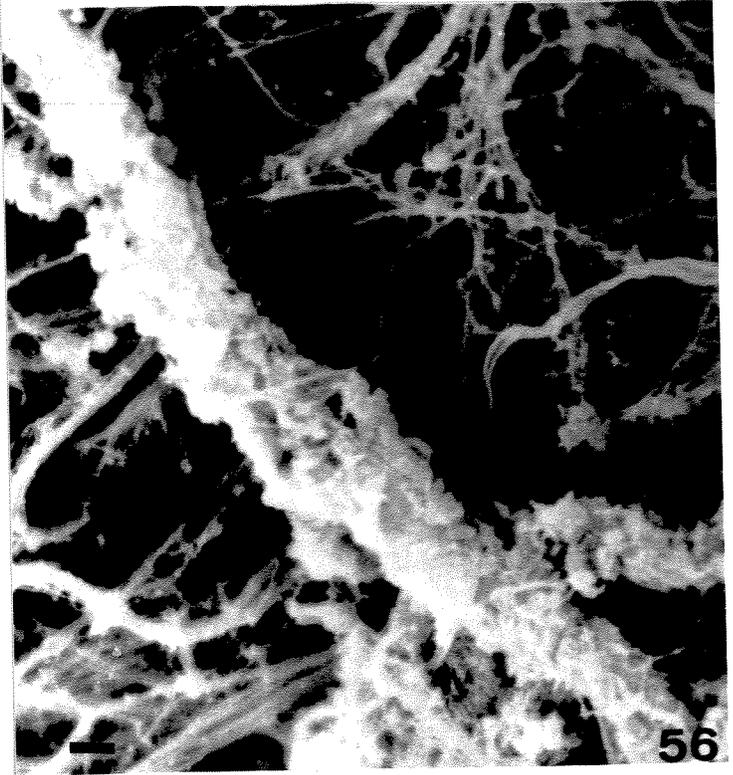
Fig. 51. Detalhes da ultraestrutura de feixes da região de compressão, salientando-se aspectos de torção e de dobramento, associados com posicionamento perpendicular ao longo eixo do feixe, adotados pelas fibrilas de colágeno. Pode-se observar ainda que existe uma definição das margens dos feixes por um material praticamente não contrastado. Barra = 1 μ m. Fig. 52. Imagem obtida à microscopia eletrônica de varredura de um feixe da região de compressão, exibindo seu aspecto contorcido e a existência de uma cobertura aparentemente não fibrilar por toda a sua superfície. Barra = 10 μ m. Fig. 53. Aspecto de um feixe da região de compressão após digestão com papaina. A enzima remove a cobertura normalmente exibida pelos feixes e demonstra o aspecto totalmente desorganizado das fibrilas em seu interior. Barra = 10 μ m. Fig. 54. Outro aspecto da reunião das fibrilas em grupos extremamente contorcidos, dentro de um feixe da região de compressão que, neste caso, teve a sua cobertura removida pela hialuronidase testicular. A susceptibilidade à enzima observada nestas condições e nas condições da figura anterior demonstram que a cobertura dos feixes tem natureza proteoglicânica. Barra = 10 μ m.



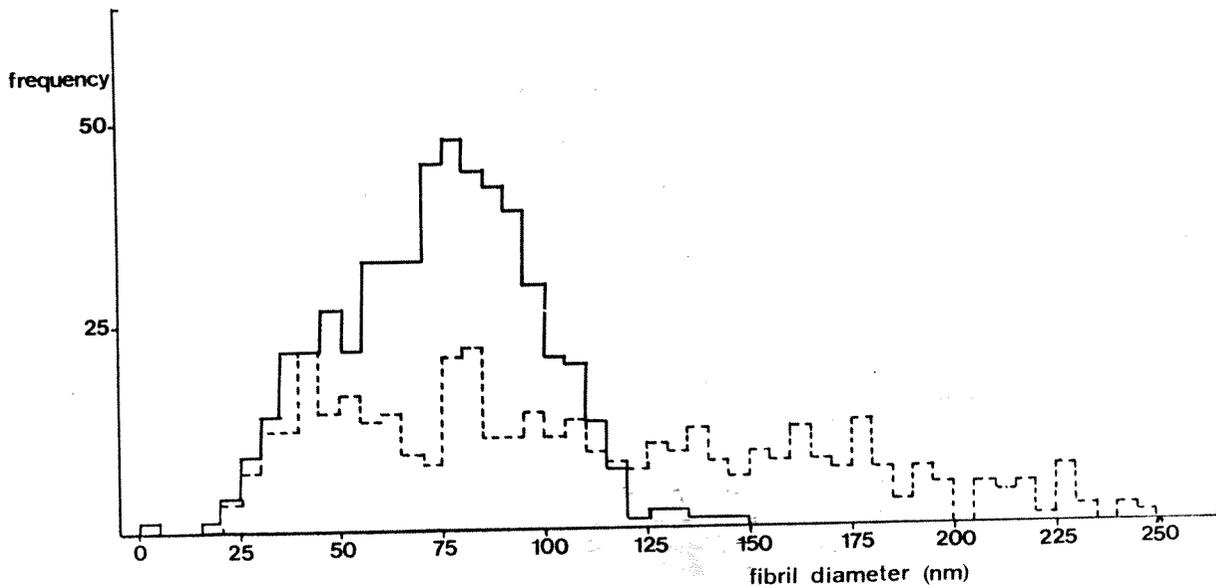
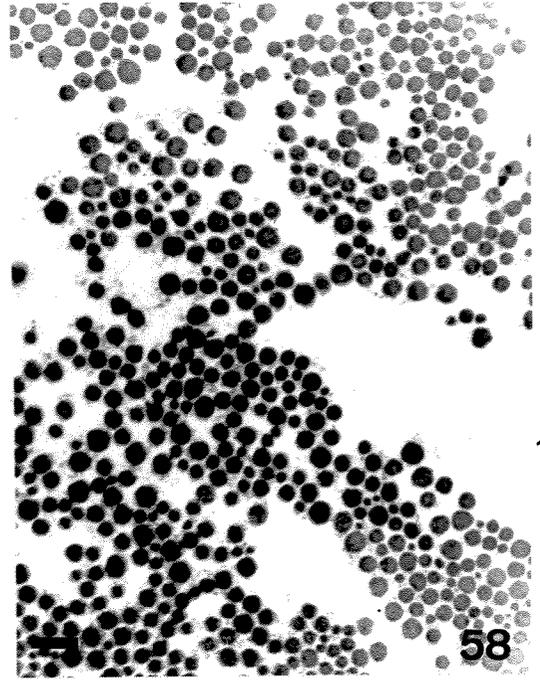
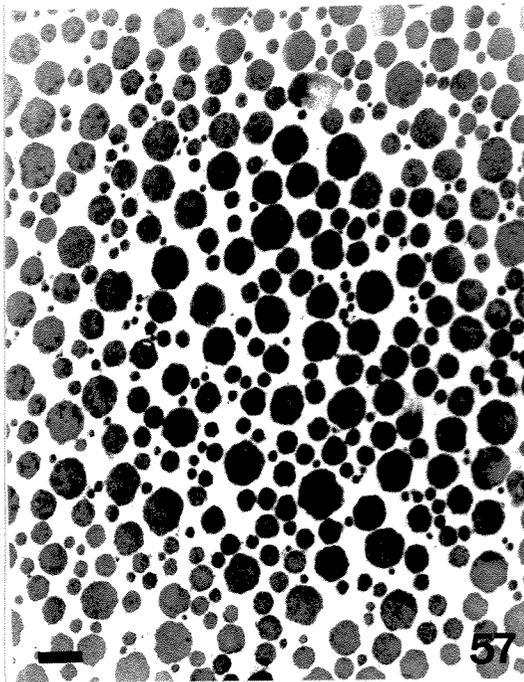
55

Figs. 55 e 56 - Aspectos ultraestruturais de fibras muito finas da região de compressão.

A Fig. 55 mostra a associação de três fibrilas dispersas numa matriz finamente fibrilar, às quais associam-se inúmeros componentes fibrilares. Estes arranjos correspondem às fibras mais finas observadas pela microscopia de polarização na região de compressão. O bandado observado tem periodicidade extremamente pequena, cerca de 27 nm. Os componentes filamentosos associados podem ser tentativamente relacionados a glicosaminoglicanos e/ou proteoglicanos, mas as fibrilas embora aparentemente colagênicas são distintas das demais encontradas na formação dos feixes. Barra = 250 nm. Fig. 56. Imagem obtida à microscopia eletrônica de varredura de um componente fibrilar semelhante àquele observado na figura anterior. Nota-se a intensa deposição de material fibrogranular superficialmente e a existência de elementos finamente fibrilares nas adjacências. Barra = 500nm.



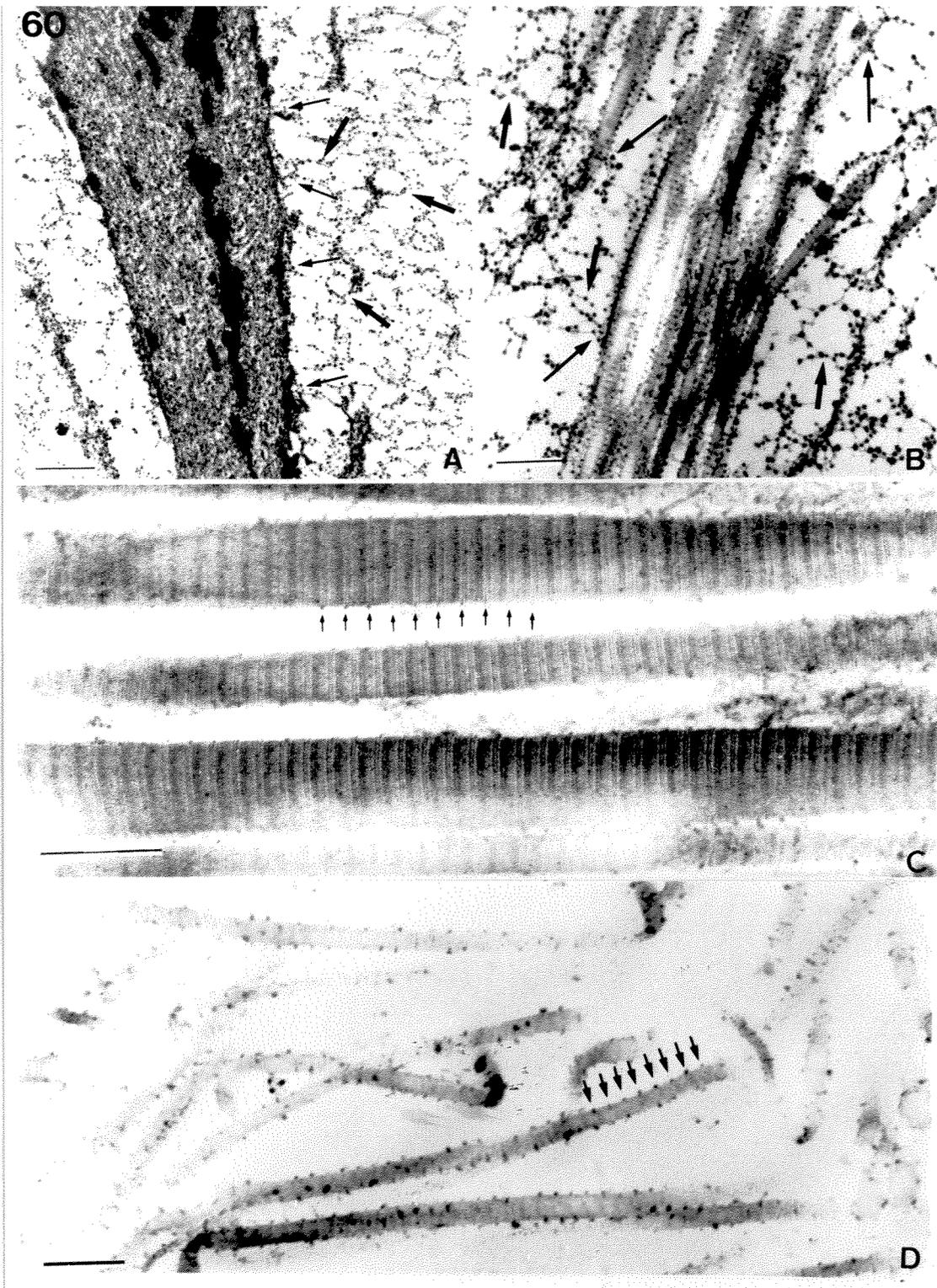
56



59

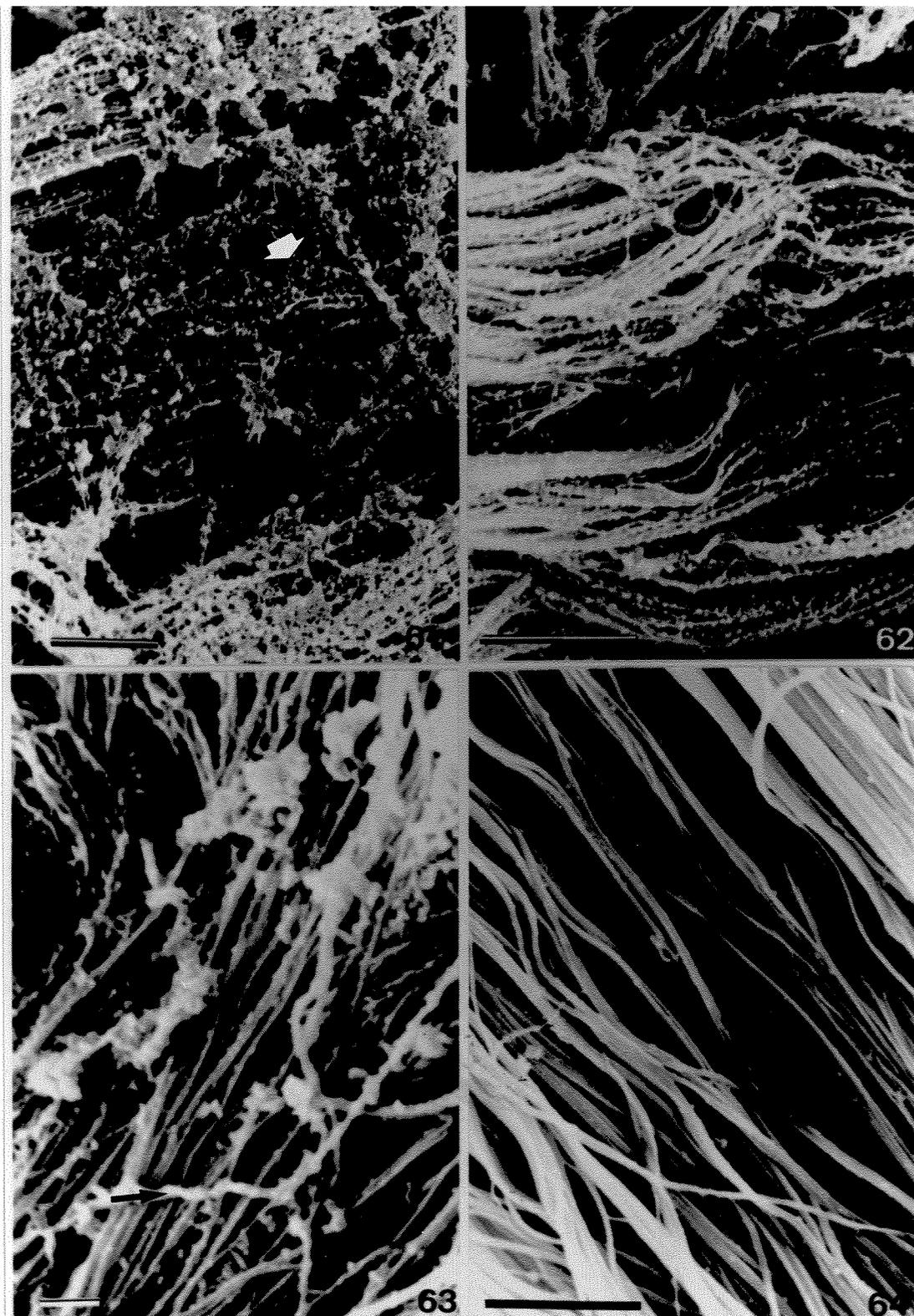
Figs. 57-59 - Distribuição de diâmetros das fibrilas de colágenos das regiões de tensão e de compressão.

A Fig. 57 mostra um corte transversal de fibrilas de colágeno da região de tensão, enquanto a Fig. 58 exibe fibrilas da região de compressão também em corte transversal. A Fig. 59 mostra a distribuição dos diâmetros das fibrilas da região de tensão (- - -) e da região de compressão (—). Nota-se uma concentração em valores relativamente pequenos dos diâmetros das fibrilas da região de compressão enquanto aqueles obtidos para a região de tensão são bastante dispersos e atingem os maiores valores. Figs. 57 e 58, Barras = 250 nm.



Aspectos ultraestruturais das regiões de tensão e de compressão após fixação em presença de vermelho de rutênio.

dos grânulos observados pela precipitação do corante com os glicosaminoglicanos na matriz extracelular adjacente a uma célula da região de tensão. Nota-se que os grânulos são conectados por finos filamentos e que o conjunto adota formações aneladas (setas espessas). Pode-se observar os filamentos e dos grânulos à superfície celular (setas mais finas). Em algumas regiões observa-se o colapso de vários filamentos e de fibrilas com espaçamento ≈ 250 nm. **B.** Aspectos da associação de grânulos e dos filamentos que os conectam com as fibrilas de colágeno na região de compressão. As setas espessas mostram pontos de união entre os filamentos que conectam os grânulos e as setas finas mostram sítios de associação destes grânulos com a superfície das fibrilas. Barra = 500 nm. **C.** Detalhe de fibrilas de colágeno com bandado característico da região de tensão, mostrando uma distribuição superficial de grânulos associados de maneira periódica a uma das bandas das fibrilas, possivelmente na região de "gap". As setas salientam a distribuição periódica. Estes grânulos são distintos daqueles observados nas duas figuras anteriores, que estão praticamente ausentes da região de tensão. Barra = 500 nm. **D.** Detalhe de fibrilas da região de compressão mostrando a distribuição uniforme de grânulos associados à superfície também respeitando a distribuição periódica (setas). Estes grânulos são visivelmente maiores que aqueles observados na região de tensão (figura anterior). Barra = 250 nm.



64 - Imagens obtidas ao microscópio eletrônico de varredura do material fixado em presença de vermelho de rutênio.

nesta figura pode-se observar a estrutura tridimensional adotada pelos grânulos e filamentos revelados pelo vermelho de rutênio. Em alguns pontos pode-se observar a estrutura em anel observada à microscopia eletrônica de transmissão (seta). Barra = 5 μ m. Fig. 62. O tratamento com a papaina remove o material fibrogranular e salienta a existência de grânulos associados à superfície das fibrilas. Estes grânulos devem corresponder aos observados na Fig. 60B em associação com os feixes e não àqueles com distribuição periódica da Fig. 60D, mesmo embora ligeiramente diferente (o que poderia ser um artefato produzido pela dispersão dos elétrons?). Barra = 5 μ m. A Fig. 63 mostra aspectos das fibrilas da região de gomas das quais exibem material associado superficialmente. Em uma destas fibrilas há sugestão de um arranjo helicoidal deste material (escala = 1 μ m). A Fig. 64 representa as imagens observadas após tratamento com a papaina, que remove o material superficial deixando as fibrilas expostas. Barra = 5 μ m.

dispostos de forma periódica, de acordo com o período d (Fig. 60D). Estes grânulos menores são também observados na superfície das fibrilas de colágeno da região de tensão (Fig. 60C), mesmo embora a inspeção visual tenha demonstrado que eles são menores que aqueles que ocupam posição similar na região de compressão.

A microscopia eletrônica de varredura aplicada ao material fixado em presença de vermelho de rutênio demonstrou aspectos tridimensionais dos componentes fibro-granulares dos proteoglicanos. Assim a região de compressão possui elementos fibrogranulares que formam uma malha tridimensional, na qual as estruturas aneladas observadas à microscopia eletrônica de transmissão são distinguidas (Fig. 61). O tratamento com a hialuronidase testicular remove esta malha e salienta a presença de grânulos associados à superfície das fibrilas de colágeno (Fig. 62). Já na região de tensão não se observam as malhas tridimensionais formadas pela precipitação dos proteoglicanos pelo vermelho de rutênio, mas a existência de material associado às fibrilas de colágeno. Sugestivamente em alguns casos, esse material parece adotar um arranjo helicoidal (Fig. 63). O tratamento com a hialuronidase testicular remove este material e deixa as fibrilas de colágeno perfeitamente lisas (Fig. 64)

Aspectos Ultraestruturais de Componentes Associados ao Sistema Elástico

A presença de ácido tânico no fixador revela componentes associados ao sistema elástico. O material assim processado revelou a existência de diferentes componentes, em especial na região de compressão. Feixes de microfibrilas com diâmetro entre 10 e 12 nm são frequentes na região de compressão, em associação com as fibrilas de colágeno (Fig. 65) ou nas proximidades das células. Os feixes de microfibrilas são às vezes bastante desenvolvidos (Fig. 66). Em alguns dos feixes de microfibrilas pode ocorrer a deposição de elastina, que nestas condições apresenta-se extremamente eletrodensa (Fig. 67). Fibras elásticas com seus componentes microfibrilares associados são também observadas juntos aos feixes de colágeno e próximos às células (Figs. 68-70). Na região de tensão, estes componentes são mais escassos, mas fibras elásticas foram observadas juntas ao paratenon visceral (Fig. 69). Também o paratenon visceral associado à região de compressão possui fibras elásticas (Fig. 70).

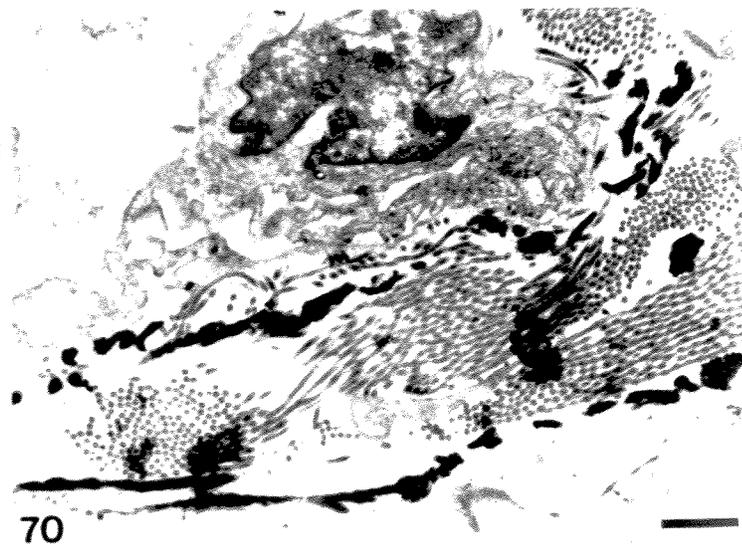
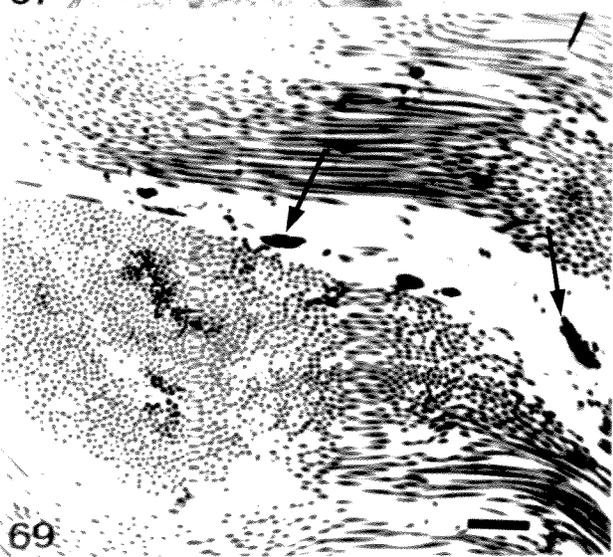
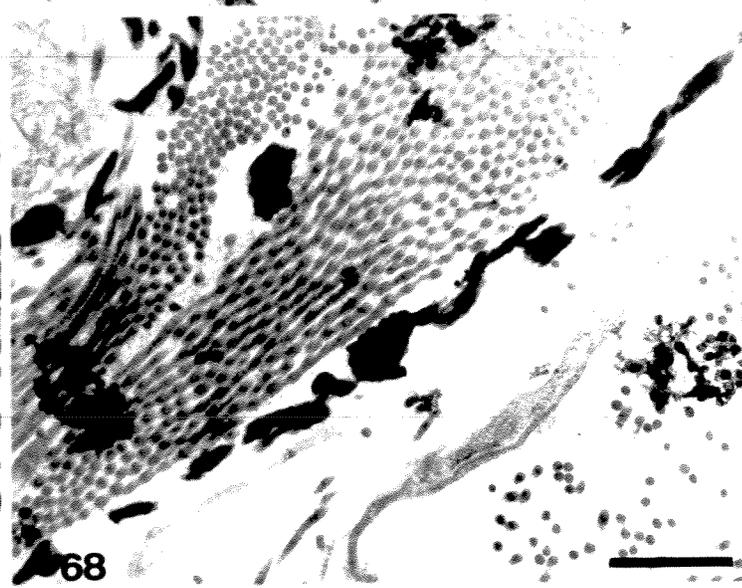
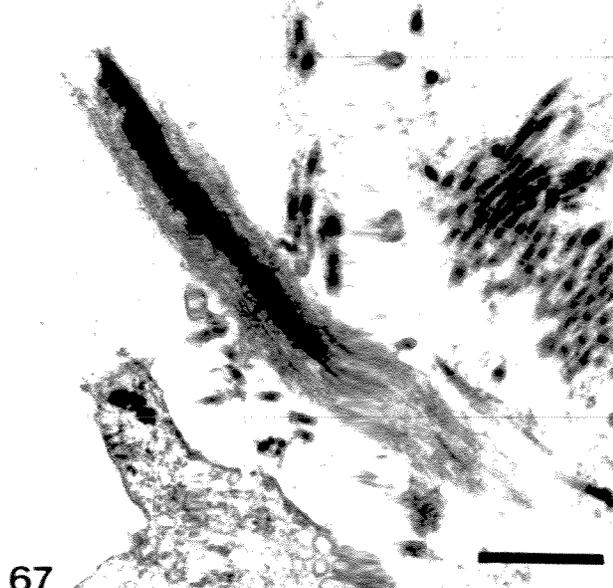
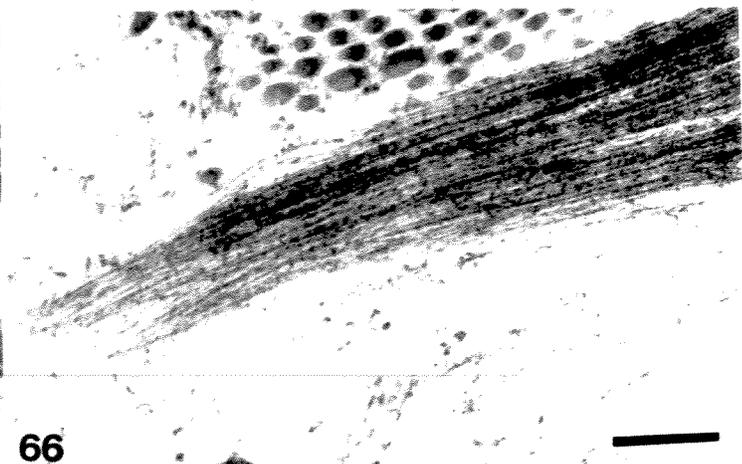
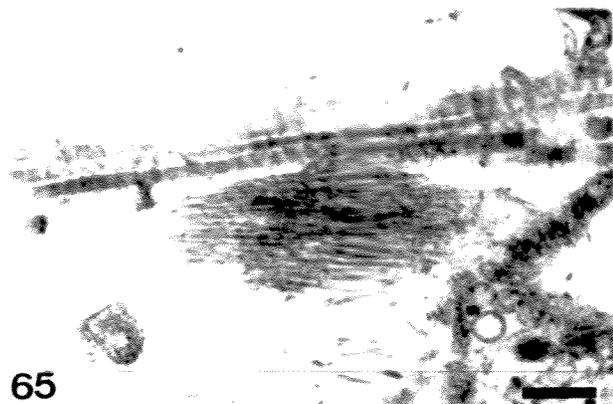
Aspectos de Morte Celular e de Degeneração da Matriz Extracelular

Dentro da região de compressão foram identificados alguns sítios de ruptura da matriz extracelular e de morte celular (Figs. 71-75). Nestes casos sempre foram observadas células semelhantes a fibroblastos, exibindo inúmeros prolongamentos e figuras de endocitose associadas a uma maquinaria de síntese desenvolvida (Figs. 71-73). A morte celular pôde ser identificada pela desorganização citoplasmática (Fig. 72) e pela presença de núcleo picnótico (Fig. 74). Figuras de células com a membrana plasmática rompida (que não pode ser atribuída a uma má fixação, pois outros componentes como mitocôndrias e retículo endoplasmático estão preservados) foram observadas (Fig. 73). Prolongamentos celulares repletos de vesículas aparentemente do sistema lisossômico-endossômico e de grânulos repletos de material eletrodense, com variações de compactação também foram esporadicamente observados (Fig. 75).

Aspectos Bioquímicos

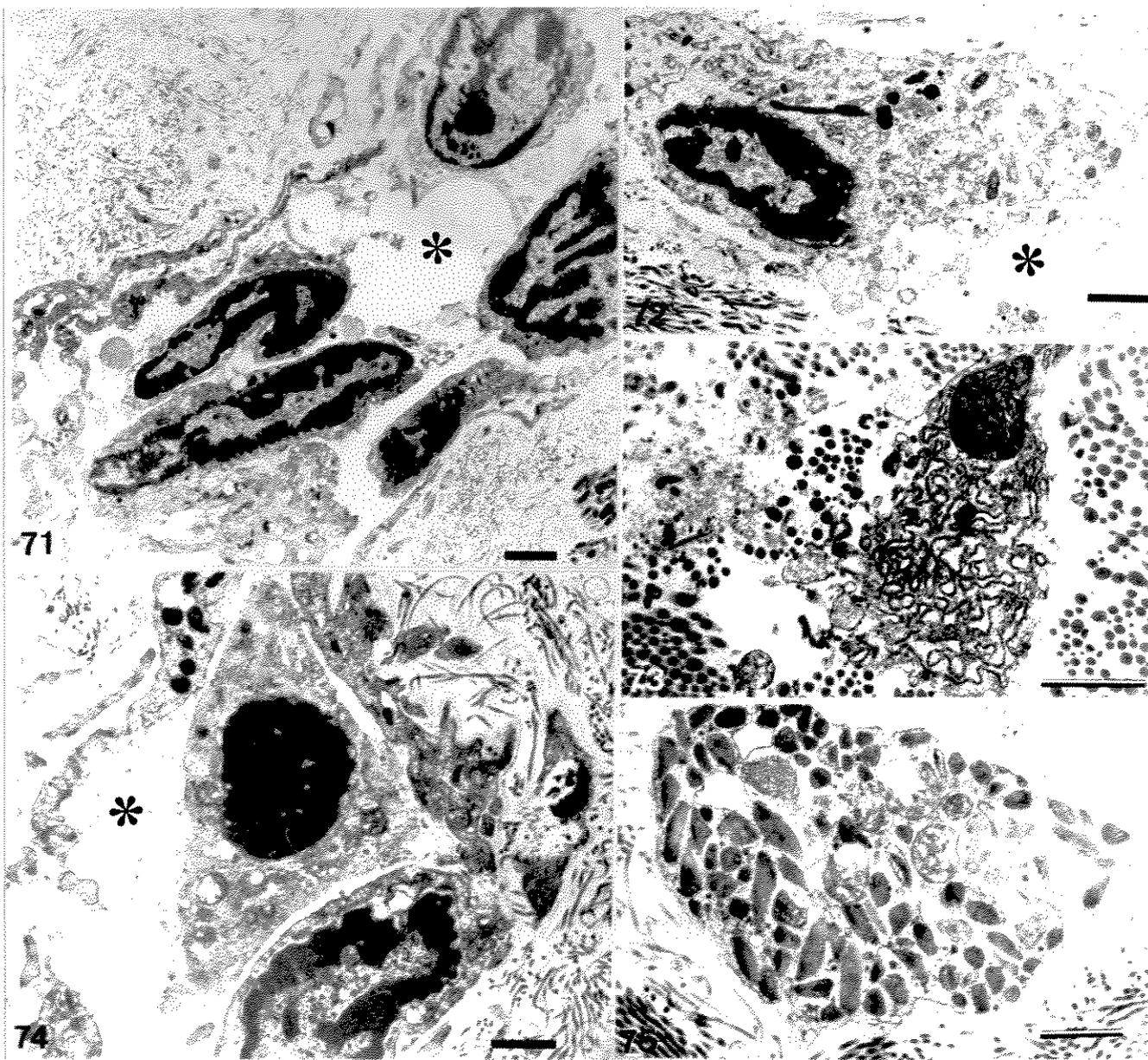
Conteúdo em água e de ácido urônico

O conteúdo em água da região de compressão foi determinado como correspondendo a 83% e o da região de tensão a 62%. O método do carbazol revelou que a região de compressão possui cerca de 39.8 microgramas de ácido urônico por miligrama de tecido seco, enquanto a região de tensão possui cerca de 5.4 micrograma de ácido urônico por miligrama de tecido seco, demonstrando que a região de compressão possui cerca de 7 vezes mais glicosaminoglicanos.



Figs. 65-70 - Aspectos ultraestruturais de componentes do sistema elástico.

Fig. 65. Aspecto de um feixe de microfibrilas com 10-12 nm de diâmetro encontrado em associação a fibrilas colagênicas, na região de compressão do tendão. Barra = 250 nm. Fig. 66. Aspecto de um feixe de microfibrilas semelhante àquele da figura anterior, porém extremamente desenvolvido. Barra = 500 nm. Fig. 67. Aspecto de um feixe de microfibrilas que apresenta deposição de elastina no seu interior, correspondendo às "fibrilas elásticas" da histologia clássica. Barra = 1 μ m. Fig. 68. Aspectos da deposição de fibras elásticas na superfície de um feixe de colágeno na região de compressão. Observa-se um predomínio do componente elástico mas pode-se notar a presença de componentes microfibrilares associados. Barra = 1 μ m. Fig. 69. Aspectos da associação de fibras elásticas (setas) na superfície de feixes de colágeno do paratenon visceral junto à região de tensão. Barra = 1 μ m. Fig. 70. Aspecto da associação de fibras elásticas com feixes e bem próximas às células no paratenon visceral junto à região de compressão. Barra = 1 μ m.



Figs. 71-75 - Aspectos ultraestruturais de possíveis eventos de reparo e de morte celular na região de compressão.

A figura 71 mostra aspectos da reunião de células semelhantes a fibroblastos em uma região de aparente fragmentação da estrutura da matriz extracelular (asterisco). Sugere um papel de reabsorção para estas células a existência de prolongamentos repletos de vesículas fagocíticas. Barra = 1 µm. Fig. 72. Aspecto de uma célula apresentando sinais de degeneração, inclusive com vacuolização do citoplasma e rompimento da membrana plasmática, acompanhada de degradação da matriz extracelular (asterisco). Barra = 1 µm. Fig. 73. Imagem de um prolongamento celular cuja membrana plasmática não pode ser delimitada, sugerindo seu rompimento, provavelmente frente a um trauma sofrido pelo feixe de colágeno a que está associado. Barra = 1 µm. Fig. 74. Aspecto de degeneração e morte celular caracterizado por vacuolização citoplasmática, picnose e rompimento da membrana plasmática, associado com desintegração da matriz extracelular adjacente (asterisco). Pode-se observar a presença de células com inúmeros prolongamentos repletos de vacúolos fagocíticos, provavelmente associada à remodelação da área ocupada pela célula em degeneração. Barra = 1 µm. Fig. 75. Aspecto de um prolongamento celular repleto de grânulos preenchidos com material eletrodense com diferentes níveis de empacotamento, além de inúmeras vesículas de carácter fagocítico. A presença dos grânulos sugere que este prolongamento pertença a um mastócito. Barra = 1 µm.

Os glicosaminoglicanos obtidas pela digestão com papaína foram analisados em eletroforese em gel de agarose-acrilamida (Fig. 76). Nas condições de eletroforese ocorre separação também por diferença de tamanho molecular (MCDEVITT & MUIR, 1972), o que demonstrou que os principais glicosaminoglicanos das duas regiões têm tamanhos semelhantes, sendo ligeiramente maiores que o condroitino sulfato e menores que o ácido hialurônico comerciais. A eletroforese em gel de agarose-acrilamida de alíquotas do material extraído por Gu-HCl 4M é mostrada na figura 77. A eletroforese nestas condições demonstra que ambas regiões do tendão possuem grandes proteoglicanos, que penetram pouco no gel, quando comparados com os glicosaminoglicanos isolados (Fig. 77). Os pequenos proteoglicanos não foram detectados nestas condições.

Filtração em gel de Sepharose CL4B

O padrão de eluição do material extraído com Gu-HCl das duas regiões do tendão são mostrados na Figura 78. É evidente que a região de compressão possui componentes de alto peso molecular, eluindo no volume morto. Por sua vez, a região de tensão demonstra um predomínio de material que é retido na coluna, com correspondentes na região de compressão e componentes de massa molecular relativamente baixa, sem correspondentes na região de compressão.

Cromatografia em DEAE-celulose

A quantificação de ácido urônico nas frações obtidas por cromatografia de troca aniônica em DEAE-Servacel resultou em um único pico com um pequeno ombro para as duas regiões do tendão (Figs. 79 e 80) A padrão de eluição de proteínas, entretanto, exibe dois picos pouco resolvidos (Figs. 79 e 80). Na eletroforese em gel de poliacrilamida (gradiente 3-15%) das frações obtidas são identificados grandes proteoglicanos retidos no gel de empacotamento e, além disso, uma série de componentes que aparecem nas primeiras frações eluídas da coluna de DEAE-celulose (Figs. 81 e 82), a maioria dos quais ainda não foram caracterizados, à exceção do fibromodulim (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989; EVANKO & VOGEL, 1990). Decorim e biglicam, os pequenos proteoglicanos inicialmente obtidos de cartilagem (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989; HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992), são identificados na região de compressão, assim como o fibromodulim (Fig. 82). Na região de tensão (Fig. 81), o decorim exibe migração mais rápida no gel, sugerindo apresentar massa molecular reduzida, enquanto o biglicam está virtualmente ausente. Nestas condições de cromatografia são identificados grandes proteoglicanos também na região de tensão.

Ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério

Os parâmetros de análise das diferentes frações obtidas por ultracentrifugação são apresentadas na Tabela I. Para comparações são apresentados os resultados obtidos para cartilagem articular de rã, e os resultados obtidos para regiões semelhantes do tendão de boi, obtidos por VOGEL & HEINEGÅRD (1985). O padrão eletroforético das diferentes frações é mostrado na Figura 83. Frações obtidas em experimento paralelo de material extraído de cartilagem articular de rã são também mostrados na Fig. 83. Constata-se que grande parte do colágeno contido nas regiões de tensão e de compressão é solúvel em Gu-HCl 4M, conforme observa-se pela sua presença em D4, D3 e D2. Além disto, vários outros componentes são encontrados ao lado do colágeno nestas frações. Um deles, com Mr ao redor de 60kDa, parece ser relativamente mais abundante na região de compressão (Fig. 83).

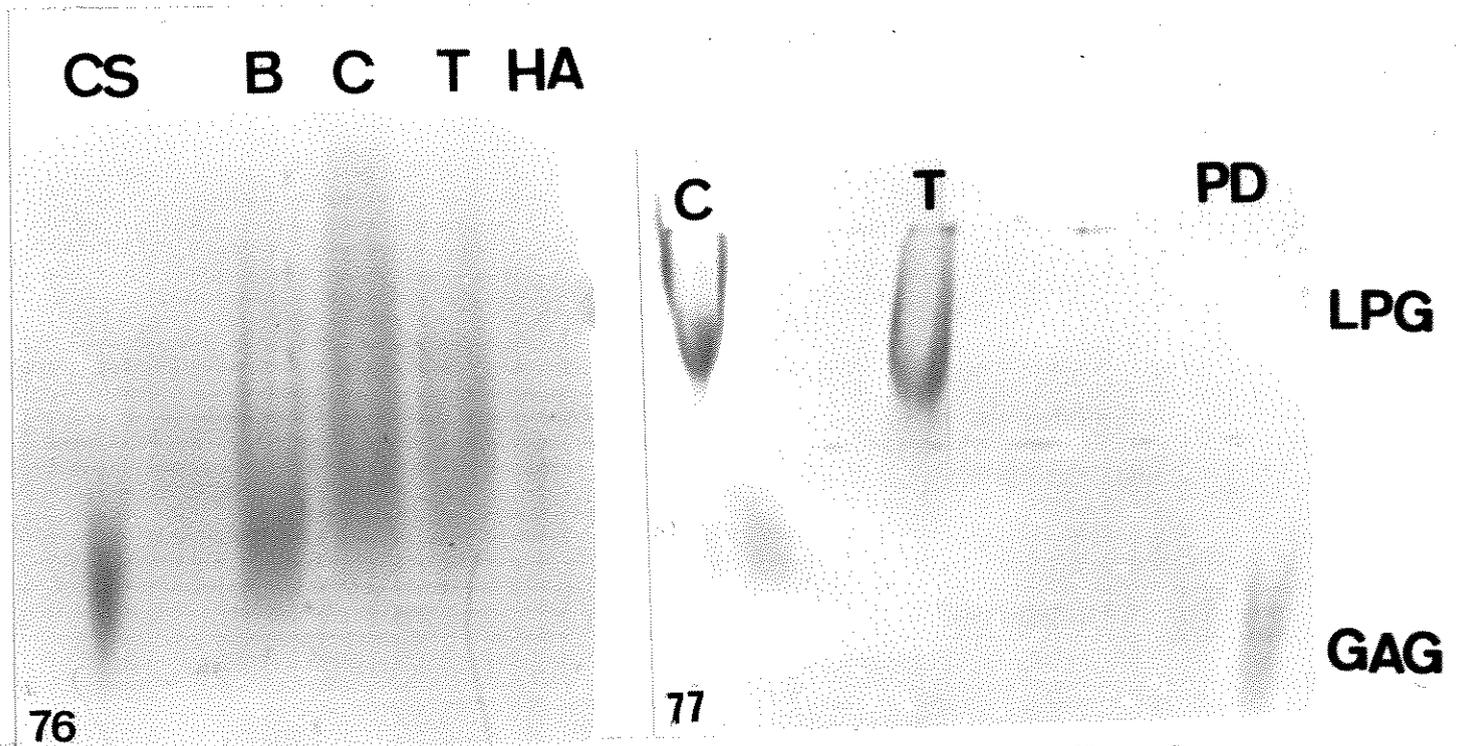


Fig. 76 - Eletroforese em gel de agarose-acrilamida de glicosaminoglicanos extraídos dos tendões de rã.

Os glicosaminoglicanos solubilizados por tratamento com papaína da região de tensão (T) e da região de compressão (C) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose-acrilamida, ao lado de glicosaminoglicanos extraídos da mesma maneira de tendão de boi (B) e de padrões de condroitino sulfato (CS) e de ácido hialurônico (HA) comerciais. Neste tipo de eletroforese a migração é também dependente do tamanho da molécula, desta forma tem-se que os glicosaminoglicanos de ambas regiões do tendão de rã são mais longos que aqueles presentes no tendão de boi e que o condroitino sulfato, e ligeiramente mais curtos que o ácido hialurônico, mesmo embora migrem como bandas relativamente polidispersas.

Fig. 77 - Eletroforese em gel de agarose-acrilamida dos proteoglicanos de tendões de rã.

Os proteoglicanos extraídos das regiões de tensão (T) e de compressão (C) dos tendões de rã, por Gu-HCl 4M foram precipitados com 9 volumes de etanol e submetidos a eletroforese em gel de agarose-acrilamida. Das duas regiões foram extraídos proteoglicanos de alta massa molecular (LPG) e com pouca mobilidade eletroforética, principalmente quando comparados com os glicosaminoglicanos (GAG) obtidos por digestão com papaína (PD). O volume de extrato da região de tensão que foi precipitado era cinco vezes maior que aquele da região de compressão.

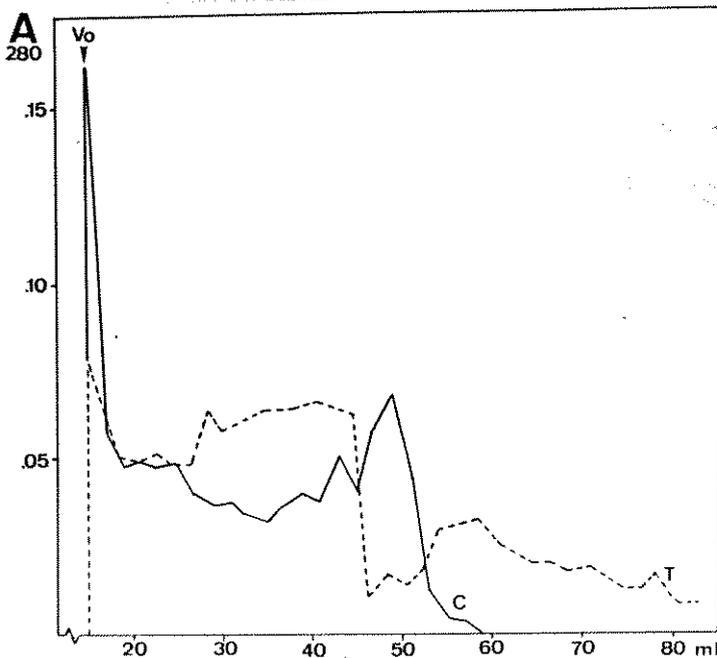
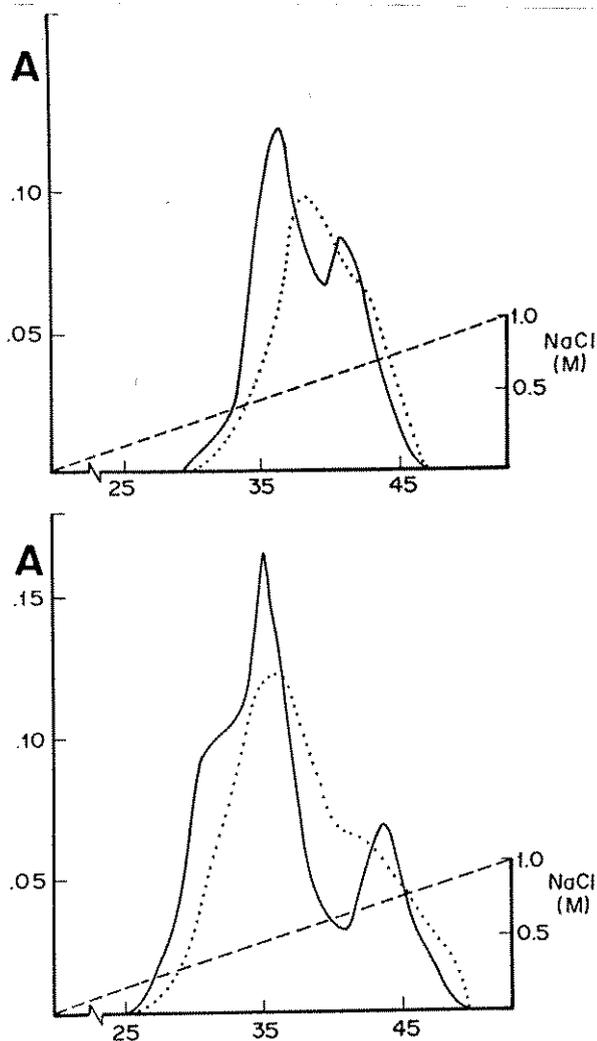


Fig. 78 - Gel filtração em Sepharose CL-4B dos proteoglicanos de tendões de rã.

O material extraído por Gu-HCl 4M das regiões de tensão e de compressão foram submetidos a gel filtração em Sepharose CL-4B (dimensões da coluna = 0,6X50cm), ao fluxo de 12 ml/hora. A região de compressão (C)(-----) exibe componentes de alta massa molecular, eluindo juntamente com o volume morto da coluna, que foi determinado com azul de dextrana. Estes componentes correspondem aos grandes proteoglicanos. A região de tensão (T)(- - -) também possui componentes que eluem junto ao volume morto, porém em menor quantidade, havendo um predomínio de material eluindo mais tardiamente. Nas abscissas estão mostrados os volumes de eluição (ml).



Figs. 79 e 80 - Cromatografia em DEAE-celulose de material extraído das duas regiões de tendões de rã por Gu-HCl. 4M

O material extraído das regiões de tensão (Fig. 79) e da região de compressão (Fig. 80) foram submetidos a cromatografia em DEAE-celulose em tampão acetato 50 mM, pH 6,0, contendo 7M uréia. A eluição do material ligado foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 a 1M no mesmo tampão. O material da região de compressão é eluído em uma molaridade de NaCl ligeiramente inferior que aquela necessária para eluir o material da região de tensão. Em ambos os casos o material eluído apresenta um pico único e um ombro no que se refere ao conteúdo em ácido urônico (A530)(...) e dois picos no que concerne ao conteúdo em proteínas (A280)(-----). A numeração no eixo das abscissas corresponde às diferentes frações coletadas.

Extração e caracterização de colágenos

A eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou que o material obtido por precipitação diferencial do material solubilizado pela pepsina após a extração inicial de proteoglicanos com Gu-HCl 4M corresponde a fragmentos de cadeias colagênicas no lugar de cadeias inteiras como esperado (Fig. 84). Aparentemente o tratamento pelo Gu-HCl 4M resultou em desnaturação das moléculas de colágeno, o que as tornou susceptíveis à pepsina. A análise dos fragmentos obtidos demonstrou a existência de fragmentos que são comuns e fragmentos que são distintos entre as duas regiões. A eletroforese demonstrou ainda que alguns fragmentos exibem comportamento distinto com relação ao padrão de precipitação por NaCl, precipitando em diferentes concentrações do sal (Fig. 84).

Se o tratamento por Gu-HCl é omitido e fragmentos do tendão são tratados diretamente com pepsina, obtém-se moléculas com a região de hélice tripla íntegra, como esperado. A precipitação diferencial por NaCl demonstrou que o principal componente das duas regiões é o colágeno tipo I (Fig. 85). O teste do PAS aplicado a gel de eletroforese semelhante ao da Fig. 85 demonstrou que as duas cadeias alfa do colágeno I extraído de cada uma das regiões e também de pele possuem carboidratos associados. Nas duas regiões, entretanto, são identificadas moléculas colagênicas que precipitam em concentrações inferiores e superiores àquela necessária para precipitar o colágeno tipo I (Fig. 86). Nas

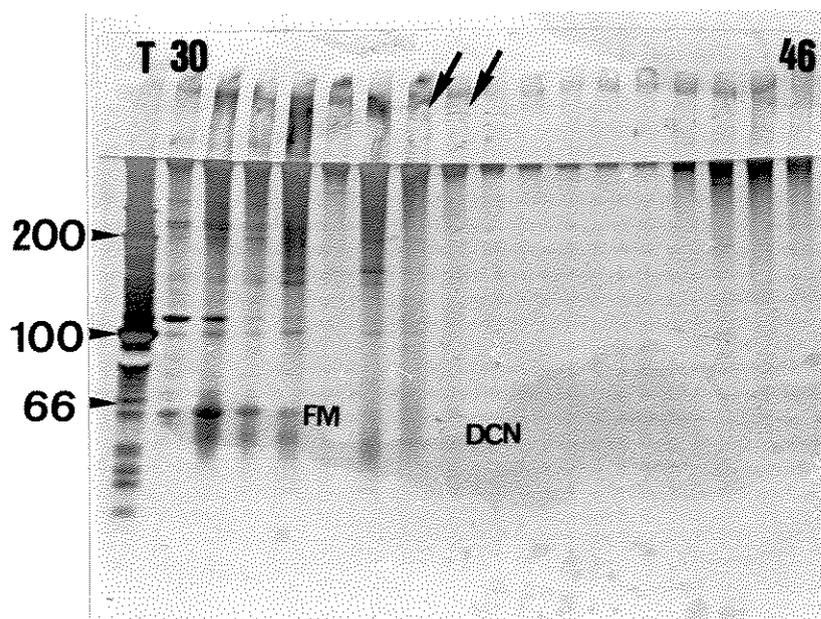


Fig. 81 - Eletroforese das frações obtidas por cromatografia em DEAE-celulose dos proteoglicanos da região de tensão.

Aliquotas das frações referentes ao pico obtido na cromatografia em DEAE-celulose de material extraído por Gu-HCl 4M da região de tensão foram precipitadas duas vezes com 9 volumes de etanol e submetidas a eletroforese em gel preparado com gradiente de concentração de poliacrilamida de 3-15% e revelados por prata. A identificação de alguns componentes foi efetuada por comparação com resultados de EVANKO & VOGEL (1990) para os tendões de bovinos. São identificados o fibromodulim (FM) e o decorim (DCN), sendo que este último apresenta migração mais rápida durante a eletroforese. Junto à banda correspondente ao fibromodulim pode-se observar um material polidisperso. Componentes com massa molecular entre 100 e 200 kDa podem ser verificados. Algum material que elui tardiamente da coluna é retido no topo do gel de separação. Grandes proteoglicanos são identificados no gel de empacotamento (setas), mas exibem pouco reatividade à prata. (T) corresponde ao material não ligado à coluna, onde predomina o colágeno do tipo I, cuja cadeia $\alpha 2$ não apresenta reação com a prata. A numeração corresponde às frações analisadas (de 30 a 46). 60, 100 e 200 correspondem a marcadores de massa molecular em kDa.

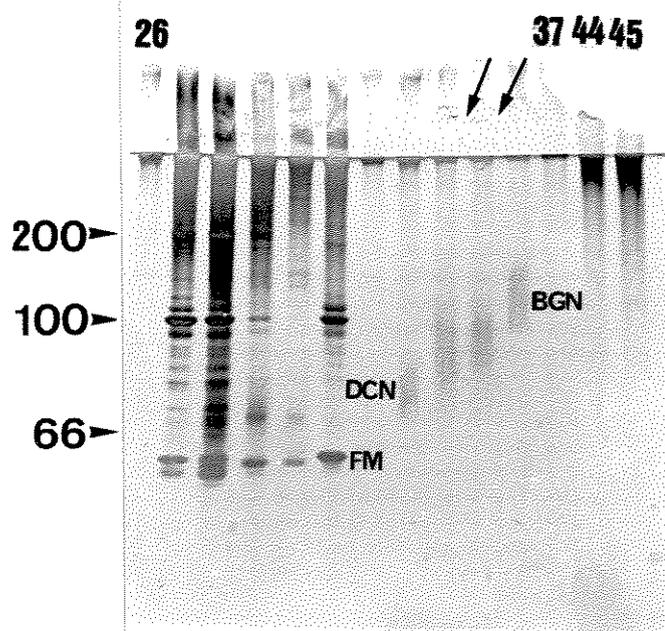


Fig. 82 - Eletroforese das frações obtidas por cromatografia em DEAE-celulose dos proteoglicanos da região de compressão.

Aliquotas das frações referentes ao pico obtido na cromatografia em DEAE-celulose de material extraído por Gu-HCl da região de compressão foram precipitadas duas vezes com 9 volumes de etanol e submetidas a eletroforese em gel preparado com gradiente de concentração de poliacrilamida de 3-15% e revelados por prata. A identificação de alguns componentes foi efetuada por comparação com resultados de EVANKO & VOGEL (1990) para os tendões de bovinos. Além dos decorim (DCN) e fibromodulim (FM) identificados também na região de tensão, a região de compressão possui também o terceiro pequeno proteoglicano, o biglicano (BGN). Migrando junto ao fibromodulim existe uma outra banda cuja natureza é desconhecida. Além dos componentes migrando com 100 a 200 kDa, existem também componentes com massa molecular entre 70 e 100 kDa. Grandes proteoglicanos são retidos no gel de empacotamento (setas), mas são pobremente revelados pela prata. A numeração 26 a 37, 44 e 45 corresponde às frações analisadas. 60, 100 e 200 correspondem a marcadores de massa molecular em kDa.

Tabela III - Parâmetros da caracterização das frações obtidas por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο de material extraído por Gu-HCl 4M das duas regiões do tendão.

	Fração	Densidade	A 280	A 235	Proteínas ^a (mg/ml)	Ácido Urônico ^b
Rã Tensão	Inicial	1.353				
	D1	1.435	2.185	.134	0.12	1.05 (51%)
	D2	1.350	1.286	.108	0.70	ND
	D3	1.322	1.977	.127	1.20	0.60 (29%)
	D4	1.295	2.710	.180	2.72	0.40 (20%)
Rã Compressão	Inicial	1.344				
	D1	1.436	2.247	.144	0.24	1.85 (94%)
	D2	1.366	0.766	.090	0.48	ND
	D3	1.331	1.608	.125	1.36	ND
	D4	1.296	2.650	.285	3.40	0.12 (6%)
Cartilagem^c	Inicial	1.341				
	D1	1.447	0.980	.095	0.40	4.90 (87%)
	D2	1.372	0.122	.055	0.40	0.50 (9%)
	D3	1.334	0.517	.016	0.92	0.12 (2%)
	D4	1.307	1.560	.110	2.40	0.12 (2%)
Bovinos Tensão^d	Inicial	1.35				
	D1	1.44				5.5(34%)
	D2	1.36				3.6(22%)
	D3	1.33				3.8(23%)
	D4	1.30				3.4(21%)
Bovinos Compressão^d	Inicial	1.47				
	D1	1.56				13.(73%)
	D2	1.49				2.3(13%)
	D3	1.43				1.4(8%)
	D4	1.37				1.2(6%)

^aDeterminado pelo método de BRADFORD (1976)

^b Expresso em mg/ml. Determinado pelo método do carbazol de DISCHE (1947)

^c Cartilagem articular de rã

^d Resultados de VOGEL & HEINEGARD (1985)

ND - não detectado pelo método empregado

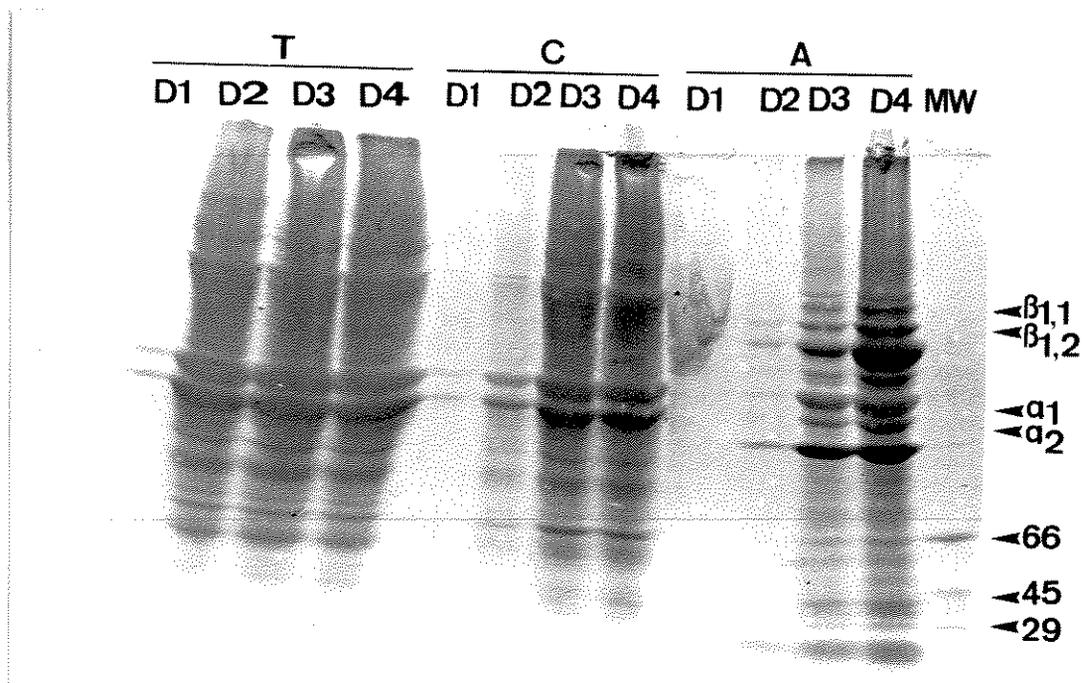


Fig. 83 - Padrão de migração em SDS-PAGE dos componentes contidos nas frações obtidas na ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio.

Aliquotas das diferentes frações (D1-D4) obtidas na ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio foram precipitadas com etanol e submetidas a eletroforese em gel preparado com gradiente (3-15%) de poliacrilamida. T corresponde à região de tensão e C à região de compressão. A corresponde a resultados obtidos para cartilagem articular de rã, através do mesmo procedimento. 66, 45 e 29 correspondem à migração de marcadores de massa molecular (em kDa). A posição de migração das cadeias α e β do colágeno I são apontadas. Nota-se a presença de material contido em D4 também em D3 e mesmo D2. Pode-se notar ainda a presença de colágeno até mesmo em D1. Os grandes proteoglicanos de ambas as regiões do tendão, entretanto, ficam concentrados em D1 e não são observados com este tipo de coloração. Fragmentos dos grandes proteoglicanos da cartilagem concentrados na fração D1 migram como uma grande banda polidispersa. MW - marcadores de massa molecular.

duas situações, o material precipitado com baixa e alta concentração de NaCl apresenta uma única cadeia que migra com a mesma velocidade que a α_1 do colágeno do tipo I.

Características Bioquímicas do Colágeno Tipo I

O colágeno do tipo I obtido por precipitação diferencial do material solubilizado pelo tratamento com pepsina foi submetido a CM-celulose ou a procedimento de eletroeluição para separação das cadeias α_1 e α_2 , que seriam destinadas à análise de aminoácidos, visando a identificação de diferenças nas modificações pós-traducionais, especialmente quanto ao grau de hidroxilação de resíduos de lisina e de prolina. A cromatografia de troca catiônica de colágeno do tipo I extraído de pele de rã, utilizado como controle resultou em dois picos (Fig. 87). A análise eletroforética das frações referentes aos picos obtidos na cromatografia demonstrou que houve separação da cadeia α_1 (Fig. 88). Entretanto, este procedimento demonstrou-se ineficaz na purificação da cadeia α_2 , devido a sobreposição da cadeias α_1 que se estendem por sobre a região de eluição da α_2 (Fig. 88). Por esta razão, e frente à pequena quantidade de colágeno purificado das duas regiões do tendão, decidiu-se por empregar o procedimento de eletroeluição para obtenção das cadeias alfa separadas, objetivando-se proceder com a análise de aminoácidos.

Para a eletroeluição, o colágeno tipo I solubilizado por pepsina e precipitado de solução salina neutra com NaCl 1,5M foi primeiro analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e a seguir submetido a procedimento de eletroeluição. As cadeias alfa do colágeno do tipo I das regiões de tensão e de compressão foram separadas por eletroeluição e submetidas a análise de aminoácidos.

Composição em Aminoácidos do Colágeno I

A análise de aminoácidos do colágeno tipo I das regiões de tensão e de compressão dos tendões de rã é mostrado na Tabela IV. Os resultados revelaram o típico conteúdo em glicina, que corresponde a aproximadamente 1/3 do conteúdo total. Aparentemente não existe diferença no grau de hidroxilação de lisina, que corresponde a cerca de 68% nas duas regiões. Embora o conteúdo em resíduos de lisina e hidroxilisina obtido para a amostra de colágeno tipo I de pele tenha sido bastante reduzido em comparação com aquele observado para o colágeno I dos tendões, cabe mencionar que o grau de hidroxilação de resíduos de lisina no colágeno tipo I de pele corresponde a apenas 7% do total enquanto nas regiões de tensão e de compressão estes valores são de 74% e de 65%, respectivamente. Foi detectada uma discrepância no conteúdo de prolina e de hidroxiprolina entre o colágeno das duas regiões, que somam 106 e 155 resíduos nas regiões de tensão e de compressão, respectivamente. A constância no conteúdo de aminoácidos como a arginina, treonina, valina metionina e ácido glutâmico garantem a identidade das moléculas analisadas, o que é reforçado também pela ausência de histidina nestas moléculas. As figuras 89 e 90 mostram a projeção gráfica da variação nos conteúdos em aminoácidos do colágeno tipo I purificados de pele e das regiões de tensão e de compressão do tendão de rã. Os aminoácidos da figura 89 apresentam conteúdo relativo ampliado na sequência pele, região de compressão e região de tensão, enquanto os aminoácidos mostrados na figura 90 apresentam conteúdo relativo diminuído na mesma sequência.

A Análise de Aminoácidos do Material Colagênico Distinto do Colágeno I.

A análise de aminoácidos do material precipitado em concentrações de NaCl distintas daquelas usadas para a obtenção do colágeno tipo I revelou que todas as amostras correspondiam a colágenos, pelo padrão típico, principalmente pelo conteúdo de glicina e presença de hidroxiprolina e hidroxilina (Tabela V). A comparação do conteúdo em aminoácidos destas amostras com o padrão de colágeno tipo I de pele e com o colágeno tipo III, também de pele, não permitiu a identificação do material analisado. O material precipitado com NaCl 1,2M (Tabela V) tem um carácter muito mais básico na região de compressão que na região de tensão, ambos sendo distintos do colágeno tipo I e tipo III. Já o

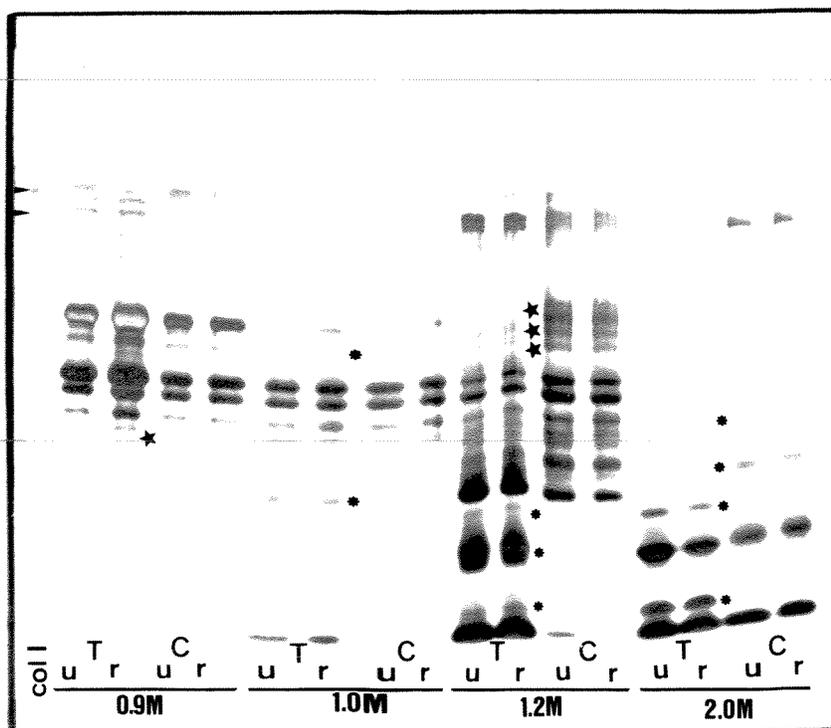


Fig. 84 - Padrão de migração em SDS-PAGE (Gel a 6%) de fragmentos de colágeno obtidos por tratamento com pepsina após tratamento com Gu-HCl 4M.

O tratamento efetuado com pepsina após extração dos proteoglicanos com Gu-HCl 4M com intuito de solubilizar colágenos resultou em um padrão peculiar de fragmentos identificados como colagênicos pela precipitação com NaCl em diferentes concentrações (0,9; 1,0; 1,2 e 2,0M) a partir de solução ácida e pela metacromasia após coloração com o Coomassie Blue R (não mostrado). A comparação dos fragmentos obtidos para as regiões de tensão (T) e de compressão (C), em condições não redutoras (u) ou redutoras (r) revelou diferenças quanto ao padrão de precipitação bem como a existência de fragmentos específicos a cada uma delas. As estrelas correspondem a fragmentos presentes somente em uma das regiões e os asteriscos indicam fragmentos que estão presentes em ambas as regiões, mas que exibem padrão diferencial de precipitação. Col I corresponde a padrão de colágeno tipo I onde são apontadas as cadeias alfa (pontas de seta).

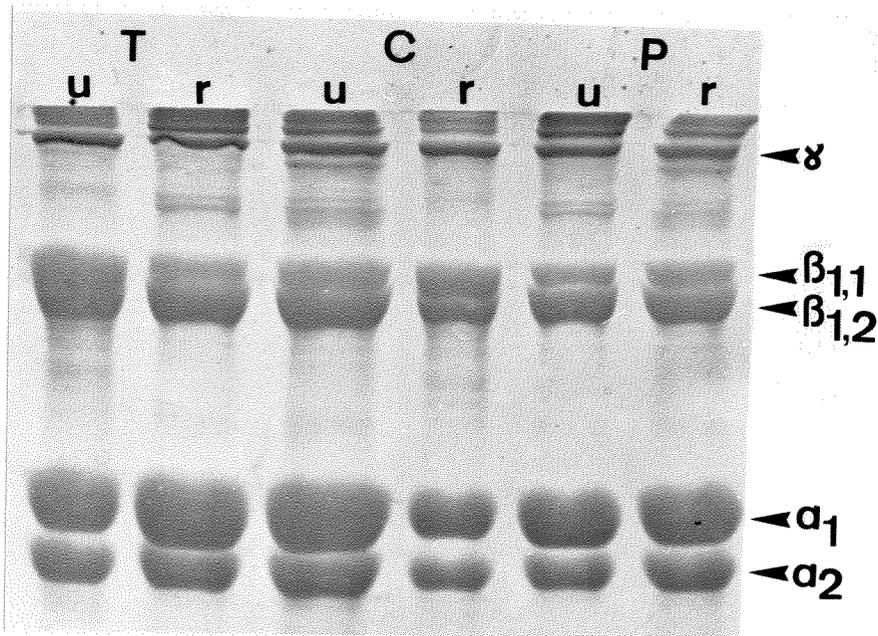


Fig. 85 - Eletroforese do colágeno do tipo I das diferentes regiões do tendão de rã.

O material precipitado com NaCl na concentração de 1,5M a partir de solução salina neutra foi identificado como colágeno do tipo I. O material obtido das regiões de tensão (T) e de compressão (C) exibem o típico padrão de cadeias α , β e γ , comparáveis também com o colágeno tipo I extraído de pele de rã (P), obtido da mesma maneira. A redução com 2-mercaptoetanol não muda o aspecto de migração das diferentes cadeias, exceto das gama.

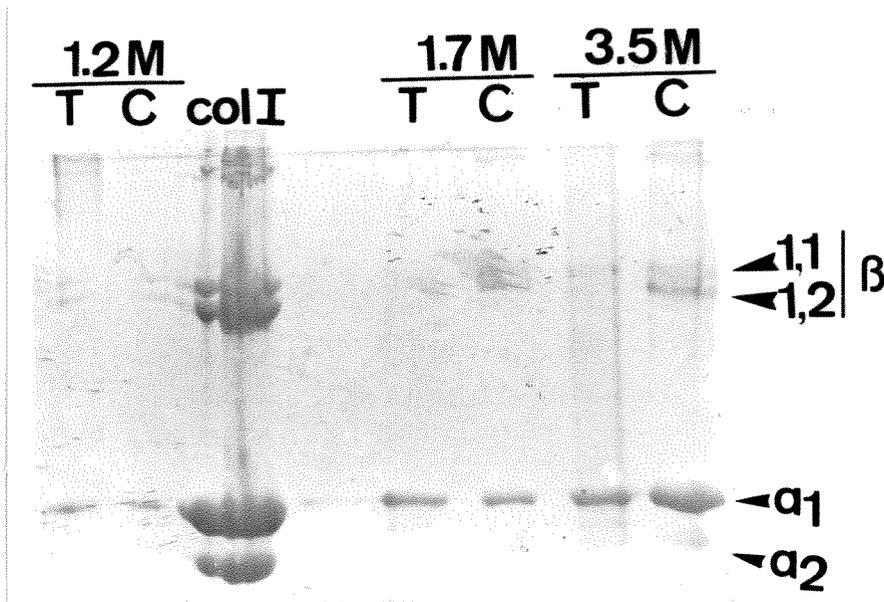


Fig. 86 - Componentes colagênicos obtidos por precipitação diferencial de material solubilizado por pepsina.

Os extratos obtidos das regiões de tensão (T) e de compressão (C) pelo tratamento por pepsina foram dialisados contra NaCl 1M em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7.5 e submetidos a precipitações com concentrações crescentes de NaCl. O material precipitado foi submetido a eletroforese em gel de poli-acrilamida a 6%. Verifica-se a presença de material precipitando com concentrações abaixo e acima da concentração necessária para a precipitação do colágeno I (1,5M). A posição as cadeias α , β e γ do colágeno I (col I) são indicadas.

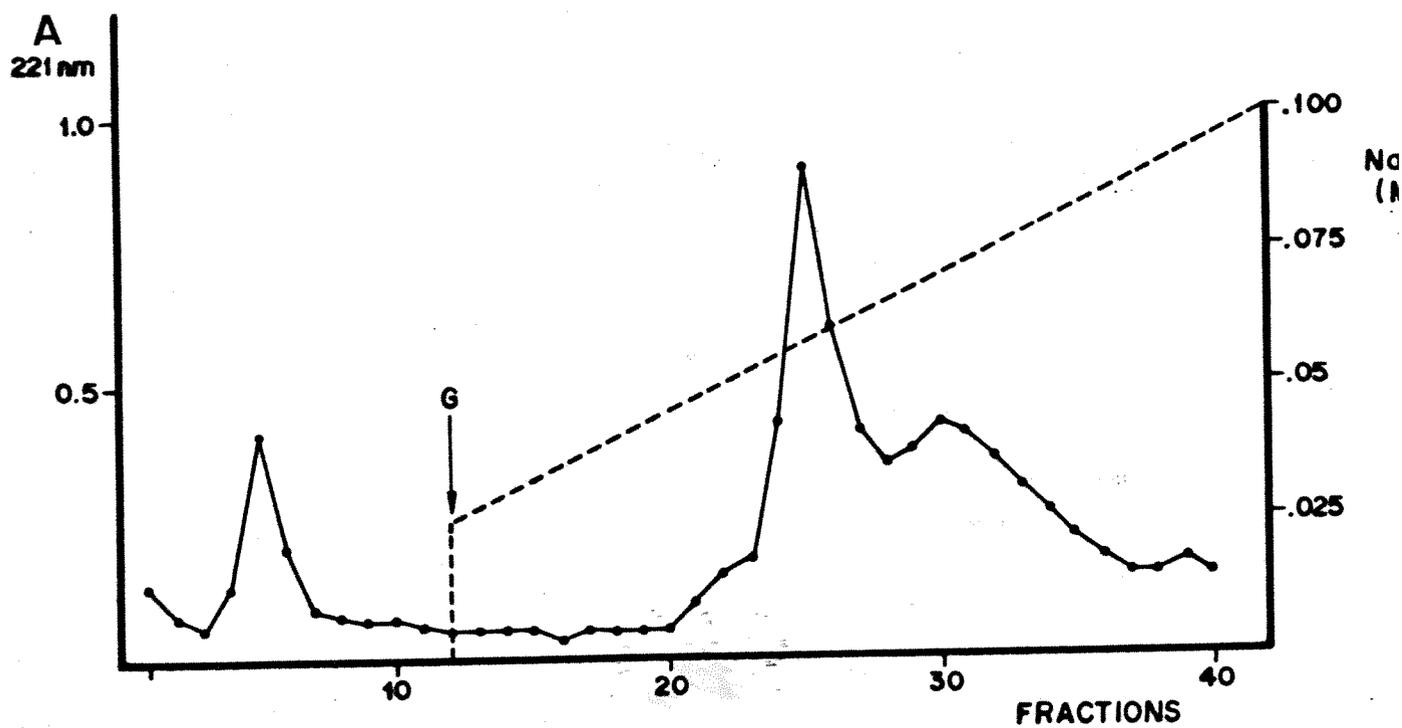


Fig. 87 - Cromatografia em CM-celulose de colágeno tipo I.

O colágeno I purificado de pele de rã foi submetido a cromatografia em CM-celulose. O material foi dissolvido em tampão acetato 20mM, pH4,8 e denaturado por 15 minutos a 45°C e então aplicado à coluna. Todo o procedimento foi efetuado a 43°C. O gradiente de eluição empregado foi de 0,025 a 0,1M de NaCl(- -). As frações obtidas foram analisadas quanto à absorção em 221 nm. Dois picos foram obtidos.

material precipitado com NaCl 3.5M da região de compressão guarda certa semelhança com o colágeno do tipo III. As maiores diferenças no conteúdo em aminoácidos das duas regiões correspondem à tirosina e aos aminoácidos ácidos. As diferenças nestes aminoácidos podem ser devida à extensão da digestão com pepsina, idéia que é reforçada pela ausência de hidroxilisina na colágeno tipo III.

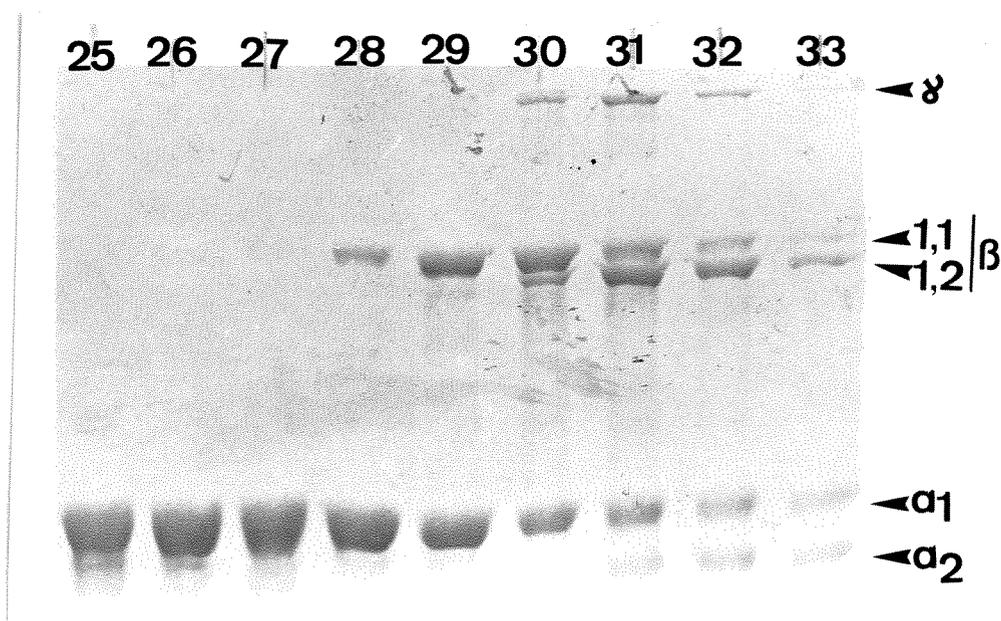


Fig. 88 - Padrão eletroforético das frações obtidas na cromatografia em CM-celulose de colágeno tipo I.

Aliqüotas das frações obtidas por cromatografia em CM-celulose de colágeno do tipo I de pele de rã foram precipitadas com etanol e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Nota-se que as primeiras frações continham a cadeia α_1 isolada mas que esta mesma cadeia mostra extrema dispersão quanto ao padrão de eluição da coluna e estende-se até a região de eluição da cadeia α_2 , de modo que estas não foram isoladas pela cromatografia. A posição das cadeias α , β e γ são indicadas. A numeração corresponde às frações obtidas na cromatografia.

Tabela IV - Análise de aminoácidos do colágeno I purificado de diferentes regiões dos tendões de rã. Os valores representam a frequência dos diferentes aminoácidos por 1000 resíduos. As cadeias alfa foram separadas por eletroeluição. Os valores mostrados para o colágeno tipo I das regiões de tensão (T) e de compressão (C) foram calculados a partir dos valores obtidos para suas cadeias alfa isoladas.

amino ácidos	Salamandra ¹		Rã ^{1,2} pele	Girino pele	T		C		C α ₁	C α ₂
	pele	cauda			α ₁	α ₂	T	C		
ASP	37	59	49	49	48	92	63	45	47	41
GLU	78	73	74	74	96	102	98	91	95	83
HYP	74	76	82	78	43	11	32	50	43	65
SER	55	59	50	50	63	77	68	54	60	42
GLY	334	328	362	382	335	287	319	329	323	340
HIS	4	5	7	6	0	0	0	0	0	0
ARG	58	51	55	45	34	38	35	36	36	35
TRH	17	17	26	22	23	28	25	22	23	20
ALA	118	111	109	111	56	41	51	60	57	67
PRO	114	126	87	87	83	42	69	105	94	127
TYR	3	4	4	2	24	37	28	18	21	13
VAL	22	19	17	17	24	29	26	23	24	21
MET	10	10	6	7	9	10	9	10	9	11
ILE	12	9	9	9	25	30	27	22	24	18
LEU	17	18	21	20	54	67	58	49	54	39
HYL	7	6	6	8	53	52	53	42	46	34
PHE	11	11	13	11	38	41	39	21	21	20
LYS	35	28	28	28	21	16	19	23	22	25

¹Dados reproduzidos de MAILMAN et alii (1974).

²Da espécie *Rana catesbeiana*, a mesma empregada neste trabalho.

Tabela V - Análise de aminoácidos de componentes colagênicos das regiões de tensão e de compressão de tendões de rã, obtidos por precipitação diferencial com NaCl. Os valores obtidos na análise de aminoácidos dos colágenos dos tipos I e III de pele e do colágeno do tipo II de cartilagem articular são apresentados para comparação. Os valores representam o número de resíduos por 1000. C e T correspondem às regiões de compressão e de tensão, respectivamente. 1,2 e 3,5 correspondem às concentrações de NaCl (em molaridade) em que os componentes colagênicos são precipitados.

amino ácidos	Pele					COL	COL
	Col I	C1,2	T1,2	C3,5	T3,5	III	II
ASP	47	45	74	50	44	40	49
GLU	93	86	122	95	92	82	106
HYP	78	50	36	72	82	75	90
SER	48	60	68	50	49	47	41
GLY	362	319	285	347	346	360	342
HIS	0	0	10	0	0	0	3
ARG	44	55	40	42	44	43	45
TRH	20	35	35	22	21	18	23
ALA	97	55	72	91	96	92	72
PRO	126	49	82	119	129	121	127
TYR	2	2	23	13	9	6	3
VAL	12	17	28	14	11	11	15
MET	7	6	12	6	7	6	8
ILE	7	15	25	10	7	7	8
LEU	15	44	48	22	19	17	25
HYL	2	8	4	6	6	0	11
PHE	11	52	23	14	14	14	17
LYS	26	81	22	23	22	24	14

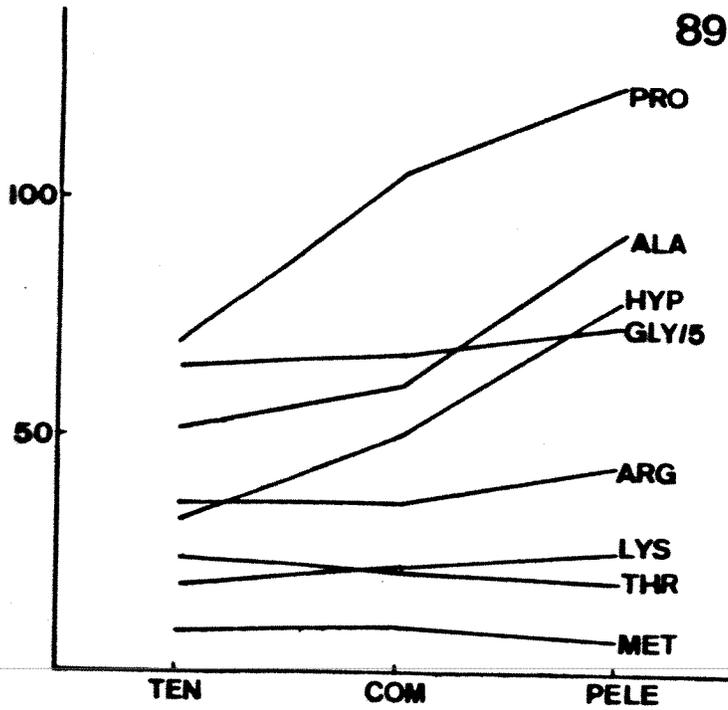


Fig. 89 - Variação no conteúdo em aminoácidos do colágeno do tipo I de pele e das regiões de compressão e de tensão. Nota-se um aumento no conteúdo relativo destes aminoácidos que aparentemente estão contidos nas região colagênica da molécula na seqüência indicada. O conteúdo em metionina e em treonina é aparentemente constante.

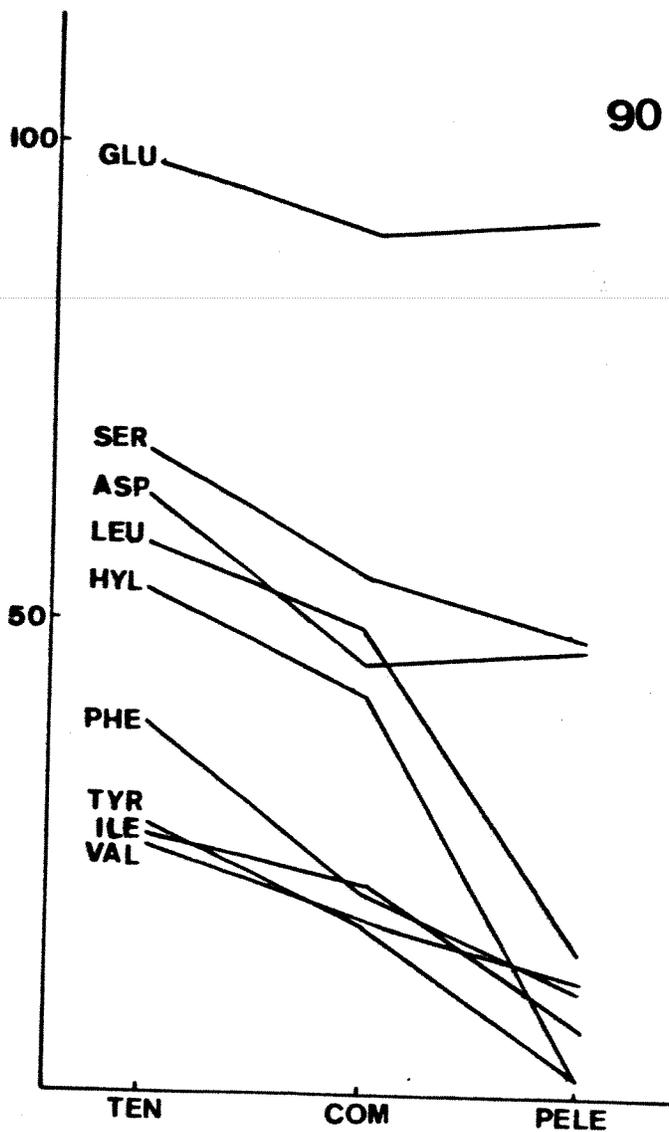


Fig. 90 - Variação no conteúdo em aminoácidos do colágeno do tipo I de pele e das regiões de compressão e de tensão. Nota-se um decréscimo no conteúdo relativo destes aminoácidos que aparentemente estão contidos nas regiões telopeptídicas da molécula na seqüência indicada.

Discussão

Considerações Gerais Sobre os Tendões Sujeitos a Forças de Compressão

Ao descrever as adaptações morfológicas dos anuros, KENT (1987) descreveu aspectos anatômicos das patas das rãs, detalhou as modificações sofridas pelos ossos e assumiu que a arquitetura óssea verificada resulta numa região plantar ampla que em associação com os dedos alongados e em "teia" formaria uma alavanca ideal para que o animal pudesse pular, que é única forma de locomoção dos anuros no solo. Esta estrutura esquelética especial e a forte musculatura destes animais só poderia redundar na existência de um tendão extremamente apto em adaptar os dois sistemas, num animal com diferentes formas de locomoção.

Tentativamente, a primeira referência à existência de uma região modificada do tendão do músculo plantaris longus de rãs pode ser atribuída a RETTERER (1918a), que descreveu a existência de estruturas sesamóides em alguns tendões. Neste trabalho o autor simplesmente menciona a existência de um sesamóide fibrocartilaginoso nos tendões de Aquiles das rãs, sem entrar em detalhes estruturais ou atribuir este achado a outro autor.

Ao descrever as formações sesamóides de tendões, RETTERER (1918a; b) assume que o aparecimento destas estruturas era devido ao estímulo funcional, caracterizado pela existência de pressão sendo aplicada sobre eles e à necessidade de deslizamento sobre uma superfície cartilaginosa, enquanto os autores que o precederam acreditavam que os sesamóides eram "corpúsculos estranhos às intenções do organismo", que "não entrariam no plano de organização do organismo", ou ainda que apareceriam somente em condições patológicas (RETTERER, 1918a). As conclusões de RETTERER são assumidas ainda hoje pelos autores envolvidos com o estudo de tendões sujeitos a forças de compressão.

Em 1937, PLÖTZ descreveu as bases fisiológicas da existência de um sesamóide nos tendões flexores digitais de coelhos. Na década de 70, os trabalhos liderados por FLINT (GILLARD et alii, 1979; MERRILLES & FLINT, 1980) sobre a estrutura e fisiologia dos tendões de coelho são tidos como clássicos na delimitação de respostas dos tendões a diferentes forças biomecânicas, principalmente pelos experimentos de modificações cirúrgicas do posicionamento dos tendões de forma que recebessem forças de compressão em sítios normalmente sob tensão e a remoção das forças de compressão das regiões onde estas estavam presentes. Dos resultados salienta-se a demonstração da queda de 60% no conteúdo de condroitino sulfato frente à remoção das forças de compressão (GILLARD et alii, 1979a).

A natureza fibrocartilaginosa das regiões modificadas nos tendões sujeitos a forças de compressão, embora inicialmente assumida como generalizada (VOGEL & KOOB, 1989; BENJAMIM & EVANS, 1990), após sua descrição nos coelhos (MERRILLES & FLINT, 1980), nos cães (OKUDA et alii, 1987a, 1987b) e

em bovinos (VOGEL et alii, 1986), começa a ser discutida a partir da descrição de regiões em diferentes tendões que apresentam maior ou menor diferenciação da estrutura fibrosa, frente a forças de compressão de intensidades variadas, bem como à presença de outros fatores biomecânicos menos aparentes (RALPHS et alii, 1991; 1992; RUFAl et alii, 1992).

No tendão patelar dos ratos foram encontrados dois sítios de estrutura fibrocartilaginosa, a inserção do tendão na patela e a suprapatela. Uma característica distintiva entre estas duas regiões, além dos aspectos estruturais, é a presença de colágeno do tipo II na primeira e sua ausência na segunda (BENJAMIM et alii, 1991; RALPHS et alii, 1991; 1992). Já o tendão calcâneo ou de Aquiles dos mesmos animais apresentam duas regiões sujeitas a forças de compressão e que apresentam aspectos bastante distintos. Uma delas de aspecto tipicamente fibroso, i.e como nos tendões, exhibe condroitino sulfato na matriz e vimentina no citoplasma das células, indicando a existência de forças adicionais às forças de tensão aplicadas sobre esta região do tendão (RUFAl et alii, 1992). A partir destes estudos foi proposta a existência de um gradiente de transformações composicionais e estruturais dos tendões frente à existência de forças de compressão com intensidades diferentes, ou associadas a outros estímulos biomecânicos menos evidentes (RUFAl et alii, 1992).

As modificações estruturais apresentadas pelo tendão do músculo plantaris longus de rãs assemelha-se em muitos aspectos àquelas descritas para os tendões flexores digitais de mamíferos (VOGEL & KOOB, 1989).

O desenvolvimento de uma estrutura dilatada, com propriedades de cartilagem no que se refere às suas cor e consistência, em tendões que sofrem mudança de direção, reflete a existência de uma situação biomecânica na qual o tendão recebe forças de compressão, além de atuar na transmissão das forças provenientes do músculo. Nesta situação o tendão deve deslizar sobre uma superfície e manter-se firme em sua posição enquanto transmite forças de tensão. Ambas necessidades são sanadas pela existência de uma cápsula sinovial, que se assemelha àquela descrita para os tendões flexores de cão (OKUDA et alii, 1987a) e de bovinos (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; VOGEL et alii, 1986) e difere daquela observada em coelhos (MERRILLES & FLINT, 1980). Nestes últimos ocorre o desenvolvimento do paratenon visceral, o qual substituiria a estrutura sinovial encontrada nos demais (MERRILLES & FLINT, 1980). Apesar de apresentar semelhanças anatômicas e fisiológicas com os tendões flexores dos mamíferos, os aspectos histológicos dos tendões flexores das rãs são bem diferentes. Nos mamíferos a região semelhante à cartilagem exhibe aspecto fibroso, pelo qual foi descrita como fibrocartilaginosa (BENJAMIN & EVANS, 1990). Este aspecto não é evidente na região de compressão dos tendões de rãs, que é formado por uma trama de feixes e fibras sem qualquer padrão evidente de organização e por espaços relativamente extensos ocupado por material não fibroso.

A existência de feixes relativamente espessos que deixam a região de tensão e inserem-se na região de compressão, formando um ângulo reto com a direção principal dos feixes da primeira, garantem que as duas regiões estabeleçam uma unidade funcional e permaneçam unidas durante o deslizamento do tendão. Estes feixes de ancoragem são bastante diferenciados, especialmente no que concerne à sua estrutura contorcida. O arranjo contorcido de um feixe de colágeno contraria princípios termodinâmicos nos quais um feixe de colágeno deve assumir forma distendida, a não ser que existam forças que o mantenham de outra forma (OAKES & BIALKOWER, 1977). A torção de um feixe exige um desalinhamento dos pontos de interação lateral dos filamentos componentes das fibrilas após rompimento das ligações que atuam na manutenção da agregação lateral. Embora estas alterações possam ocorrer frente a um estímulo mecânico, a sua manutenção depende do bloqueio dos sítios reativos ou da presença de elementos que mantenham a força de desalinhamento. A primeira situação pode ser alcançada pela presença de glicosaminoglicanos ácidos, bloqueando elementos de carga contrária, e a segunda, pela presença de componentes do sistema elástico, dois componentes

associados às fibras de colágeno nesta região. Além disto, os aspectos de pouca agregação das fibrilas e a fraca birrefringência exibida pelos feixes são indicativos da ausência de forças biomecânicas atuando continuamente sobre eles, como ocorre nos feixes da região de compressão.

Ao lado destes feixes é encontrada uma infinidade de fibras com espessuras variáveis. A existência de elementos fibrilares (fibras ou feixes primários e fibras muito finas) com espessuras tão variáveis indica que estes diferentes elementos estejam sujeitos a diferentes mecanismos de controle ou regulação, sugestivo da existência de um controle individualizado exercido por grupos de células situados em microambientes distintos e respondendo a diferentes sinais biomecânicos ou de outra natureza qualquer.

A existência de elementos fibrosos dispostos transversalmente com relação ao longo eixo do tendão e observados em cortes transversais parece indicar que o tendão deve resistir a forças aplicadas nesta mesma direção durante o estímulo mecânico. Desta forma estes feixes atuariam resistindo a estas forças, mantendo a estrutura do tendão. Por outro lado, o fato de que estes feixes também serem ligeiramente contorcidos ou ondulados sugere a necessidade de grande deformação da região de compressão para que estes feixes possam se alinhar antes de exercerem qualquer efeito útil de resistência. A movimentação dos feixes do estado contorcido para o alinhado seria possibilitada pela grande quantidade de glicosaminoglicanos detectados pelos métodos histoquímicos e bioquímicos.

Aspectos da Organização Macromolecular e da Estrutura em "Crimp"

Além do padrão histológico usual, a região de tensão assemelha-se aos tendões típicos também em suas características topoquímicas e topofísicas, como a birrefringência, que é um fenômeno óptico que revela aspectos importantes da organização macromolecular e supramolecular. A birrefringência exibida pela região de tensão antes e após aplicação dos testes topoquímicos é muito semelhante àquela descrita para outros tendões (VIDAL, 1970; VIDAL *et alii*, 1982; VIDAL & CARVALHO, 1990), o mesmo ocorrendo com o dicroísmo linear extrínseco do material corado pelos xylidine ponceau, sirius red e picrosirius (VIDAL, 1970; PIMENTEL & VIDAL, 1980; VIDAL *et alii*, 1982), que revelam aspectos similares ao nível de organização molecular. Apesar disto, é aparente que o estado de agregação lateral dos feixes dentro da região de tensão é maior na área periférica e diminui no sentido da região de compressão, conforme revelado pela intensidade de birrefringência. Isto claramente demonstra a participação diferenciada de diferentes áreas da região de tensão na transmissão de forças de tensão, o que seria compatível com a curvatura do tendão, de modo que as regiões mais externas teriam maior participação na transmissão da força de tensão proveniente do músculo.

Apesar de contorcidos, os feixes de ancoragem encontrados na região de compressão exibem birrefringência e dicroísmo linear extrínseco, embora com menores intensidades que os feixes da região de tensão, segundo avaliação visual, indicando uma menor ordenação molecular de seus componentes fibrilares, o que foi comprovado pelas análises ultraestruturais.

Várias estruturas compostas por colágeno são intensamente birrefringentes mas não exibem extinção total quando posicionadas paralelamente a um dos filtros de polarização, exibindo um bandado característico de faixas claras interpostas a faixas escuras, características do "crimp" (ELLIOT, 1965; VIIDIK, 1973; GATHERCOLE & KELLER, 1991). A presença ou ausência de "crimp" é dependente de vários fatores. Situações onde os tecidos encontram-se em tensão tendem a coincidir com a situação onde a quantidade de glicosaminoglicanos é baixa. Em cartilagens, onde a quantidade de glicosaminoglicanos é alta, a estrutura em "crimp" não ocorre (GATHERCOLE & KELLER, 1991). Entretanto, estas são condições extremas. O tendão

elástico de aves é um exemplo da convivência de "crimp", proteoglicanos e fibras elásticas (OAKES & BIALKOWER, 1977). Esta convivência também é notada nos feixes espessos da região de compressão. Neste caso, entretanto, a função do "crimp" é difícil de ser definida, principalmente frente à indefinição da função dos próprios feixes.

Ao contrário disto, a variação na estrutura em "crimp" observada na região de tensão pode ser facilmente associada às diferentes intensidades das forças de tensão a que estão sujeitas e à necessidade de distensão apresentadas pelas fibras em diferentes profundidades nesta região. Enquanto por um lado, as imperfeições da estrutura em "crimp" impossibilita a adoção de uma estrutura ondulada ideal e com parâmetros bem definidos, o que pode ser encontrado em alguns tendões com funções únicas, por outro elas claramente demonstram diferenças funcionais ao longo da estrutura.

Estes aspectos demonstram que, apesar de ter sido dividido em apenas duas regiões anatômicas e histológicas com propósitos descritivos, o tendão do músculo plantaris longus de rã exibe um complexo de arranjos macromoleculares presentes em microambientes distintos dentro das duas regiões principais. A existência destes microambientes deve ocorrer frente às forças de compressão a que o tendão está sujeito, além de ter que resistir a torções e fricções durante a transmissão de forças de tensão.

Os Tipos Celulares da Região de Compressão

Pelo menos três tipos celulares foram identificados na região de compressão. Células tipicamente fibroblásticas são encontradas em íntima associação com os feixes de colágeno. Há um tipo transicional e células típicas da região de compressão. A diferenciação entre as células fibroblásticas e as células típicas da região de compressão dá-se pelo aumento do volume citoplasmático com deposição de grande quantidade de filamentos intermediários. Este acúmulo de filamentos intermediários foi encontrado nas células da região de compressão dos tendões de coelhos (MERRILLES & FLINT, 1980). Depois disso a presença de filamentos intermediários foi determinada ultraestrutural e imunocitoquimicamente nas células das regiões submetidas a diferentes níveis de compressão nos tendões de ratos (BENJAMIM et alii, 1991; RALPHS et alii, 1991, 1992; RUFAL et alii, 1992). Nestes últimos trabalhos, foi sugerido que a presença de vimentina pode ser utilizada como marcadora da existência de forças de compressão sobre células do tecido conjuntivo.

Os filamentos intermediários identificados nas células da região de compressão apresentam inúmeras decorações laterais cuja natureza pode tentativamente associada aos prossomos, que são partículas de RNP, contendo RNAm bloqueado (ou reprimido?), que atingem altas massas moleculares e que estão sempre em íntima associação com componentes do citoesqueleto (GROSSI DE SA et alii, 1988).

As células fibroblásticas são observadas emitindo prolongamentos que atingem a intimidade dos feixes da região de compressão, demonstrando que a integridade da estrutura dos feixes é continuamente monitorada e que os arranjos observados não são devidos a processos degenerativos. Íntima associação das fibrilas de colágeno com a superfície dos fibroblastos foi sempre observada e relacionada a fenômenos de reabsorção e remodelação (VIDAL & VALDRIGHI, 1970; TEN CATE, 1972; VIDAL, 1972; ENVEMEKA, 1991; 1992) ou a processos associados com a formação de fibrilas (TRELSTAD & HAYASHI, 1979), envolvendo sempre o monitoramento da estrutura dos componentes fibrilares.

Por outro lado, as células típicas da região de compressão são peculiares por não exibirem qualquer tipo estrutural proeminente de associação com componentes da matriz extracelular e por possuírem superfície relativamente lisa, ao contrário das células da região de compressão de coelhos que possuem um sistema de

fibrilas de 24 nm reveladas pela fixação em presença de ácido tânico e que estão associadas a pontos específicos da superfície celular em um extremo e a placas eletrodensas situadas na matriz pericelular no outro, o que é tido como uma forma de fixação das células numa determinada posição (CARVALHO, 1993). Apesar disto as células típicas da região de compressão do tendão de rãs parecem estar em ativa síntese de material destinado à exportação, cuja natureza permanece por ser determinada, mesmo embora alguns dos grânulos de secreção exibam componentes fibrilares em seu interior. O significado da associação de partículas semelhantes a ribossomos com algumas das vesículas de secreção também é desconhecido. O complexo de Golgi destas células parece também exibir organização única, sendo constituído por um aglomerado de vesículas, sem a organização clássica destas organelas.

A maioria destes aspectos são semelhantes àqueles encontrados para as células da suprapatela de ratos (BENJAMIM et alii, 1991; RALPHS et alii, 1991, 1992).

Frete a estes aspectos da ultraestrutura dos tipos celulares da região de compressão, parece importante mencionar os mecanismos pelos quais as células monitorariam e atuariam na manutenção da composição e da estrutura da matriz extracelular. O mecanismo eletroquímico abordado na Introdução e defendido por alguns autores (VIDAL, 1963; 1964; 1966; 1969; GILLARD et alii, 1977; 1979a; VIDAL & MELLO, 1984; VIDAL, 1993) tem sido associado principalmente a um arranjo preciso dos componentes da matriz extracelular e principalmente da interação entre colágeno e proteoglicanos. Este arranjo preciso, encontrado nos tendões típicos está ausente da região de compressão. Parece plausível assumir a presença de mecanismos diferenciais de monitoração pelas células típicas da região de compressão, uma vez que estas células carecem do principal elemento de sustentação da hipótese eletroquímica, i.e. o arranjo encontrado na associação colágeno-proteoglicanos, mesmo embora os proteoglicanos da região de compressão exibam distribuição ordenada por si próprios. Neste sentido o mecanismo mecano-osmótico, segundo o qual as forças mecânicas atuariam na liberação de sinais por sistemas sensíveis à distensão da própria membrana plasmática precisa ser levado em consideração. Este mecanismo foi baseado na demonstração da existência de barorreceptores a nível celular (SACHS, 1987) e da identificação de canais iônicos sensíveis a forças mecânicas (MORRIS, 1990). WATSON (1991) aponta a adenilato ciclase, a translocase Na^+/H^+ e mesmo as enzimas envolvidas no metabolismo do fosfatidilinositol como prováveis candidatos que seriam ativados pela distensão da membrana, além de propor um protótipo do sistema envolvido com a detecção de forças mecânicas. O trabalho deste autor fundamenta-se principalmente na demonstração da abertura de canais iônicos e da liberação de segundos mensageiros desencadeadas por tratamentos hipo-ósóticos, que atuam na distensão da membrana plasmática (WATSON, 1989).

Os aspectos de degeneração celular encontrados na região de compressão podem estar associados à existência de traumas mecânicos suficientemente fortes para romper a membrana e levar as células à morte. A gengiva humana está sujeita a forças mecânicas intensas e nestes tecidos são também observadas células com a membrana plasmática rompida (VIDAL & VALDRIGHI, 1970; VIDAL 1972). Por outro lado, a presença de células que atuam na remoção dos resíduos celulares e na restauração da matriz extracelular adjacente demonstra a capacidade do tendão em recuperar-se de prováveis traumas mecânicos. A baixa frequência destas figuras associadas com o fato de que estes processos de recuperação de lesões são relativamente lentos, envolvendo a migração de células envolvidas no reparo, remoção dos resíduos celulares e restauração da matriz extracelular, faz crer que estes traumas são esporádicos e não ocorram de forma constitutiva, como deve ser o caso da gengiva.

A Presença de Componentes Associados ao Sistema Elástico

Segundo definição histológica o sistema elástico é formado pelas fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas. É comumente aceita a existência de diferentes estágios da maturação das fibras do sistema elástico. A fibras oxitalânicas seriam os primeiros elementos a serem encontrados e, com o desenvolvimento, haveria a deposição de material amorfo junto às microfibrilas constituintes das fibras oxitalânicas, formando as chamadas fibras elaunínicas (COTTA-PEREIRA *et alii*, 1976b). As fibras elásticas maduras são formadas por um core central de elastina e por fibrilas associadas à sua periferia (HESSE, 1987). Entretanto, as fibras oxitalânicas são também encontradas em algumas estruturas independente da idade do animal, o que conduziu alguns autores (ALEXANDER & GARDNER, 1983; HESSE, 1987) a assumir que estas fibras não se transformariam necessariamente nas demais.

Fibras pre-elásticas (elaunínicas e oxitalânicas) foram descritas em tendões (GAWLIK, 1965) e na cartilagens traqueal e articular (COTTA-PEREIRA *et alii*, 1984; HESSE, 1987) por meios de testes histoquímicos e da microscopia eletrônica de transmissão. Embora a presença destes componentes deva contribuir para as propriedades biomecânicas destas estruturas (HESSE, 1987), as suas funções continuam indeterminadas.

Num estudo sobre o sistema elástico dos tendões flexores digitais profundos de cães e de coelhos (CARVALHO *et alii*, 1993), as fibras elásticas não foram encontradas e as fibras oxitalânicas parecem ser o principal componente. As fibras oxitalânicas foram encontradas na região de compressão destes tendões como uma rede de fibrilas finas e ramificadas. Elas foram também encontradas na região de tensão onde ficam restritas aos espaços existentes entre os feixes de colágeno. O paratenon visceral também é rico em fibras oxitalânicas.

Um exame minucioso das micrografias exibidas por MERRILLES & FLINT (1980) permite a identificação de componentes da matriz extracelular descritos como "condensações em teia" e considerados pelos autores como agregados de proteoglicanos como sendo feixes de microfibrilas observados em corte transversal.

Fibras elásticas maduras foram encontradas nos tendões de rã, em especial no paratenon visceral e na região de compressão. Por outro lado, fibras pré-elásticas puderam ser detectadas por todo o tendão, em associação com a superfície dos feixes de colágeno, e mesmo dispersas nas regiões com predomínio de proteoglicanos. Qualquer que fosse a localização, entretanto, sempre foi observada a íntima associação de proteoglicanos com as microfibrilas do sistema elástico. A existência de fibras oxitalânicas nos tendões de animais adultos favorece a idéia da possibilidade de interrupção da maturação das fibras pré-elásticas, mesmo embora não se saiba se estas fibras oxitalânicas ainda irão se desenvolver em fibras elásticas, uma vez que fibras elaunínicas também foram encontradas.

Parece importante mencionar que a correlação entre as fibras oxitalânicas e as microfibrilas da matriz extracelular não tinha sido estabelecida até recentemente, embora muitas vezes assumida. Parece claro que as fibras oxitalânicas detectadas histoquimicamente são identificadas como feixes de microfibrilas de 10-12 nm ao microscópio eletrônico de transmissão. Desde o trabalho de CLEARY & GIBSON (1983), onde as microfibrilas associadas à elastina foram tratadas como sendo distintas de outras microfibrilas da matriz e mesmo das fibras oxitalânicas, vários aspectos das microfibrilas encontradas na matriz extracelular foram descobertos, especialmente através da técnica de sombreamento rotatório (WRIGHT & MAYNE, 1988; KEENE *et alii*, 1991). SAKAI e colaboradores (1986) identificaram uma glicoproteína componente das

microfibrilas de matriz, com 350 kDa, que denominaram de fibrilina e que foi localizada imunocitoquimicamente em diferentes tecidos, inclusive tendões. Recentemente KEENE e colaboradores (1991) demonstraram aspectos da estrutura macromolecular e da composição das microfibrilas, da sua extensibilidade assim como da distribuição periódica de epitopos da fibrilina ao longo da microfibrilas. SAKAI e colaboradores (1986) mostraram a presença de fibrilina nas microfibrilas de diferentes tipos de matriz extracelular, unificando termos como fibras oxitalânicas, microfibrilas associadas à elastina e microfibrilas da matriz extracelular.

Parece importante ressaltar que os estudos que envolvem experimentos delineados para testar as propriedades biomecânicas dos tendões e cartilagens (VIIDIK, 1973; EVANS & BARBENEL, 1975; VILAR-TA, 1986; OLOYEDE et alii, 1992) apresentam resultados que são constantemente associados à distribuição espacial das fibras de colágeno e à matriz composta por proteoglicanos. Na verdade, eles não foram hábeis em distinguir a participação das fibras pré-elásticas ou microfibrilas nas propriedades biomecânicas daquelas estruturas. A presença de microfibrilas nos tendões sujeitos às forças de compressão aguarda a definição de funções específicas mas, certamente, elas são de importância na microarquitetura da matriz, controlando a elasticidade do tendão. Elas também devem colaborar na integração do tendão como uma entidade bifuncional, hábil em transmitir forças de tensão apesar de estar sujeito a forças de compressão.

Os Componentes Proteoglicânicos e sua Participação na Fisiologia do Tendão

A grande quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados sugerida pelas respostas ao azul de toluidina e azul de alcian em suas diferentes variações, garante ao menos em parte as características de retenção de água e de resistência a compressão, comuns às cartilagens e apresentadas pela região de compressão. Estes resultados concordam com os achados bioquímicos deste trabalho e com estudos imunocitoquímicos (DANIEL & MILLS, 1988) e bioquímicos (GILLARD et alii, 1979a), que identificaram glicosaminoglicanos sulfatados na região de compressão de tendões de coelhos. Dá ênfase à presença de proteoglicanos intimamente associados aos feixes da região de compressão, o fato de que a digestão com a hialuronidase testicular remove o material basofílico e metacromático encontrado na superfície dos feixes. A nível ultraestrutural os componentes proteoglicânicos foram identificados como uma cobertura susceptível à hialuronidase testicular e à papaina e com distribuição aparentemente homogênea ao longo de toda a superfície dos feixes. A intensa deposição de glicosaminoglicanos na superfície dos feixes pode estar associada à manutenção do estado contorcido que eles apresentam na região de compressão, mesmo embora não haja suporte experimental para esta suposição.

Embora o material que ocupa os espaços delimitados pelos feixes e fibras da região de compressão pareça possuir uma estrutura difusa após coloração pelos xylydine ponceau, sirius red e picrosírius, a coloração pelo azul de toluidina associada à microscopia de polarização revela a presença de componentes fibrilares em sua composição. Não só este material, mas também aquele associado aos feixes, exibe birrefringência com cores anômalas e dicroísmo linear extrínseco negativo após tratamento com o azul de toluidina. Isto corrobora achados anteriores de ordenação molecular dos glicosaminoglicanos na matriz extracelular (VIDAL, 1963, 1964; VIDAL & MELLO, 1984) e revela que a deposição de glicosaminoglicanos ocorre de forma ordenada também neste tecido. Esta ordenação molecular parece ser importante na fisiologia e nos mecanismos de controle e manutenção do tecido (VIDAL, 1963, 1964; VIDAL & MELLO, 1984; VIDAL, 1993), o que tem chamado a atenção de diversos autores (HALL, 1979; TRELSTAD, 1984; ALBERTS et alii, 1989).

Parte dos glicosaminoglicanos encontrados na região de compressão está associado na formação de grandes proteoglicanos, conforme revelado pela filtração em gel de Sepharose CL-4B, pela eletroforese em

gel de agarose-acrilamida e pela ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio em condições dissociativas.

Com respeito à ultracentrifugação, parece importante notar que a presença dos grandes proteoglicanos fica restrita à fração de maior densidade (D1), enquanto foi detectada uma enorme dispersão dos componentes de baixa densidade (como o colágeno, pequenos proteoglicanos e alguns outros componentes não identificados) pelas frações D4, D3 e mesmo D2. Esta dispersão foi também encontrada por VOGEL & HEINEGÅRD (1985) que a interpretaram como sendo devida à dispersão e variabilidade de estrutura destes componentes, como foi determinado para os grandes proteoglicanos (HEINEGÅRD, 1977). Faz-se necessário notar, entretanto, que a ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio do material extraído por Gu-HCl 4M resulta na formação de uma película extremamente compacta na superfície da solução centrifugada o que indica que os componentes que deveriam estar contidos em D4 na verdade estão presentes em tão grande quantidade que não são contidos nesta fração, de modo a serem comprimidos na película superficial e dispersos nas frações anteriores. Desta forma pode-se atribuir esta dispersão ao impedimento espacial de acomodamento de todo o material nos limites da fração D4.

À presença de grandes proteoglicanos são imputadas as propriedades de resistência à compressão. A formação de grandes domínios com enorme concentração de cargas negativas devido a formação de agregados com ácido hialurônico resulta num acúmulo de água o que está intimamente associado com as propriedades biomecânicas das cartilagens (HASCALL & HASCALL, 1981; CARNEY & MUIR, 1988; HASCALL, 1988; GALLAGHER, 1989; HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992). A resistência da cartilagem, bem como o confinamento destas grandes moléculas extremamente solúveis num volume menor que aquele que ocupariam em solução e o efeito osmótico do tipo Donnan resultante, deve ser atribuído à trama de fibrilas de colágeno do tipo II, característico destes tecidos (CARNEY & MUIR, 1988; HASCALL & HASCALL, 1981). Desta forma as fibrilas de colágeno na cartilagem estariam sempre sob tensão, quer seja sob estímulo mecânico ou não (MAROUDAS, 1976). Embora com grande capacidade de resistência a forças de compressão dada uma grande capacidade de deformação elástica (CARNEY & MUIR, 1988; OLOYEDE et alii, 1992), as cartilagens hialinas são muito pouco flexíveis e de certa forma até "rígidas", dada a reduzida velocidade de modificação de forma resultante da dificuldade na redistribuição de água imposta pelos proteoglicanos (HARDINGHAM et alii, 1986; OLOYEDE et alii, 1992). Ao contrário, os tendões são extremamente flexíveis (VIIDIK, 1973). Partindo das propriedades de resistência à compressão exibida pelas cartilagens, dada a presença de grandes proteoglicanos, parece plausível que a presença destes componentes na região de compressão seja também a responsável pela capacidade do tendão em resistir a forças desta natureza.

Embora a fixação dos grandes proteoglicanos no tecido pudesse ser realizada pelas fibras mais finas da região de tensão, as análises às microscopias de polarização e eletrônica sugerem que elas não estejam em estado de tensão, como ocorre nas cartilagens (MAROUDAS, 1976). As fibrilas associadas em feixes também não teriam nenhum papel nesta retenção, como sugerido por seus aspectos morfológicos. Além de resistência à pressão, a região de compressão deve também possuir uma grande deformabilidade para poder deslizar sobre uma superfície curva, sem danos ou rompimento do tendão. Como a eficiência na imobilização dos proteoglicanos em seu estado hidratado depende inicialmente da configuração e do grau de entrelaçamento das fibrilas de colágeno (WEIGHTMAN & KEMPSON, 1979), é esperado que diferentes arranjos destes componentes possuam diferentes capacidades em reter os proteoglicanos sob diferentes pressões, o que resultaria em modificações na capacidade de resistir à pressões mas, fundamentalmente, na deformabilidade do tecido. Embora a capacidade de resistência à compressão não dependa da formação de agregados, a

movimentação dos proteoglicanos nos tecidos depende deste tipo de associação que aumentaria a viscosidade do tecido e conseqüentemente as suas propriedades visco-elásticas (MOW *et alii*, 1984; HARDINGHAM *et alii*, 1987). Isto seria devido ao aumento no número e na força das ligações que ocorrem entre as moléculas dos proteoglicanos com a formação dos grandes agregados (CARNEY & MUIR, 1988).

Provavelmente, é a deformabilidade dos complexos formados pelos proteoglicanos e pela trama de fibras finas que permite a movimentação dos feixes mais espessos, até o momento em que eles atuem como elementos de reforço frente a uma deformação demasiada alcançada numa movimentação brusca. Como a viscosidade dos componentes do tecido (e a sua conseqüente deformabilidade) é dependente da formação de agregados pelos grandes proteoglicanos, parece importante determinar se os grandes proteoglicanos da região de compressão do tendão de rã são capazes de interagir com o ácido hialurônico na formação de agregados.

A organização estrutural e as propriedades mecânicas dela decorrentes sugerem que na verdade os grandes proteoglicanos da região de compressão não sejam diretamente responsáveis pela capacidade de resitência à compressão exibida pelo tendão, mas sim que estes componentes estabeleçam um ambiente fluido altamente viscoso capaz de promover a coesão entre as fibras e feixes de colágeno, além de permitir o deslizamento destas estruturas. A malha flexível e elástica formada pelas fibras e feixes distendidos seriam na verdade os responsáveis pela resitência à compressão, dissipando estas forças em diferentes direções, antes que elas atinjam a região de tensão do tendão.

A presença do decorim e do fibromodulim pode estar associada à modulação da morfologia das fibrilas de colágeno e desta forma estar relacionados com as propriedades biomecânicas do tecido como um todo. Uma vez que foi demonstrado que estes pequenos proteoglicanos associam-se com o colágeno e que possivelmente estejam envolvidos com a modulação do diâmetro das fibrilas (VOGEL *et alii*, 1984; HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989; VOGEL & TROTTER, 1987), resta questionar o papel de cada um deles, a possibilidade de um papel sinérgico entre ambos ou a existência de características distintas de associação com as fibrilas de colágeno e conseqüentemente das funções de cada um. Estes pequenos proteoglicanos foram também detectados na região de compressão do tendão de bovinos, destacando-se o fato de que o fibromodulim elui da cromatografia em DEAE-celulose como um pico inicial e isolado do pico principal que contém os grandes proteoglicanos, o decorim e o biglicam (EVANKO & VOGEL, 1990). As tentativas de resolução deste pico isolado contendo o fibromodulim foram infrutíferas e, na verdade, o fibromodulim só foi identificado após correção da modificação de pH introduzida pela adição de uréia (7M) ao tampão (nas nossas condições de trabalho a adição de uréia eleva o pH para cerca de 8.0). Antes disso o fibromodulim não se ligava à resina de troca iônica (Resultados não mostrados). Além disto, em experimentos paralelos com tendões de boi também não foi conseguida a separação do fibromodulim em um pico único.

Os grânulos identificados pela fixação em presença de vermelho de rutênio foram inicialmente identificados como sendo devidos a "proteodermatam sulfato", através do emprego de enzimas específicas (SCOTT *et alii*, 1980). Análises imunocitoquímicas demonstram que o decorim é encontrado em associação com o colágeno e que sítios antigênicos desta molécula organiza partículas de ouro de forma helicoidal ao redor das fibrilas de colágeno (FLEISCHMAJER *et alii*, 1991). Resultados obtidos com o próprio vermelho de rutênio sugerem o mesmo arranjo espacial para os glicosaminoglicanos associados às fibrilas de colágeno (VIDAL & MELLO, 1984). O emprego de outros corantes catiônicos associados a procedimentos de concentração crítica de eletrólitos demonstraram a distribuição específica de bastonetes e não grânulos na superfície das fibrilas de colágeno (SCOTT, 1988). A safranina também forma grânulos na superfície das fibrilas (SHEPARD & MITCHEL, 1976).

Um problema concernente ao estudo de proteoglicanos nos tecidos é que, devido à sua extrema solubilidade, cerca de 65% destes componentes é perdido durante a fixação e demais etapas de preparação que envolvem soluções aquosas (HUNZIKER & SCHENK, 1987). Isto parece ocorrer mesmo na presença do vermelho de rutênio, que foi introduzido por LUFT (1965) justamente com o intuito de precipitar os proteoglicanos e diminuir a sua solubilização. Por este motivo, inúmeros outros corantes catiônicos têm sido testado no sentido de se obter uma melhor preservação dos proteoglicanos (HUNZIKER *et alii*, 1992), da mesma forma que novos procedimentos de fixação, envolvendo técnicas de congelamento ultra-rápido (HUNZIKER & SCHENK, 1987). Mesmo assim, o vermelho de rutênio continua sendo amplamente empregado. A adição de ácido tânico no fixador também é tida como um meio de preservar os proteoglicanos, sendo que padrões específicos de precipitação foram obtidos para o ácido hialurônico e para o condroitino sulfato (SINGLEY & SOLURSH, 1980).

HUNZIKER & SCHENK (1987) mencionam que dada a precipitação que ocorre entre os proteoglicanos e os corantes catiônicos, o nível de resolução alcançado é muito reduzido. Apesar disto a diferença de tamanho observada entre os grânulos associados às fibrilas de colágeno nas duas regiões dos tendões de rã é bastante evidente.

A demonstração de uma maior mobilidade eletroforética do decorim na região de tensão em associação com o menor tamanho dos grânulos de distribuição periódica na superfície das fibrilas de colágeno da região de tensão indicam que o decorim desta região possui menor massa molecular, provavelmente devido a um encurtamento da cadeia de glicosaminoglicano associada a esta molécula. A precisa caracterização desta molécula aguarda novos experimentos de remoção do glicosaminoglicano por enzimas para a verificação de características da estrutura das porções protéicas e do glicosaminoglicano.

Diferença de tamanho do decorim foi também observada em cultura de fragmentos de tendão de bovinos provenientes de regiões sujeitas a diferentes forças mecânicas (KOOB & VOGEL, 1987) e em aorta (REGISTER & WAGNER, 1990), sendo que neste último caso foram encontrados diferentes níveis de glicosilação no mesmo momento fisiológico. Modificação na extensão da cadeia de glicosaminoglicano do decorim e do biglicam foram também observada após a estimulação com o TGF- β (VOGEL & HERNANDEZ, 1992). Embora a razão da diferença de tamanho entre o decorim das duas regiões do tendão permanece desconhecida, a simulação das características de regiões sujeitas a forças de compressão (i.e., aumento no tamanho do decorim e do biglicam e aumento no conteúdo deste último) pela estimulação pelo TGF- β levou VOGEL & HERNANDEZ (1992) a levantar a possibilidade de um aumento na síntese deste fator de crescimento por células do tendão que estão sujeitas a forças de compressão.

Assumindo que o glicosaminoglicano da molécula do decorim não interage com as fibrilas e que projeta-se dela (possibilitando a precipitação na forma de grânulo com corantes catiônicos), a maior extensão desta cadeia no decorim da região de compressão poderia atuar na manutenção do maior distanciamento mantido entre as fibrilas. Parece importante notar que a estimulação do cervix uterino por PGF 2α resulta numa maior extensibilidade do tecido, o que foi atribuído à desorganização dos componentes colagênicos que é acompanhada por um aumento na quantidade de um pequeno proteoglicano contendo dermatam sulfato (KOKENYESI & WOESSNER, 1991). Este pequeno proteoglicano é assumido como sendo o decorim, já que os autores fazem distinção entre este e um médio proteoglicano, que seria o biglicam. A associação entre a desorganização ou afrouxamento da malha colagênica e o aumento da quantidade de decorim é realçada pelo fato de que após o parto o decorim é rapidamente degradado e, para KOKENYESI & WOESSNER (1991), esta degradação facilitaria a reagregação e reorientação das fibrilas de colágeno e a rápida reversão da dilatação.

A presença do biglicam na região de compressão e sua virtual inexistência na região de tensão deve ser reflexo da existência de amplos espaços interfibrilares, onde este pequeno proteoglicano tem sido localizado imunocitoquimicamente (LONGAS & FLEISCHMAJER, 1985; FLEISCHMAJER *et alii*, 1991). Mesmo embora tenha sido demonstrado uma possível atuação na inibição da adesão celular (WINNEMÖLLER *et alii*, 1992), a função precisa do decorim é desconhecida. Desta forma a interpretação do aumento na sua quantidade após estimulação com o TGF- β fica prejudicada, embora este aumento tenha sido associado a um sistema de tamponamento da estimulação autócrina pelo fator de crescimento (VOGEL & HERNANDEZ, 1992).

Tem sido assumido também que o biglicam atuaria na organização da matriz interfibrilar (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1989) e a sua relativa resistência à extração (PEARSON & GIBSON, 1982) sugere a firme associação com outros componentes da matriz extracelular que não o colágeno. A participação do biglicam na ordem molecular dos proteoglicanos dos espaços interfibrilares detectada pela microscopia de polarização após coloração com azul de toluidina na região de compressão permanece uma questão em aberto.

Interessantemente, a presença do fibromodulim, que sabidamente se associa às fibrilas de colágeno, não garante a formação de grânulos na presença do vermelho de rutênio. A explicativa para a não distinção de qualquer grânulo que pudesse ser associado com a presença do fibromodulim pode estar na possibilidade de que o glicosaminoglicano deste pequeno proteoglicano não precipite com o corante ou que o grânulo formado seja muito pequeno para ser resolvido nas ampliações conseguidas ao microscópio eletrônico em nossas condições de trabalho. Apesar disto, HEINEGÅRD & OLDBERG (1989) acreditam que pelo menos uma das duas moléculas com cadeias de queratam sulfato, identificadas por SCOTT & HAIGH (1988) de forma semelhante àquela aqui empregada, possa ser atribuída ao fibromodulim.

É interessante notar que nos tendões de rã o fibromodulim não sofre modificações expressivas conforme a região sob análise e que VOGEL & HERNANDEZ (1992) não se referem a alterações no conteúdo ou estrutura do fibromodulim frente ao tratamento com o TGF- β . Seria importante verificar o comportamento deste pequeno proteoglicano nos sistemas em que são detectadas variações estruturais no decorim e mesmo no biglicam, o que poderia talvez trazer informações sobre as funções de cada um destes componentes.

Características Ultraestruturais e Bioquímicas dos Componentes Colagênicos

Experimento imunocitoquímico demonstrou a presença de pequenas quantidades de colágeno do tipo II (VOGEL & KOOB, 1989) ao lado do colágeno do tipo I na região de compressão dos tendões flexores digitais profundos de bovinos (VOGEL *et alii*, 1986; VOGEL & KOOB, 1989). Na região de compressão dos tendões de rãs, o colágeno I representa a maior parte dos componentes colagênicos, mesmo embora alguns componentes de natureza também colagênica puderam ser separados por precipitação diferencial do material solubilizado por pepsina. O colágeno das duas regiões do tendão de rã é extremamente solúvel, o que foi indicado inicialmente pela grande quantidade de colágeno solubilizado pelo Gu-HCl 4M e a seguir pela desnaturação apresentada pelo material não solubilizado, que se torna susceptível à degradação pela pepsina. Esta susceptibilidade prestou-se à construção de um complexo mapa peptídico, obtido com a precipitação diferencial por NaCl a partir solução ácida.

Considerando que os fragmentos com mesma migração eletroforética correspondem ao mesmo segmento da molécula, parece plausível assumir que eles sofram modificações pós-traducionais distintas em cada região, uma vez que precipitam em concentrações de NaCl diferentes; em alguns casos, menores concentrações são necessárias para precipitar um fragmento de uma região, mas são insuficientes para precipitar o mesmo

fragmento da outra. Ainda mais, a presença de fragmentos que são específicos de uma das regiões sugere a existência de diferentes tipos de colágeno em cada uma delas, reforçando os achados por precipitação diferencial de componentes solubilizados por pepsina. Esta suposição é reforçada também pela análise de aminoácidos dos componentes que precipitam-se em diferentes concentrações de NaCl. Embora a natureza do material que precipita a 1,2M seja desconhecida e diferente para cada uma das regiões do tendão, o material precipitado a 3.5M assemelha-se na composição de aminoácidos ao colágeno do tipo III purificado de pele.

A importância da associação de diferentes tipos de colágeno ao colágeno do tipo I está justamente na ampliação do número de estruturas que podem ser formadas, com diferentes arranjos fibrilares e macromoleculares baseados no colágeno do tipo I, à maneira do que ocorre na pele (FLEISCHMAJER *et alii*, 1985; KEENE *et alii*, 1987), na córnea (LINSENMEYER *et alii*, 1985; KEENE *et alii*, 1988) e nos ossos (BAILEY *et alii*, 1992).

Com respeito à análise de aminoácidos do colágeno do tipo I, foi possível detectar grande variação entre o grau de hidroxilação de resíduos de lisina do material obtido de pele e aquele preparado dos tendões. Entretanto, o grau de hidroxilação de resíduos de lisina do colágeno do tipo I proveniente das duas regiões do tendão mostrou variação muito pequena, comparativamente com o observado na pele. A variação no conteúdo em hidroxiprolina entre as três amostras de colágeno do tipo I analisadas pode ser ao menos em parte atribuída a diferentes extensões de digestão das cadeias pela pepsina utilizada na solubilização. Mesmo embora o tratamento com pepsina tenha sido efetuado nas mesmas condições para as duas regiões do tendão, a variação relacionada ao grau de degradação enzimática das moléculas do colágeno do tipo I, comparando-se as duas regiões do tendão, pode ser correlacionada a diferenças na susceptibilidade à enzima que as moléculas podem exibir nos diferentes complexos que formam nas duas regiões. A presença dos proteoglicanos na região de compressão é um fator que deveria retardar a ação da enzima, primeiro pelo efeito de volume excluído (CARNEY & MUIR, 1988) e, segundo, por atuar competindo como substrato. Porém, a análise das figuras 89 e 90 demonstra haver uma diminuição gradual de aminoácidos contidos nas porções telopeptídicas na sequência região de tensão, região de compressão e pele, acompanhadas por acréscimo no conteúdo relativo dos aminoácidos presentes nas porções colagênicas (em hélice). Desta forma assume-se que a digestão com a pepsina do colágeno tipo I foi mais intensa na pele, seguida pela região de compressão e pela região de tensão. A justificativa mais plausível para este efeito de susceptibilidade à enzima reside no padrão de distribuição da espessura de diâmetros das fibrilas, de modo que na região de tensão, onde as fibrilas possuem os maiores diâmetros o colágeno do tipo I estaria mais protegido. Se esta os diferentes graus de susceptibilidade à pepsina justifica as diferenças na composição em aminoácidos do colágeno tipo I encontradas entre as regiões de tensão e de compressão, a variação observada deveria também refletir na composição das cadeias alfa. Na verdade a composição em aminoácidos das cadeias $\alpha 1$ do colágeno tipo I das duas regiões é muito semelhante, de forma que a variação principal está contida nas cadeias $\alpha 2$.

Existe uma tendência geral do colágeno do tipo I a apresentar crescente substituição de resíduos de serina e treonina por prolina e hidroxiprolina ao longo da escala evolutiva, e isto tem influência na temperatura de denaturação térmica exibida pelas moléculas (PIKKARAINEN, 1968). Nas amostras de colágeno I analisadas pode-se observar uma frequência maior de resíduos de serina, o que está de acordo com a tendência observada por PIKKARAINEN (1968). Nesta espécie ao menos, parece haver uma maior quantidade de resíduos ácidos, quando comparada ao material analisado por aquele autor para uma outra espécie de anuro. Também, enquanto o material de pele de rã analisado por ele possui 3 resíduos de histidina por mil aminoácidos, esta espécie não possui este aminoácido, o que parece ser difundido entre os diferentes componentes colagênicos analisados.

Mais significativas são as diferenças observadas entre as análises de aminoácidos por nós obtidas e resultados publicados por (19) para a mesma espécie (Tabela IV). A razão destas diferenças não é clara no momento, mas cumpre salientar que aqueles autores não empregaram a pepsina para a extração de colágeno, além de que, embora a espécie seja a mesma, existe um processo de isolamento e adaptação dos animais utilizados neste trabalho às condições de climáticas e de cultivo em nossa região.

As fibrilas de colágeno da região de tensão não exibem a distribuição bimodal dos diâmetros característica dos tendões (PARRY, 1978; PARRY et alii, 1978a; 1978b). Nesta região são encontradas fibrilas bastante espessas por entre as quais são encontradas fibrilas com diâmetros menores, de forma que cerca de 50% da área seccional seja ocupada por elementos fibrilares. Isto está de acordo com o esquema proposto de aumento da fração volumétrica das fibrilas pela distribuição bimodal encontrada em outros tendões sem aumento desregrado do diâmetros das fibrilas (PARRY, 1978; PARRY et alii, 1978a; 1978b). Por sua vez, as fibrilas da região de compressão são bem mais finas e com espaços maiores entre elas. Baseado em cálculos realizados para caracterizar a distribuição de diâmetros das fibrilas, JONES (1991) conclui que há uma tendência geral de espessamento das fibrilas frente ao envelhecimento e frente à estimulação mecânica.

Embora para alguns autores toda a informação necessária para a formação de fibrilas esteja contida na própria molécula do colágeno (KUIVANIEMI et alii, 1991), existem elementos extrínsecos às moléculas de colágeno que podem atuar na regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno. A produção de novas moléculas de colágeno, que são os blocos fundamentais da estrutura, é essencial para que as fibrilas possam se espessar (BRODSKY & EIKENBERRY, 1985) e, conseqüentemente, crescer em extensão (HUKINS & ASPDEN, 1985). Além disto, o grau de hidroxilação e o grau de glicosilação são também fatores que influenciam na formação de fibrilas e, aparentemente, na espessura que elas são capazes de atingir (BRASS & BENSUSAN, 1976; MILLER, 1984). Níveis alterados de hidroxilação de resíduos de lisina, por exemplo, são conhecidos em condições patológicas do osso, como na osteoporose (BAILEY et alii, 1992).

Aventada a hipótese de que o espessamento das fibrilas possa ocorrer por fusão entre elas, o que ocorre nos estágios iniciais de formação dos tendões (BIRK et alii, 1989) ou em processos de indução de ligações cruzadas *in vitro* (BAI et alii, 1992), a associação do decorim e do fibromodulim à superfície das fibrilas tem sido sugerida como elemento que impediria a ocorrência destas fusões (SCOTT, 1988). A presença destes componentes em locais onde existe uma distribuição bimodal de diâmetros das fibrilas impediria a fusão das fibrilas mais finas com as mais espessas, o que traria prejuízo às propriedades biomecânicas dos tendões (HUKINS & ASPDEN, 1985).

Além do padrão paralelo de fibrilas típico da região de tensão, foi possível detectar variações referentes à existência de fibrilas que correm perpendicularmente ao tendão e parecem integrar os diferentes feixes, conforme sugerido por JOZSA e colaboradores (1991). Além disso foram também identificadas fibras com extremidades que se abrem em leque e cujas fibrilas são integradas nos feixes adjacentes, cuja natureza permanece desconhecida. Entretanto, parece ser provável que estes componentes pertençam ao sistema elástico e que sejam típicos deste tipo de tendão, de que possuam natureza colagênica, uma vez que estas formações não foram ainda descritas, até onde vai o nosso conhecimento.

Os aspectos de ondulação e de desagregação dos feixes da região de compressão observados a nível histológico coincidem com um arranjo pouco ordenado dos componentes fibrilares que os compõem, ao contrário do que se observa na região de tensão. As fibrilas das feixes da região de compressão são reunidas em grupos onde apresentam-se extremamente contorcidas e com disposição aparentemente independente das demais encontradas em diferentes grupos. Além disto existe um aumento no espaço interfibrilar nesta região.

A manutenção deste estado pouco ordenado poderia tentativamente ser atribuída à existência de grande quantidade de proteoglicanos nos espaços interfibrilares, mas parece essencialmente refletir a ausência de um estímulo mecânico constante, coerente com o arranjo paralelo.

Embora seja patente que o colágeno possa assumir organizações diferenciadas do arranjo paralelo encontrado nos tendões e ligamentos e exibir propriedades biomecânicas compatíveis com o tecido em questão, como na pele, na superfície articular e nas lâminas basais dentre outros (VIIDIK, 1973), o arranjo dos elementos fibrilares encontrados na região de compressão é pouco compreensível, exceto frente à possibilidade que estes elementos sejam de importância em condições extremas de estimulação biomecânica, ocasionados por movimentação brusca, talvez como nos saltos.

Com relação à trama de colágeno, é necessário associar o tipo de arranjo dos elementos fibrilares com o tipo de deformação a que o tecido está sujeito. No coelho, por exemplo, os componentes fibrilares são arranjados em feixes espessos dispostos em várias direções em diferentes planos paralelos com a interface tendão- superfície da articulação (MERRILLES & FLINT, 1980). Desta forma o tendão pode resistir às forças de compressão dispersando-as pelas diferentes direções dos feixes nos diferentes planos. No cão este arranjo é ligeiramente variável (OKUDA et alii, 1987a; observações não publicadas), sendo que os feixes parecem não estar dispostos em planos perfeitamente paralelos. Isto seria uma indicação de que este tendão está sujeito a deformações adicionais aparentemente não existentes nos tendões de coelhos (CARVALHO, HF - observações não publicadas). Nesta linha de raciocínio, os tendões de rã estariam sujeitos a maiores deformações que os tendões dos cães e dos coelhos, o que pode estar relacionado a uma maior mobilidade do tendão face à presença de duas formas de locomoção destes animais, o nado e os saltos.

Como já assumido acima, somente nestas condições extremas estes feixes seriam distendidos e poderiam exercer resistência. Associado à distribuição dos feixes dispostos transversalmente na região de compressão e ligados aos componentes das cápsulas do tendão, estes feixes seriam responsáveis pela integridade do tendão. A distinção deste arranjo com aqueles observados em cartilagens pode ser associada à necessidade de que estes tendões apresentem muito maior deformabilidade. Desta forma os grandes proteoglicanos estariam envolvidos na coesão dos feixes e fibras de colágeno e em permitir o deslizamento destas estruturas, componentes fibrilares mais finos estariam relacionados à uma relativa imobilização dos proteoglicanos e os feixes mais espessos atuariam na resistência da estrutura frente a um estímulo mecânico mais brusco, talvez alcançado nos saltos, e principalmente na resistência fina à compressão. Os pequenos proteoglicanos relacionam-se provavelmente à manutenção da morfologia das fibrilas e na interação entre elas. Além disto, os componentes associados ao sistema elástico atuariam na restauração da posição inicial após a deformação.

Frente a este quadro, a relativa falta de mecanismos de ancoragem das células típicas da região de compressão impediria que elas fossem danificadas pela movimentação de componentes da matriz.

Conclusões

1. O tendão do músculo plantaris longus do anuro *Rana catesbeiana* está sujeito a forças de compressão, de torção e de fricção na região em que contorna a articulação tibio-fibular distal.
2. Na região onde está sujeito a forças de compressão, o tendão desenvolve uma saliência de aspecto cartilaginoso, à semelhança do que ocorre nos tendões flexores digitais profundos de alguns mamíferos, embora o estudo histológico e histoquímico desenvolvido demonstre aspectos estruturais e de distribuição de alguns componentes químicos que são únicos e distintos dos tendões dos mamíferos que desenvolvem uma fibrocartilagem, frente a mesma situação biomecânica.
3. Três tipos celulares predominam na região de compressão. Fibroblastos típicos, células típicas da região de compressão e um tipo intermediário. A diferenciação entre estas células consiste basicamente do acúmulo crescente de filamentos do tipo intermediário e na forma de interação com a matriz extracelular. Desta forma as células típicas da região de compressão são arredondadas e com citoplasma preenchido por filamentos intermediários, sendo que as demais organelas ficam restritas a pequenas áreas citoplasmáticas e ao redor do núcleo. Apesar desta diferenciação estas células são ativas na síntese e exportação de componentes da matriz extracelular.
4. Na região de compressão são encontradas fibras onduladas ou contorcidas de diferentes espessuras que assumem diferentes direções ao longo da estrutura do tendão e estão imersas numa matriz abundante de proteoglicanos. O arranjo de algumas destas fibras ou dos feixes primários sugere a inexistência de estimulação mecânica freqüente, parecendo estabelecer traves de resistência à deformação demasiada. A região de tensão possui aspecto tipicamente fibroso, porém sendo estruturada por microambientes discerníveis à microscopia de polarização.
5. Cada feixe da região de compressão possui um complexo proteoglicânico associado à sua superfície, formando uma cobertura susceptível à degradação pela papaina e pela hialuronidase testicular. Os espaços interfibrilares também são preenchidos por componentes proteoglicânicos. Nestas duas situações, foi

demonstrado que os glicosaminoglicanos estão dispostos de forma ordenada, como revelado pela birrefringência e pelo dicroísmo linear detectados após coloração com azul de toluidina.

6. A região de compressão possui cerca de 7 vezes mais glicosaminoglicanos que a região de tensão, sendo que parte destes são encontrados na formação de grandes proteoglicanos, como determinado por experimentos de gel filtração em Sepharose CL-4B, por eletroforese em gel de agarose-acrilamida e por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio. Grandes proteoglicanos foram também identificados na região de tensão, porém em quantidade muito menor. Os grandes proteoglicanos da região de compressão precipitam na presença de vermelho de rutênio na forma de grânulos unidos por filamentos finos e estabelecendo estruturas em anel.

7. Contrário ao até então assumido, atribui-se aos grandes proteoglicanos a função de manter a coesão entre os feixes de colágeno e de estabelecer um ambiente altamente viscoso que permite o deslizamento dos mesmo feixes que, ao atingirem o estado estirado, seriam os responsáveis pela resistência à compressão, dispersando estas forças em diferentes direções antes que elas atinjam a região de tensão. Os grandes proteoglicanos teriam função indireta na capacidade de resistência à compressão exibida pelo tendão.

8. Os pequenos proteoglicanos decorim e biglicam estão presentes na região de compressão. Enquanto o biglicam está virtualmente ausente da região de tensão, o decorim foi identificado também nesta região, porém migrando mais rapidamente no gel de poliacrilamida na presença de SDS, o que indica uma redução no tamanho da única cadeia de glicosaminoglicano que possui. Esta diminuição de tamanho do decorim foi confirmada ultraestruturalmente pela fixação na presença de vermelho de rutênio que resulta na formação de grânulos associados à superfície das fibrilas de colágeno e com distribuição periódica visivelmente menores se comparados com os grânulos equivalentes na região de compressão.

9. Fibromodulim, o terceiro pequeno proteoglicano, foi identificado nas duas regiões, sem apresentar diferenças estruturais entre elas.

10. O colágeno do tipo I é o principal componente colagênico encontrado nas duas regiões do tendão, embora a presença de outros componentes de natureza colagênica seja sugerida pelas diferenças observadas num complexo mapeamento peptídico obtido por digestão com pepsina e pela detecção de componentes colagênicos separados por precipitação diferencial em concentrações diferentes daquela onde ocorre a precipitação do colágeno do tipo I e que possuem composição em aminoácidos característica.

11. As fibrilas de colágeno da região de compressão apresentam diâmetros mais finos e com distribuição mais restrita que as fibrilas da região de tensão, que atingem diâmetros relativamente elevados, além de exibir uma distribuição bastante larga de valores, sem a caracterização de populações determinadas.

12. A **associação** de figuras morte celular com aspectos de remodelação, de padrão pouco usual de arranjo e de **distribuição de feixes** e da organização das fibrilas de colágeno com grande quantidade de proteoglicanos revelam uma **grande capacidade de deformação do tendão**, além de resistência à compressão. Esta alta deformabilidade permite ao tendão contornar um **extremidade curva** sem prejudicar a transmissão de forças de tensão, **mesmo** na presença de torções e de forças de fricção. Estes aspectos indicam também que o tendão está sujeito a **traumas mecânicos esporádicos**, provavelmente ocorridos durante alguns tipos de saltos.

Referências

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JW (1989) **Molecular Biology of the Cell**. Garland, NY. 2nd. ed.
- Alexander RA, Gardner A (1983) Elastic and precursor fibres in the normal human eye. *Exp Eye Res* 36: 305-315.
- Anderson JC (1975) Isolation of a glycoprotein and proteodermatan sulphate from bovine Achilles tendon by affinity chromatography on Con A-sepharose. *Biochim Biophys Acta* 279: 444-455.
- Anderson JC (1982) Bovine flexor tendon contains aggregating proteoglycans similar to that of cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1390-1394.
- Bai P, Phua K, Hardt T, Cernadas M, Brodsky B (1992). Glycation alters collagen fibril organization. *Connect Tissue Res* 28: 1-12.
- Bailey AJ, Wotton SF, Sims TJ, Thompson PW (1992) Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 801-805.
- Becker U, Novack H, Gay S and Timpl R (1976) Production and specificity of antibodies against the aminoterminal region in type III collagen. *Immunology* 31: 57-65.
- Benjamin M, Evans E.J. (1990) Fibrocartilage. *J Anat* 171: 1-15.
- Benjamin M, Tyers RNS, Ralphs JR (1991) Age-related changes in tendon fibrocartilage. *J Anat* 179: 127-136.
- Birk DE, Southern JF, Zycband EI, Fallon JT, Trelstad RL (1989) Collagen fibril bundles: a branching assembly unit in tendon morphogenesis. *Development* 107: 437-443.
- Bouteille M, Pease DC (1971) The threedimensional structure of native collagenous fibrils, their proteinaceous filaments. *J Ultrastruct Res* 35: 314-338.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brass LF, Bensusan HB (1976) On the role of the collagen carbohydrate residues in the platelet collagen interaction. *Biochim Biophys Acta* 444: 43-52.
- Brodsky B, Eikenberry E (1985) Supramolecular collagen assemblies. *Ann NY Acad Sci* 460: 74-84.

- Caldini EG, Caldini N, DePasquale V, Strocchi R, Guiardi S, Ruggeri A, Montes GS (1990) Distribution of elastic system fibre in the rat tail tendon and its associated sheaths. *Acta Anat* 139: 341-348
- Carvalho HF (1993) Identificação de componentes do sistema elástico em tendões sujeitos a forças de compressão. Relatório Técnico apresentado ao FAEP-UNICAMP.
- Carvalho HF, Vidal BC (1990) Macromolecular organization of the chitin system of the pen in *Loligo brasiliensis*. *Zool Jb Anat* 121: 39-52.
- Carvalho HF, Taboga SR, Lino Neto J (1993) Microfibrils: neglected components of pressure-bearing tendons. *Ann Anat*, no prelo.
- Carney SL, Muir H (1988) The structure and function of proteoglycans. *Physiol Rev* 68: 858-910.
- Castagnola P, Tavella S, Gerecke DR, Dublet B, Gordon MK, Seyer J, Cancedda R, van der Rest M, Olsen BR (1992) Tissue-specific expression of type XIV collagen - a member of the FACIT class of collagens. *Eur J Cell Biol* 59: 340-347.
- Cleary EG, Gibson MA (1983) Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int Rev Connect Tissue Res* 10: 97-209.
- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF (1976a) The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic related fibers. *Stain Technol* 51: 7-11.
- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, Bittencourt-Sampaio S (1976b) Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol* 66: 146-148.
- Cotta-Pereira G, Del-Claro LM, Montes GS (1984) Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. *Acta anat* 119: 80-85.
- Daniel JC, Mills DK (1988) Proteoglycan synthesis by cells cultured from regions of the rabbit flexor tendon. *Connect Tissue Res* 17: 215-230.
- Diamant J, Keller A, Baer E, Litt M, Arridge RGC (1972) Collagen, ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc R Soc Lond* 180B: 293-315.
- Dische Z (1947) A new colorimetric reaction for hexauronic acids. *J Biol Chem* 167: 189-198.
- Elliot DH (1965) Structure and function of mammalian tendons. *Biol Rev* 40: 392-421.
- Enwemeka CS (1991) Membrane-bound intracellular collagen fibrils in fibroblasts and myofibroblasts of regenerating rabbit calcaneal tendons. *Tissue Cell* 23: 173-190.
- Enwemeka CS (1992) Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to He:Ne laser beam. *Tissue Cell* 24: 511-523.
- Evanko SP, Vogel KG (1990) Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix* 10: 420-436.
- Evans JH, Barbenel JC (1975) Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Vet J* 7: 1-8.
- Eyre DR, Paz MA, Gallop PM (1984) Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* 53: 717-748.

- Eyre DR, Apon S, Wu JJ, Ericsson L, Walsh KA (1987) Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Letters* 220: 337-341.
- Fleischmajer R, Perlish J, Timpl R (1985) Collagen fibrillogenesis in human skin. *Ann NY Acad Sci* 460: 246-257.
- Fleischmajer R, Fisher LW, MacDonald ED, Jacobs L, Perlish JS, Termine JD (1991) Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J Struct Biol* 106: 82-90.
- Flint MH, Merrilles MJ (1977) Relationship between the axial periodicity and staining of collagen by the Masson trichrome procedure. *Histochem J* 9: 1-13.
- Fullmer HM, Lillie RD (1958) The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. *J Histochem Cytochem* 6: 425-430.
- Gallagher JT (1989) The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. *Curr Opin Cell Biol* 1: 1201-1218.
- Gathercole LJ, Keller A (1991) Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix* 11: 214-234
- Gawlik Z (1965) Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. *Folia histochem cytochem* 3: 233-251.
- Gerard C (1990) Purification of glycoproteins. *Meth Enzymol* 182: 529-539.
- Gillard GC, Birnbaum P, Reilly HC, Merrilles MJ, Flint MH (1979a) The effect of charged synthetic polymers on proteoglycan synthesis and sequestration in chick embryo fibroblast cultures. *Biochim Biophys Acta* 584: 520-528.
- Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, Flint MH (1979b) The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect Tissue Res* 7: 37-46.
- Grossi de Sa M-F, Martins de Sa C, Harper F, Olink-Coux M, Huesca M, Scherrer K (1988) The association of prosomes with some of the intermediate filaments of the animal cell. *J Cell Biol* 107: 1517-1530.
- Ham AW (1974) **Histology**. Lippincott, Philadelphia. 7th. ed.
- Harab RC & Mourão PAS (1989) Increase of chondroitin 4-sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. *Biochim Biophys Acta* 992: 237-240.
- Hall BK (1978) **Developmental and Cellular Skeletal Biology**. Academic, New York. 304p.
- Hardingham TE, Beardmore-Gray M, Dunham DG, Ratcliffe A (1986) Cartilage proteoglycans. In: Evered D, Whelan J (eds.) **Cyba Foundation Symposium on Functions of Proteoglycans**. John Wiley & Sons, Chichester. p. 30-39.
- Hardingham TE, Muir H, Kwan MK, Lai WM, Mow VC (1987) Viscoelastic properties of proteoglycans in solutions with varying proportions present as aggregates. *J Orthop Res* 5: 36-46. Cit. Carney & Muir (1988), op. cit.
- Harrington MG (1990) Elution of protein from gels. *Meth Enzymol* 182: 488-495.

- Hascall VC (1988) Proteoglycans: the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan of cartilage. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* 1: 189-198.
- Hascall VC, Hascall GK (1981) Proteoglycans. In: Hay ED (ed) **Cell Biology of Extracellular Matrix**. Plenum, NY, 1981. p. 39-63.
- Hedbom E, Heinegård D (1989) Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J Biol Chem* 264: 6869-6905.
- Heinegård D (1977) Polydispersity of cartilage proteoglycans. Structural variations with size and bouyant density of the molecules. *J Biol Chem* 252: 1980-1989.
- Heinegård D, Oldberg A (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 3: 2042-2051.
- Heinegård D, Pimentel ER (1992) Cartilage Matrix Proteins. In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis**. Küttner K **et alii** (eds). Raven, NY, 1992. Cap. 7.
- Heinegård D, Sommarin Y (1987a) Proteoglycans: An overview. *Meth Enzymol* 144: 305-319.
- Heinegård D, Sommarin Y (1987b) Isolation and characterization of proteoglycans. *Meth Enzymol* 144: 319-372.
- Hermann H, Dessau W, Fessler LI, von der Mark K (1980) Synthesis of types I, III and AB₂ collagen by chicken tendon fibroblasts *in vitro*. *Eur J Biochem* 105: 63-74.
- Hesse I (1987) The occurrence of elastic system fibres in the matrix of normal articular cartilage. *Cell Tissue Res* 248: 589-593.
- Hofmann H, Fietzek PP, Kühn K (1978) The role of polar and hydrophobic interactions for the molecular packing of type I collagen: a three-dimensional evaluation of the amino acid sequence. *J mol Biol* 125: 137-165.
- Hukins DWL, Aspden RM (1985) Composition and properties of connective tissues. *Trends Biochem Sci* 10: 260-264.
- Hunziker EB, Schenck RK (1987) Structural organization of proteoglycans in cartilage. In: Wight TN, Mecham RP (eds.) **Biology of Proteoglycans**. Academic, NY. p. 155-185.
- Hunziker EB, Ludi A, Herrmann W (1992) Preservation of cartilage matrix proteoglycans using cationic dyes chemically related to ruthenium hexamine trichloride. *J Histochem Cytochem* 40: 909-917.
- Jimenez SA, Yankowski R, Bashey RI (1978) Identification of two new collagen alpha chains in extracts of lathyr chick embryo tendons. *Biochem Biophys Res Commun* 81: 1298-1306.
- Jones AJ, Bee JA (1990) Age- and position-related heterogeneity of equine tendon extracellular matrix. *Res vet Sci* 48: 357-364.
- Jones PN (1991) On collagen fibril diameter distribution. *Connect Tissue Res* 26: 11-21.
- Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A (1991) Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta anat* 142: 306-312.

- Keene DR, Sakai LY, Bachinger HP, Burgeson R (1987) Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J Cell Biol* 105: 2393-2402.
- Keene DR, Sakai LY, Bachinger HP, Burgeson R (1988) Collagen type I and V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol* 106: 999-1008.
- Keene DR, Maddox BK, Kuo H-J, Sakai LY, Glanville RW (1991) Extraction of extendable beaded structures and their identification as fibrillin-containing extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem* 39: 441-449
- Kent GC (1987) **Comparative Anatomy of the Vertebrates**. Times Mirror/Moxby College, Saint Louis, 1987.
- Kivirikko KI, Myllylä R (1985) Post-translational processing of procollagens. *Ann NY Acad Sci* 460: 187-201.
-
- Kokenyesi R, Woessner Jr JF (1991) Effect of hormonal perturbations on the small dermatan sulfate proteoglycan and mechanical properties of the uterine cervix of late pregnant rats. *Connect Tissue Res* 26: 199-205.
- Koob TJ, Vogel KG (1987) Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Biochem J* 246: 589-598.
- Krstic RV (1985) **General Histology of the Mammal**. Springer-Verlag, Berlin.
- Kühn K (1987) The classical collagens: Types I, II, and III. In: Mayne R, Burgeson RE (eds.) **Structure and Function of Collagen Types**. Academic, NY. p. 1-42.
-
- Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ (1991) Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J* 5: 2052-2060.
- Lev R, Spicer SS (1964) Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* 12: 309.
- Lillie RD (1958) Acetylation and nitrosation of tissue amines in histochemistry. *J Histochem Cytochem* 6: 352-362.
- Lillie JH, MacCallum DK, Scalletta LJ, Occhino JC (1977) Collagen structure: Evidence for a helical organization of the collagen fibril. *J Ultrastruct Res* 58: 134-143.
- Linsenmayer TF, Fitch JM, Gross J, Mayne R (1985) Are collagen fibrils in the developing avian cornea composed of two different collagen types? Evidence from monoclonal antibody studies. *Ann NY Acad Sci* 460: 232-245.
- Lison L (1960) **Histochimie et Cytochimie Animales**. Gautier-Villars, Paris.
- Longas MO, Fleishmajer R (1985) Immunoelectron microscopy of proteodermatan sulfate in human mid-dermis. *Connect Tiss Res* 13: 117-125.
- Luft JH (1965) Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red staining. *J Cell Biol* 23: 54-55.
- Luft JH (1971) Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat Rec* 171: 369-416.

- Mailman ML, Kirkpatrick DS, Dresden MH (1974) A partial characterization of collagens from *Notophthalmus viridescens* and *Rana catesbiana*. *Comp. Biochem Physiol* 47B: 617-630.
- McDevitt CA (1990) Composite agarose-acrylamide electrophoresis of proteoglycans and large protein complexes. In: Maroudas A, Küttner K (eds) **Methods in Cartilage Research** Academic, London. p. 40-43.
- McDevitt CA, Muir H (1971) Gel electrophoresis of proteoglycans and glycosaminoglycans on large pore composite polyacrylamide agarose gels. *Anal Biochem* 44: 612-622.
- Maroudas AH (1976) Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* 260: 808-809.
- Mello MLS, Vidal BC (1972) Evaluation of dichroism and anomalous dispersion of the birefringence on collagen subjected to metal impregnations. *Annls Histochem* 17: 333-340.
- Mello MLS, Vidal BC (1975) Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Annls Histochem* 18: 103-122.
- Mello MLS, Godo C, Vidal BC, Abujadi JM (1975) Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. *Annls Histochem* 20: 145-152.
- Merrilles MJ, Flint MH (1980) Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat* 157: 87-106.
- Miller EJ (1984) Chemistry of the collagens and their distribution. In: Piez KA, Reddi AH (eds.) **Extracellular Matrix Biochemistry**. Elsevier, NY. p. 41-81.
- Miller EJ (1985) The structure of fibril-forming collagens. *Ann NY Acad Sci* 460: 1-13.
- Miller EJ & Rhodes (1982) Preparation and characterization of different types of collagen. *Meth Enzymol* 82: 33-64.
- Minns RJ, Steven FS (1977) The collagen organization in human articular cartilage. *J Anat* 123: 437-457.
- Moore MJ (1983) Muscle Nerve 6: 416-422. Cit. em Swasdison & Mayne (1991), op. cit..
- Morris CE (1990) Mechanosensitive ion channels. *J Membr Biol* 112: 93-107.
- Naresh MD, Brodsky B (1992) X-ray diffraction studies on human tendon show age-related changes in collagen packing. *Biochim Biophys Acta* 1122: 161-166.
- Mow VC, Mak AF, Lai WM, Rosemberg LC, Tang L-H (1984) Viscoelastic properties of proteoglycan subunits and aggregates in varying solution concentrations. *J Biomech* 17: 325-338. Cit. em Carney & Muir (1988), op. cit.
- Nisbit NW (1960) Anatomy of the calcaneal tendon of the rabbit. *J Bone Jt Surg* 42B: 360-361.
- Noble GK (1955) **The Biology of the Amphibia**. Dover, New York.
- Oakes BW, Bialkower B (1977) Biomechanical and ultrastructural studies on the elastic wing tendon from the domestic fowl. *J Anat* 123: 369-387.
- Okuda Y, Gorski JP, An K-N, Amadio PC (1987a) Biochemical, histological, and biomechanical analyses of canine tendon. *J Orthop Res* 5: 60-68.

- Okuda Y, Gorski JP, Amadio PC (1987b) Effect of postnatal age on the ultrastructure of six anatomical areas of canine flexor digitorum profundus tendon. *J Orthop Res* 5: 231-241.
- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D (1989) A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J* 8: 2601-2604.
- Oloyede A, Flaschmann R, Broom ND (1992) The dramatic influence of loading velocity on the compressive response of articular cartilage. *Connect Tissue Res* 27: 211-224.
- Parry DAD (1978) The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys Chem* 29: 195-209.
- Parry DAD, Craig AS (1978) Collagen fibrils and elastic fibers in rat tail tendon: An electron microscopic investigation. *Biopolymers* 17: 843-845.
-
- Parry DAD, Craig AS, Barnes GRG (1978a) Tendon and ligament from the horse: an ultrastructural study of collagen fibrils and elastic fibres as a function of age. *Proc R Soc Lond* 203B: 293-303.
- Parry DAD, Barnes GRG, Craig AS (1978b) A comparison of the size and distribution of collagen fibrils in connective tissue as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical function. *Proc R Soc Lond* 203B: 305-321.
- Parry DAD, Flint MH, Gillard GC, Craig AS (1982) A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. *FEBS Lett* 149: 1-7.
- Pearson CH, Gibson GJ (1982) Proteoglycans of bovine periodontal ligament and skin. *Biochem J* 201: 27-37.
-
- Piez (1984) Molecular and aggregate structures of collagen. In: Piez KA, Reddi AH (eds.) *Extracellular Biochemistry*. Elsevier, NY. p.1-39.
- Pikkarainen J (1968) The molecular structures of vertebrate skin collagens. A comparative study. *Acta physiol scand Suppl* 309: 1-72.
- Pimentel ER (1981) Form birefringence of collagen bundles. *Acta histochem Cytochem* 14: 35-40.
- Pimentel ER, Vidal BC (1980) Propriedades anisotrópicas de feixes de colágeno e glicoproteínas ligadas ao sírius red. *Resumos do II Cong Brasil Biol Cel*: 156-157.
- Plötz E (1938) Funktioneller Bau und funktionelle Anfassung der Gleitsehnen. *Z Orthop* 67: 212-234. Citado em Vogel & Koob (1989), op. cit.
- Ralphs JR, Benjamin M, Thornett A (1991) Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subjected to compression. *Anat Rec* 231: 167-177.
- Ralphs JR, Tyers RNS, Benjamin M (1992) Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat: the suprapatella and the attachment to the patella. *Anat Embryol* 185: 181-187.
- Raspanti M, Ottani V, Ruggeri A (1990) Subfibrillar architecture and functional properties of collagen. *J Anat* 172: 157-164.

- Realle E, Benaou F, Ruggeri A (1981) Differences in the microfibrillar arrangement of collagen fibrils. Distribution and possible significance. *J Submicrosc Cytol* 13: 135-143.
- Register RC, Wagner WD (1990) Heterogeneity in glycosilation of dermatan sulfate proteoglycan core proteins isolated from human aorta. *Connect Tissue Res* 25: 35-48.
- Retterer E (1918a) Nouvelles observations sur l'évolution des sésamoïdes intratendineux. *Comptes Rendus Soc Biol* 81: 237-240.
- Retterer E (1918b) Origine, structure et évolution des sésamoïdes dorsaux des doigts du chien. *Comptes Rendus Soc Biol* 81: 284-287.
- Retterer E, Lelièvre A (1911) Des sésamoïdes vésiculo-fibreux des mammifères. *Comptes Rendus Soc Biol* 71: 5-8.
-
- Romer AS (1970) **The Vertebrate Body**. WB Saunders, Philadelphia. 4th ed.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-211.
- Rowe RWD (1985a) The structure of rat tail tendon. *Connect Tiss Res* 14: 9-20.
- Rowe RWD (1985b) The structure of rat tail tendon fascicle. *Connect Tiss Res* 14: 21-30.
- Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR (1992) Developmental and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. *Anat Embryol* 186: 611-618.
- Sachs F (1987) Baroreceptor mechanisms at the cellular level. *Fed Proc* 46: 12-16.
-
- Sakai LY, Keene DR, Engvall E (1986) Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103: 2499-2509.
- Scott JE (1988) Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 252: 313-323.
- Scott JE, Dorling J (1965) Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian blue in salt solutions. *Histochemie* 5: 221-233.
- Scott JE, Haigh M (1988) Identification of specific binding sites for keratan sulphate proteoglycans and chondroitin-dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea by the use of cupromeronic blue in "critical-electrolyte-concentration" techniques. *Biochem J* 253: 607-610.
- Scott JE, Orford CR (1981) Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon at the d band in the gap region. *Biochem J* 197: 213-216.
- Scott JE, Orford CR, Hughes EW (1981) Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron-microscopical and biochemical investigation. *Biochem J* 195: 573-581.
- Scott PG, Winterbottom N, Dodd CM, Edwards E, Pearson CH (1986) A role for disulphide bridges in the protein core in the interaction of proteodermatan sulphate and collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 1348-1354.
- Shaw LM, Olsen BR (1990) Collagens in the FACIT group: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 16: 191-194.

- Shepard N, Michel N (1976) The localization of articular cartilage proteoglycan by electron microscopy. *Anat Rec* 187: 463-476.
- Singley CT, Solursh M (1980) The use of tannic acid for the ultrastructural visualization of hyaluronic acid. *Histochemistry* 65: 93-102.
- Strocchi R, Leonardi L, Guiardi S, Marchini M, Ruggeri A (1985) Ultrastructural aspects of rat tail tendon sheaths. *J Anat* 140: 57-67.
- Sugrue SP, Gordon MK, Seyer J, Dublet B, van der Rest M, Olsen BR (1989) Immunoidentification of type XII collagen in embryonic tissues. *J Cell Biol* 109: 939-945.
- Swadison S, Mayne R (1991) *In vitro* attachment of skeletal muscle fibers to a collagen gel duplicates the structure of the myotendinous junction. *Exp Cell Res* 193: 227-231.
-
- Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI (1964) Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol* 78: 69-72.
- Ten Cate AR (1972) Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodelling. *J Anat* 112: 401-414.
- Timpl R, Engel J (1987). Type VI collagen. In: Mayne R, Burgeson RE (eds.) *Structure and function of collagen types*. Academic, NY, p. 105-142.
- Trelstad RL (1984) **The Role of Extracellular Matrix in Development**. Alan R Liss, NY.
- Trelstad RL, Hayashi K (1979) Tendon collagen fibrillogenesis: Intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Dev Biol* 71: 228-242.
-
- Vaughan L, Mendler M, Huber S, Bruckner P, Winterhalter KH, Irwin MI, Mayne R (1988) D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J Cell Biol* 106: 991-997.
- Vidal BC (1963) Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma* 56: 529-536.
- Vidal BC (1964) The part played by mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. *Protoplasma* 59: 472-479.
- Vidal BC (1966) Periodontal Biocynetics. *Rev Biol Oral* 4: 18-25.
- Vidal BC (1969) Collagen bundle regulation and control. *Revta brasil Pesq med biol* 2: 356-359.
- Vidal BC (1970) Dichroism on collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Anals Histochem* 115: 289-296.
- Vidal BC (1972) Changes in fibroblasts as revealed during fibrogenesis. *Anals Histochem* 17: 311-324.
- Vidal BC (1980) The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell mol Biol* 26: 421-451
- Vidal BC (1984) Orden molecular y haces de colageno (Molecular order and collagen bundles). *Trab Inst Cajal* 75: 19-27.

- Vidal BC (1986) Evaluation of carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell mol Biol* 32: 527-535.
- Vidal BC (1993) Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order and recognition-adhesion events. Submetido à Rev Fac Med UNICAMP.
- Vidal BC, Carvalho HF (1990) Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. *Matrix* 10: 48-57.
- Vidal BC, Mello MLS (1984) Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell mol Biol* 30: 193-204.
- Vidal BC, Valdrighi L (1970) Ultrastructural aspects of normal human gingival epithelium. *Annls Histochem* 15: 1-18.
- Vidal BC, Mello MLS, Godo C, Caseiro Filho AC, Abujadi JM (1975) Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves. *Annls Histochem* 20: 15-26.
- Vidal BC, Mello MLS, Pimentel ER (1982) Polarization microscopy and microspectrophotometry of sirius red, picosirius and chlorantine fast red aggregates and of their complexes with collagen. *Histochem J* 14: 857-878.
- Viidik A (1973) Functional properties of collagenous tissues. *Int Rev Connect Tiss Res* 6: 127-215.
- Vilarta R (1986) Modificações das propriedades anisotrópicas e de resistência à tração de tendões calcaneares de ratos submetidos ao exercício físico e à denervação. Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas. 76p.
- Vilarta R, Vidal BC (1989) Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: Aggregational state and molecular order in collagen bundles. *Matrix* 9: 55-61.
- Vogel KG, Heinegård D (1985) Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* 260: 9298-9306.
- Vogel KG, Hernandez DJ (1992) The effects of transforming growth factor-beta and serum on proteoglycan synthesis by tendon fibrocartilage. *Eur J Cell Biol* 59: 304-313.
- Vogel KG, Koob TJ (1989) Structural specializations in tendons under compression. *Int Rev Cytol* 115: 267-293.
- Vogel KG, Trotter JA (1987) The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed *in vitro*. *Coll rel Res* 7: 105-114.
- Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D (1984) Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223: 587-697.
- Vogel KG, Keller EJ, Lenhof RJ, Campbell K, Koob TJ (1986) Proteoglycan synthesis by fibroblasts cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Eur J Cell Biol* 41: 102-112.
- Watson PA (1989) Accumulation of cAMP and calcium in S49 mouse lymphoma cells following hyposmotic swelling. *J Biol Chem* 264: 14735-14740.

Watson PA (1991) Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *FASEB J* 5: 2013-2019.

Weightman B, Kempson GE (1979) Load carriage. In: Freeman MAR (ed) **Adult Articular Cartilage**. Pitman Medical, London. p. 291-331. Cit. em Oloyede **et alii** (1992), op. cit.

Winnemöller M, Schön P, Vischer P, Kresse H (1992) Interactions between trombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment. *Eur J Cell Biol* 59: 47-55.

Wright DW, Mayne R (1988) Vitreous humor of chicken contains two fibrillar system: an analysis of their nature. *J Ultrastruct mol Struct Res* 100: 224-234.
