

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

GUSTAVO PEREIRA BENEVIDES

**“TENDINOPATIA CRÔNICA: ANÁLISE BIOMECÂNICA E
BIOQUÍMICA DE UM MODELO EXPERIMENTAL EM
FRANGOS”**

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

Orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes

Campinas, 2006

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TI UNICAMP
	B435t
V	EX
TOMBO BC	20079
PROC.	16.183.06
C	☐
D	☒
PREÇO	11.00
DATA	25.9.06

BIB ID: 387257

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B435t

Benevides, Gustavo Pereira

Tendinopatia crônica: análise biomecânica e bioquímica de um modelo experimental em frangos / Gustavo Pereira Benevides. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Laurecir Gomes.

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

1. Tendões. 2. Tendinopatia. 3. Biomecânica. 4. Proteoglicanos. 5. Colágeno. I. Gomes, Laurecir. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Chronic tendinopathy: biomechanical and biochemical analysis of a chicken experimental model.

Palavras-chave em inglês: Tendons; Tendinopathy; Biomechanics; Proteoglycans; Collagen.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Laurecir Gomes, Edson Rosa Pimentel, Humberto Santo Neto, Nivaldo Antonio Parizotto, Sérgio Rocha Piedade.

Data da defesa: 31/07/2006.

Campinas, 31 de julho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laurecir Gomes (Orientadora)


Assinatura

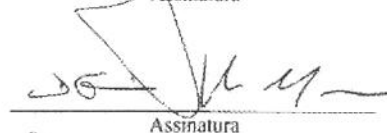
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto


Assinatura

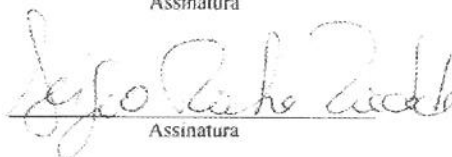
Prof. Dr. Humberto Santo Neto


Assinatura

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Rocha Piedade


Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Assinatura

Profa. Dra. Sílvia Maria Amado João

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

1500622330

AGRADECIMENTOS

Obrigado aos membros da Banca examinadora que dispensaram tempo e dedicação para a finalização da minha tese.

Muito obrigado a minha orientadora, Dra. Laurecir Gomes, por todos esses anos de convivência e dedicação diária e por demonstrar que existem várias maneiras de se orientar alunos de pós-graduação.

Meus agradecimentos ao Dr. Edson Pimentel, pelos conselhos e ponderações sempre úteis, tanto acadêmicas quanto pessoais.

Obrigado ao Dr. Hernandes Carvalho por contribuir com a minha Tese durante a pré-banca, por disponibilizar seu laboratório e pelo exemplo de ser humano.

Obrigado a Dra. Shirlei Pimentel pela competência administrativa e por ser uma das responsáveis pelo meu envolvimento com a Coordenação do Programa de Pós-Graduação.

Obrigado ao Dr. Ângelo Cortelazzo, pelo exemplo pedagógico e pela preocupação e entusiasmo com a estrutura educacional brasileira. Entusiasmo este que me contagiou e de certa forma foi decisivo na minha carreira profissional.

Obrigado a Dra. Heide Dolder pelo exemplo de dedicação à ciência.

Obrigado a “super” secretária Líliam Panagio, um exemplo profissional, cuja dedicação transcende os afazeres burocráticos e se aproxima à preocupação maternal.

Obrigado aos secretários Sidnei Simões e Mário Bianchi pela assistência.

Obrigado ao técnico Francisco Malatessa pelo auxílio e companheirismo no nosso laboratório.

Obrigado ao técnico José Luís Lisboa, do Laboratório de Propriedades Mecânicas, pelo auxílio na realização dos testes biomecânicos.

Obrigado ao Departamento de Engenharia de Materiais por disponibilizar o equipamento para realização dos testes biomecânicos.

Obrigado ao Engenheiro Glaucio José Longo da KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos por disponibilizar os equipamentos de estimulação elétrica muscular, pelo apoio técnico e pela confiança no meu projeto de pesquisa.

Obrigado a Incubadora Fazenda Aves do Paraíso por gentilmente doar todos os animais para a realização do meu projeto de pesquisa.

Obrigado aos meus amigos Karina, Ana, Odair e Klélia por todos esses anos de companheirismos.

Obrigado aos meus colegas de laboratório Tatiana, Fernanda, Adriano, Alexandre e Wilson pela convivência salutar e pela diversidade de pensamentos e condutas.

Obrigado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que viabilizaram financeiramente o meu projeto de pesquisa.

*Agradecimento especial ao meu
grande amor Uyrá.*

Dedico essa Tese e agradeço os meus pais, Cleide e Laurindo, pela educação, apoio e confiança.

ÍNDICE

Resumo, 10

Abstract, 11

Introdução, 12

Figura 1 – Principais componentes do tendão, 23

Objetivos, 24

Referências Bibliográficas, 25

Artigo 1, 27

Effect of electrical muscle stimulation on the biomechanical properties of tendons, 28

Abstract, 29

Introduction, 30

Materials and Methods, 32

Animals, 32

Electrical stimulation apparatus and protocols, 32

Tendon excision, 33

Biomechanical test, 33

Biochemical test, 35

Statistical analysis, 35

Results, 36

Discussion, 38

Acknowledgments, 43

Figure 1 – Clamping device consisting of steel/carbon 1045, 44

Figure 2 – Load-displacement curve for *GT*, 45

Figure 3 – Stress-strain curve for *GT*, 46

Figure 4 – Strain-time curve for *GT*, 47

Figure 5 – Load-displacement curve for *ST*, 48

Figure 6 – Stress-strain curve for *ST*, 49

Figure 7 – Strain-time curve for *ST*, 50

Table 1 – Electrical muscle stimulation protocols, 51

Table 2A – Maximum biomechanical data, 52

Table 2B – Statistical analysis of the maximum biomechanical data for *GT*, 53

Table 2C – Statistical analysis of the maximum biomechanical data for *ST*, 54

Table 3A – Apparent values for break-point curves, 55

Table 3B – Statistical analysis of the apparent values for break-point curves for *GT*, 56

Table 3C – Statistical analysis of the apparent values for break-point curves for *ST*, 57

Table 4A – Hydroxyproline content of the tendon regions, 58

Table 4B – Statistical analysis of the hydroxyproline content in the tendon regions, 59

References, 60

Artigo 2, 63

Alterações bioquímicas da matriz extracelular em um modelo experimental de tendinopatia crônica, 64

Resumo, 64

Introdução, 66

Material e métodos, 69

Animais, 69

Indução da tendinopatia crônica, 69

Obtenção do material, 70

Extração dos constituintes da matriz extracelular, 70

Dosagem de proteínas solúveis,	70
Fracionamento e análise dos componentes da matriz extracelular,	70
Obtenção, quantificação e identificação dos glicosaminoglicanos sulfatados,	71
Quantificação das proteínas musculares,	72
Análise estatística,	72
Resultados,	72
Discussão,	74
Agradecimentos,	80
Figura 1 – Situação anatômica do tendão do músculo gastrocnêmio e do tendão dos músculos flexores digitais superficiais,	81
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos obtido do tendão do gastrocnêmio e do flexor digital superficial,	82
Figure 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS na presença de β -mercaptoetanol das frações provenientes da cromatografia de troca iônica das regiões <i>GTd</i> dos grupos controle e eletro-estimulado,	83
Figure 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS na presença de β -mercaptoetanol das frações provenientes da cromatografia de interação hidrofóbica,	84
Tabela 1 – Concentração de tecido das proteínas totais solúveis em GuHCl, proteínas tendíneas pós cromatografias, glicosaminoglicanos sulfatados e proteínas solúveis musculares de cada região analisada, proximal e distal, do tendão gastrocnêmio e flexor digital superficial, do grupos eletro-estimulado e do controle,	85
Referências bibliográficas,	86
Conclusões gerais,	90
Anexo 1,	92
Anexo 2,	93

RESUMO

Os tendões transmitem as forças geradas pelos músculos aos ossos, resultando no movimento articular. A tendinopatia crônica caracterizada por evidentes alterações bioquímicas e biomecânicas, produz severos sintomas clínicos que pode evoluir até a impossibilidade de qualquer atividade ocupacional sendo resistente às condutas clínicas. O desenvolvimento de um modelo experimental é necessário não só para estudar a evolução dessa patologia, mas também para identificar as alterações da composição da matriz extracelular em tendões injuriados. A partir da estimulação elétrica muscular aplicada nos membros inferiores de frangos, foram desenvolvidos quatro diferentes protocolos de exercício. Após oito semanas de exercício os tendões do músculo gastrocnêmio e dos flexores digitais superficiais foram analisados quanto à concentração de hidroxiprolina e em testes biomecânicos. Os tendões responderam de maneira significativamente diferente aos protocolos aplicados e um mesmo protocolo modulou de forma distinta os dois tendões analisados. Os tendões do protocolo com maior déficit biomecânico apresentaram um aumento das proteínas totais, diminuição na concentração dos pequenos proteoglicanos e um aumento significativo na concentração dos glicosaminoglicanos em relação ao grupo controle. Essas dosagens indicam importantes alterações nos constituintes da matriz extracelular sugerindo degeneração tendínea, quadro patobiológico muito semelhante ao da tendinopatia crônica. A partir desse modelo experimental será possível identificar não só outros efeitos deletérios dessa patologia no sistema musculotendíneo, como também estudar a eficácia de novos tratamentos.

ABSTRACT

The tendon transmits the strength generated by the muscles to the bone, resulting in joint movement. The chronic tendinopathy, characterized by evident morphological and biomechanical alterations produce severe clinical symptoms that conduct to an incapacity of limb movement, which can develop until the impossibility of any occupational activity and is resistant to the majority of clinical conducts. The development of an experimental model is necessary, not only to study the evolution of this pathology, as well as to identify the alterations of the extracellular matrix components in injured tendons. With electrical muscle stimulation, applied in the inferior limb of chickens, four protocols of exercise were developed. After eight weeks the gastrocnemius and superficial digital flexor tendons were analyzed with respect to hydroxyproline concentration and biomechanical tests. The tendons showed significant differences with respect of protocols applied and the same protocol modulated with distinct form the two tendons analyzed. The tendon with higher biomechanical deficit showed a significant increased of total proteins, a decrease of small proteoglycans concentration and an increase of glycosaminoglycans in relation to the same region of control group. Those dosages pointed to important alterations of extracellular matrix constituents suggesting tendon degeneration, pathobiology stage very similar to chronic tendinopathy. With this experimental model will be possible to identify others deleterious effects of this pathology in the muscle-tendon system, but also to study the efficacy of new treatments.

INTRODUÇÃO

Os tendões transmitem as forças geradas pelos músculos aos ossos, resultando no movimento articular (Maganaris et al., 2004). Problemas crônicos causados pelo uso excessivo dos tendões além de ser um achado extremamente comum em atletas profissionais (Maganaris et al., 2004; Sharma e Maffulli, 2005) também acometem a população em geral (Riley, 2005), principalmente os trabalhadores que exercem atividades repetitivas (Kjær, 2004), diminuindo inclusive o desempenho profissional (Maganaris et al., 2004). Injúrias tendíneas produzem morbidade considerável e a incapacidade que elas causam pode persistir por vários meses (Sharma e Maffulli, 2005). Entretanto, as alterações patofisiológicas iniciais das tendinopatias crônicas ainda não são estabelecidas (Nakama et al., 2005).

O uso repetitivo e prolongado da estrutura músculotendínea promove alterações na adaptação tecidual produzindo severos sintomas clínicos como dor crônica, tumefação regional, hiperemia, crepitação (Sharma e Maffulli, 2005) e hipersensibilidade à procedimentos ocupacionais rotineiros (Kjær, 2004; Riley, 2005). As tendinopatias crônicas são resistentes às condutas clínicas, e os seus sintomas podem perdurar apesar de tratamentos conservadores e intervenções cirúrgicas. A maioria das intervenções cirúrgicas é efetiva somente após a ruptura completa do tendão, não promovendo efetivamente sua recuperação (Cook et al., 2002). Além da queda de produtividade, e possivelmente de rendimento, as patologias crônicas geram ao Estado uma elevada demanda social (desemprego) e financeira (atendimento no Sistema de Saúde e pagamento de aposentadoria por invalidez) (Ministério da Previdência Social, 2005; Ministério da Saúde, 2005) que poderiam ser minimizadas por um tratamento precoce ou concomitante à patologia.

O tendão é composto por células e matriz extracelular (Figura 1). Os elementos celulares do tendão, responsáveis pela síntese dos componentes fibrilares (colágeno e elastina) e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz extracelular, são representados

principalmente pelos tenoblastos e tenócitos. Os tenoblastos são células “jovens”, caracterizadas morfológicamente por apresentarem prolongamentos citoplasmáticos irregulares, núcleo volumoso, elíptico e com cromatina frouxa, citoplasma basófilo, indicando a abundância de numerosas organelas, principalmente do retículo endoplasmático rugoso, o que reflete a sua alta atividade metabólica. Com a redução da atividade de síntese, os tenoblastos vão se tornando alongados, ocorre a diminuição dos seus prolongamentos, os núcleos vão se condensando, o citoplasma passa a ser acidófilo e se transformam em células “maduras” denominadas tenócitos (Bernard, 2003). Essas células estão dispostas ao longo das fibras de colágeno, as quais estão orientadas longitudinalmente em relação ao maior eixo do tendão (Sharma e Maffulli, 2005).

Nos tendões, há predominância do colágeno tipo I que é arranjado em níveis hierárquicos de complexidade crescente. Iniciando com o tropocolágeno, proteína oligomérica formada por cadeias polipeptídicas em tripla hélice, as quais são caracterizadas pela sequência repetida dos aminoácidos Gly-X-Y, onde X é frequentemente uma prolina e Y, uma hidroxiprolina (Scott, 1988). Posteriormente as moléculas de colágeno são arranjadas em fibrilas; fibras (feixes primários); fascículos (feixes secundários); feixes terciários; e finalmente o próprio tendão. Em cada nível os diferentes feixes são envoltos por bainhas. O epitendão é uma bainha de tecido conjuntivo frouxo que contém os vasos e os nervos que suprem o tendão. Além de envolver o tendão como um todo, se estende profundamente entre os feixes terciários. O endotendão é um delgado tecido conjuntivo reticular que cobre cada fibra tendínea. Superficialmente, o epitendão é envolto pelo paratendão, um tecido conjuntivo frouxo constituído pelos colágenos tipo I e III, algumas fibras elásticas e células sinoviais. Adicionalmente, as bainhas sinoviais são encontradas em áreas sujeitas a um estresse mecânico aumentado, como nos tendões dos pés e das mãos, onde é requerida uma lubrificação mais eficiente (Sharma e Maffulli, 2005).

Os proteoglicanos são caracterizados por possuir um esqueleto protéico central onde um ou mais glicosaminoglicano está ligado covalentemente. A concentração e o tipo dos

proteoglicanos variam em relação às diferentes forças que o tendão sofre, assim como nas funções específicas de cada tendão. Essas variações também são observadas durante o desenvolvimento, patologia e cicatrização do tendão (Robinson et al., 2005).

Nos tendões existem dois grupos de proteoglicanos que são distintos em relação ao tamanho da proteína central. Os pequenos proteoglicanos representam 80% do total de proteoglicanos presente nos tendões (Samiric et al., 2004), pertencem à superfamília das proteínas ricas em leucina, possuindo pontes dissulfeto intracadeia. O decorin e o fibromodulin fazem parte desse subgrupo (Ameye e Young, 2002). Esses proteoglicanos atuam na fibrilogênese (Keene et al., 2000), regulando e organizando as interações das fibras de colágeno, a atividade celular (Culav et al., 1999) e as propriedades mecânicas do tendão (Robinson et al., 2005), facilitando o deslizamento entre as fibrilas de colágeno, minimizando o atrito de uma fibra contra outra (Berenson et al., 1996). Os grandes proteoglicanos, principalmente o versican e o agregan, representam 20% do total de proteoglicanos nos tendões e têm como função prover resistência à compressão (Vogel e Heinegård, 1985).

Os glicosaminoglicanos, constituídos por cadeias de polissacarídeos, são modeladores do intumescimento entre as fibras limitando o colapso do tecido conjuntivo, uma vez que são carregados negativamente e atraem íons, criando uma força osmótica que resulta na absorção de água da área circundante (Culav et al., 1999). A maior concentração de glicosaminoglicanos é característica de regiões que sofrem compressão (Vogel e Heinegård, 1985). Essa proteção mecânica é particularmente importante em regiões tendíneas onde é requerido repetido movimento contra estruturas ósseas adjacentes que promovem a formação de fibrocartilagem (Culav et al., 1999).

Pouco se sabe sobre as mudanças de concentração das glicoproteínas nas tendinopatias crônicas. Porém, já foi estabelecido que a síntese da fibronectina e tenascina-C são reguladas pela deformação mecânica (Sharma e Maffulli, 2005) e supra-reguladas após um trauma agudo no

tendão, sendo consideradas efetivas na modulação da migração e atividade celular (Riley, 2005), uma vez que são o elo entre a matriz extracelular e as células tendíneas. A fibronectina é uma proteína de adesão que possui domínios de ligação ao colágeno e outros domínios que estão associados aos tenoblastos, participando no processo de reparação e regeneração do tendão (Bernard, 2003; Magnusson et al., 2003). A tenascina-C é um importante componente reticular e é abundante tanto no corpo tendíneo como nas junções osteotendíneas e miotendinosa. Possui vários domínios que se liga a uma isorforma da fibronectina, a fibronectina tipo III, atua no alinhamento e orientação da fibra colagênica (Sharma e Maffulli, 2005) e contribui com a estabilidade mecânica da matriz extracelular através da interação entre as fibras de colágeno e o decorim (Landis e Silver, 2002).

Morfologicamente os proteoglicanos são vistos arranjados ortogonalmente na matriz extracelular, circundando as fibrilas de colágeno sugerindo que esses elementos também estão envolvidos com a transmissão de forças (Cribb e Scott, 1995). A alta afinidade da ligação do colágeno, com o pequeno proteoglicano depende da sua proteína central, entretanto as cadeias de glicosaminoglicanos podem prover sítios de ligações adicionais ao colágeno através de forças eletrostáticas (Blaschke et al., 1996). Essa interação com os glicosaminoglicanos pode interferir na fibrilogênese (Scott, 1988), uma vez que as cadeias de glicosaminoglicanos formam um arranjo antiparalelo com as cadeias de glicosaminoglicanos vizinhas de outros proteoglicanos estendendo essa rede para fibras de colágeno adjacentes (Culav et al., 1999). Assim, os pequenos proteoglicanos, tanto através da proteína central como pela cadeia de glicosaminoglicanos, afetam a interação entre as moléculas de colágeno e, portanto a formação das fibrilas (Hedbom e Heinegård, 1989). As interações específicas que ocorrem entre as fibras de colágeno e os pequenos proteoglicanos vêm sendo apontadas como um componente decisivo no comportamento do tendão durante tensão (Cribb e Scott, 1995; Silver et al., 2002; Yoon et al., 2003; Kjær, 2004). A síntese dos proteoglicanos é muito mais rápida do que a do colágeno

fibrilar, assim o conteúdo de proteoglicanos pode ser um indicador primário da capacidade de regeneração tendínea (Riley, 2005).

As propriedades mecânicas do tendão são basicamente resistir à tração e exibir deformação viscoelástica em resposta a essa força (Magnusson et al., 2003). Essas propriedades são relacionadas com o diâmetro do colágeno fibrilar, assim fibras largas podem suportar altas forças tensionais. O diâmetro fibrilar aumenta durante o desenvolvimento e diminui com o desuso (Magnusson et al., 2002). Um aspecto morfológico importante do tendão em associação com as suas propriedades mecânicas é a repetição regular do “crimp” ao longo da fibra colagênica, as quais são originadas do arranjo das fibrilas de colágeno no interior da fibra. O “crimp” assegura a deformação tendínea em reação à força de tração durante o início do estiramento tecidual (Shah et al., 1982). Os “crimps” são observados ao microscópio de polarização como um bandamento periódico de faixas claras e escuras devido a mudanças de direção dos feixes de colágeno ao longo da fibra tendínea. O ângulo e o período do “crimp”, a organização e o diâmetro das fibras de colágeno variam entre as regiões de um mesmo tendão e diferem entre um tendão sadio e um patológico (Gathercole e Keller, 1991; Magnusson et al., 2002).

A força muscular é gerada dentro das células musculares (miócitos) pela contração do complexo actina e miosina, as quais são organizadas em miofibrilas que formam os sarcômeros (Grounds et al., 2005). Na junção miotendinosa, as fibrilas colagênicas tendíneas são inseridas dentro de profundos recessos formados por processos de miócitos, permitindo que a tensão gerada pelas proteínas contráteis miofibrilares seja transmitida ao longo das fibrilas colagênicas (Sharma e Maffulli, 2005). O ponto de transferência da força de contração é entre o sarcolema e a membrana basal da célula muscular (Grounds et al., 2005). Esse arranjo complexo reduz a tensão exercida no tendão durante a contração muscular. Porém, essa junção é um dos pontos mais vulneráveis da unidade músculotendínea (Sharma e Maffulli, 2005), devido à habilidade inerente

do tendão suportar maior carga e deformação do que o músculo (Lin et al., 2004). Entretanto, a falência muscular não é associada com a separação da interface entre o tendão e o músculo, mas ocorre preferencialmente no corpo da fibra muscular proximal à junção miotendinosa (Trotter, 2002).

O padrão de renovação (*turnover*) da matriz extracelular é relativamente elevado em tendões expostos à alta demanda mecânica (Buchanan e Marsh, 2002). A modulação dos componentes da matriz extracelular tem como objetivo a reparação e a manutenção da função tecidual. Entretanto, quando a atividade física excede a capacidade metabólica tendínea, a homeostase tecidual é comprometida e esse desbalanço implica em condições degenerativas (Riley, 2005). A matriz extracelular é substancialmente alterada em tendinopatias, essas mudanças precedem e são a base de uma condição clínica exacerbada. A reação alterada, ou insuficiente, das células tendíneas a repetidos microtraumas é considerada como o principal fator no desenvolvimento de tendinopatias (Riley, 2005), mudando a estrutura e composição do tendão (Kjær, 2004; Riley, 2005), sendo acompanhada por debilidade e eventual ruptura (Maganaris et al., 2004).

As alterações na composição da matriz extracelular são modeladas pelo tipo de deformação mecânica imposta ao tendão (Maganaris et al., 2004; Riley, 2005). Experimentalmente, no período de oito semanas é possível alterar tanto a composição bioquímica como a biomecânica do sistema músculo-esquelético de frangos, modificando a área disponível para locomoção, isto é, exercício ativo (Benevides et al., 2004) ou através de protocolos de estimulação elétrica muscular que simulam treino de resistência, treino de potência ou o exercício estrênuo (Benevides e Gomes, artigo 1). Especificamente, o protocolo de exercício estrênuo, o qual simula a etiologia da tendinopatia crônica, diminui significativamente a concentração dos pequenos proteoglicanos e aumenta a dos glicosaminoglicanos e das proteínas totais, enquanto, nos músculos diminui drasticamente a concentração de miosinas (Benevides e Gomes, artigo 2).

Essas alterações são acompanhadas por uma redução acentuada nas propriedades biomecânicas do tendão (Benevides e Gomes, artigo 1) e são características preponderantes das tendinopatias crônicas (Riley, 2005).

O padrão e a duração do estresse físico na qual o tendão é submetido são considerados os fatores mais importantes que desencadeiam a tendinopatia crônica (Maganaris et al., 2004; Riley, 2005). Alguns estudos vêm demonstrando que o componente crucial na etiologia da tendinopatia crônica está relacionado com o número de contrações musculares, ou seja, a quantidade de ciclos de tensão que o tendão é submetido, sendo este fator mais importante que a carga aplicada (Buchanan e Marsh, 2002; Benevides e Gomes, artigo 1). Assim, a etiologia da tendinopatia crônica é caracterizada por movimentos repetitivos associado a um baixo nível de carga (Magnusson et al., 2003) que propicia um acúmulo de microtraumas afetando a expressão de diferentes componentes da matriz extracelular (Riley, 2005).

Na literatura são encontradas algumas sugestões de modelos experimentais de tendinopatia crônica. A indução da tendinopatia baseada em exercícios com esteira foi proposta por Curwin e colaboradores (1988), utilizando frangos, e Carpenter e colaboradores (1998) que analisaram ratos. Backman e colaboradores (1990), Messner e colaboradores (1999) e Archambault e colaboradores (2001) apresentaram modelos semelhantes onde os membros posteriores de coelhos eram submetidos à estimulação elétrica muscular associada à resistência do movimento dos pés por um pistão pneumático. Os modelos que usam protocolos de corrida em esteira apresentam pelo menos dois fatores que provavelmente interferem no controle da indução da tendinopatia crônica, tanto o peso corpóreo quanto a possível variação no número de contrações musculares por sessão podem alterar a uniformidade de resposta do modelo experimental. Por outro lado, a resistência ao movimento do membro eletro-estimulado descaracteriza o conceito etiológico de tendinopatia crônica que é baseado em movimentos repetitivos, porém com um baixo nível de carga. Desta forma existe uma carência de um modelo

experimental que seja facilmente reproduzível e que atenda as características etiológicas dessa patologia.

Sinais inflamatórios clássicos não são frequentes em tendinopatias crônicas, porém seus aspectos histopatológicos são extremamente diferentes de um tendão normal, exibindo uma exagerada disfunção na resposta de reparação. As fibras colagênicas estão desorientadas, preponderantemente delgadas, dilaceradas e com avulsão longitudinal; há hiper celularidade, a vascularização é dispersa e o aumento dos glicosaminoglicanos interfibrilar é significativo (Cook et al., 2002; Sharma e Maffulli, 2005). Entretanto, o processo patofisiológico exato que ocorre nos tendões ainda precisa ser determinado (Maganaris et al., 2004).

A cicatrização tendínea é essencialmente estudada em traumas agudos, entretanto a sua relevância em tendinopatias crônicas ainda não é esclarecida (Sharma e Maffulli, 2005). O processo de cicatrização ocorre em três fases subseqüentes. A fase inflamatória é caracterizada pela presença de eritrócitos e células inflamatórias, particularmente neutrófilos, ocorrendo aumento da permeabilidade vascular, início da angiogênese e recrutamento de mais células inflamatórias. Os tenócitos gradualmente migram para o local da injúria e sintetizam colágeno tipo III, que é mais delgado e possui menor habilidade de formar feixes quando comparado com o colágeno tipo I (Cook et al., 2002). Após alguns dias a fase proliferativa é iniciada sendo caracterizada pelo pico da síntese de colágeno tipo III, alta concentração de glicosaminoglicanos e aumento no conteúdo de água. Após algumas semanas, começa a fase de remodelação, que pode perdurar por meses e na qual há diminuição da concentração do colágeno III e dos glicosaminoglicanos. Essa fase pode ser dividida em estágio de consolidação e de maturação. No estágio de consolidação, o tecido de reparação muda de celular para fibroso, uma alta proporção de colágeno tipo I é sintetizado, o metabolismo dos tenoblastos continuam alto e tanto os tenoblastos como as fibras de colágeno vão se alinhando em direção a força aplicada no tendão. Finalmente, ocorre o estágio de maturação, com gradual mudança do tecido fibroso para tecido

cicatricial. Durante a segunda metade desse estágio, o metabolismo dos tenoblastos declina e a vascularidade diminui (Lin et al., 2004; Sharma e Maffulli, 2005).

A cicatrização pode ocorrer intrinsecamente, pela proliferação dos tenócitos do epitendão e do endotendão, ou extrinsecamente pela invasão de células do paratendão e da sinóvia. A cicatrização intrínseca propicia um tendão com melhor qualidade biomecânica e menores complicações, em particular, um mecanismo normal de deslizamento dentro das bainhas preservadas. O tipo extrínseco resulta em um tecido cicatricial com formação de adesões, as quais inviabilizam o deslizamento tendíneo, representando um importante problema clínico (Sharma e Maffulli, 2005). As propriedades estrutural, organizacional e mecânica do tecido cicatrizado indicam fragilidade em relação às de um tendão sadio (Lin et al., 2004). Apesar dessas propriedades melhorarem com o tempo, elas não retornam aos níveis normais sem um tratamento clínico específico, mesmo após longos períodos de recuperação (Culav et al., 1999; Kjær, 2004). As consequências patobiológicas das mudanças ocorridas no tendão incluem frouxidão articular, instabilidade e falência mecânica prematura (Lin et al., 2004; Silver et al., 2000).

Anomalias crônicas podem ser localizadas tanto no corpo tendíneo como nas suas inserções e até nas estruturas que o envolve (Maganaris et al., 2004). Entretanto, regiões do tendão que sofrem principalmente forças de tensão, ou seja, zonas que não estão sujeitas a forças compressivas oriundas de protuberâncias ósseas parecem ter prevalência na instalação de tendinopatias crônicas com exacerbada alterações biomecânicas e bioquímicas (Kjær, 2004; Benevides e Gomes, artigo 1; Benevides e Gomes, artigo 2).

Vários tipos de degeneração podem ser identificados nos tendões. Entretanto, a mucóide e a lipóide são as mais frequentes em tendinopatias. Sob microscopia de luz um tendão com degeneração mucóide apresenta largas placas e vacúolos de mucina entre as fibras de colágeno. Na degeneração lipóide, ocorre um acúmulo intratendíneo anormal de lipídios, com rompimento da estrutura fibrilar colagênica. Comumente, nessas degenerações ocorre metaplasia

fibrocartilaginosa, frequentemente acompanhada por deposição de cálcio (Sharma e Maffulli, 2005). A consequência biomecânica dessas alterações teciduais é a redução da capacidade de resistir à força de tração predispondo o tendão a ruptura (Riley et al., 1994).

O consumo de oxigênio dos tendões é 7,5 vezes menor que o dos músculos esqueléticos. A baixa taxa metabólica e a capacidade anaeróbica bem desenvolvida de geração de energia são essenciais para suportar a carga e manter a tensão por longos períodos, reduzindo o risco de isquemia e subsequente necrose. Entretanto, durante o exercício vigoroso a baixa taxa metabólica pode ser insuficiente para manter os níveis de ATP celular, podendo ocorrer hipóxia localizada que causa a morte de tenócitos e resulta em uma lenta cicatrização (Sharma e Maffulli, 2005).

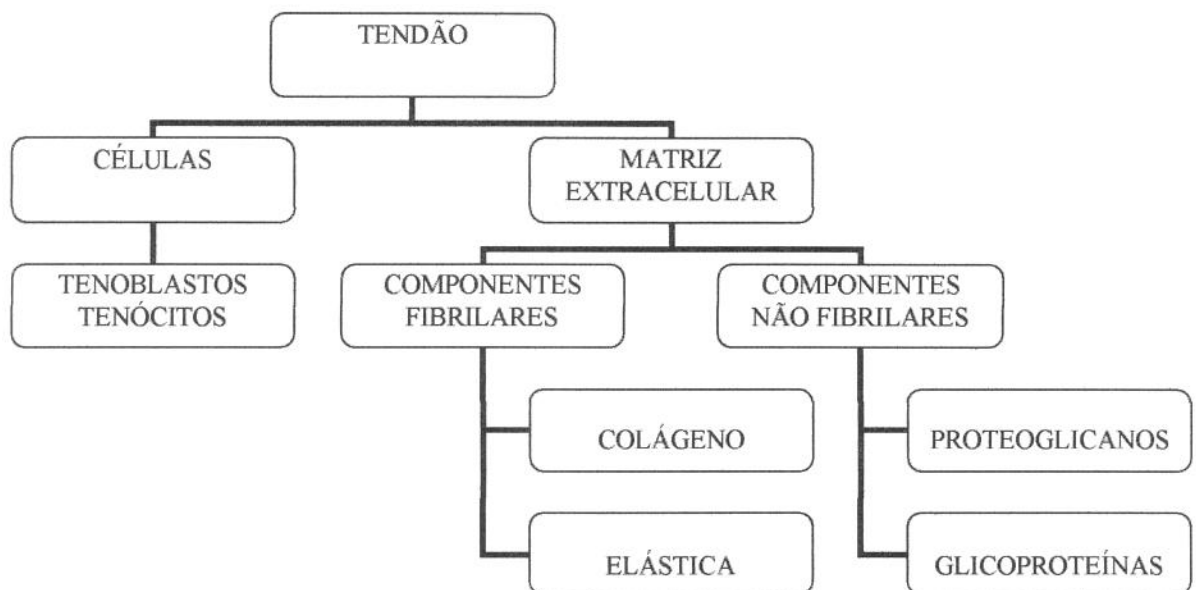
A maioria dos tendões possui baixa vascularização, principalmente na sua porção média (Magnusson et al., 2003). Geralmente o fluxo sanguíneo diminui com o aumento da carga mecânica (Sharma e Maffulli, 2005). A isquemia ocorre quando o tendão está sob tensão, com o relaxamento a reperusão deflagra radicais livres de oxigênio que podem causar danos ao tendão pelo estresse oxidativo, gerando apoptose e resultando em tendinopatia (Beattie, 2003; Sharma e Maffulli, 2005).

Tendões que são estendidos e se retraem repetidamente geram um acúmulo de calor que pode resultar em um aumento termal danoso, com consequente injúria e predisposição para ruptura. Assim, durante o exercício físico, os tendões podem desenvolver temperaturas além do limiar de viabilidade dos tenócitos que é de 42,5°C. Isso indica que a hipertermia pode estar envolvida com a patofisiologia da tendinopatia crônica (Maganaris et al., 2004; Sharma e Maffulli, 2005).

A partir desses resultados, está claro que a modulação tecidual à força externa envolve interações não somente entre as células e o colágeno tipo I, mas também entre o colágeno e outras proteínas não colagênicas (Landis e Silver, 2002).

A estimulação elétrica muscular reverte a ordem de recrutamento das unidades motoras

observada na contração voluntária, ativa mais unidades motoras gerando um aumento de força na contração (Paillard et al., 2005). A contração excessiva muscular causa danos nas miofibrilas, com alteração da concentração protéica intramuscular, resultando em uma persistente redução de força, edema e aumento da sensibilidade à dor (Endoh et al., 2005). A estimulação elétrica crônica modifica a atividade da ATPase miofibrilar alterando o número de fibras de contração lenta (Pette e Vrbová, 1992) impondo um sincronismo artificial de excitação das unidades motoras que sobrepõe os impulsos nervosos (Paillard et al., 2005). O dano ou a fadiga muscular pode alterar o comportamento do sistema nervoso, tanto o periférico como o central, uma vez que as descargas aferentes provêm de um músculo injuriado (Endoh et al., 2005). A partir dessa constatação é questionável se a excessiva contração muscular pode alterar a estrutura e a fisiologia nervosa.

Figura 1 Principais componentes do tendão

OBJETIVOS

A proposta desse trabalho foi desenvolver um modelo experimental que simulasse a etiologia da tendinopatia crônica, analisar o comprometimento biomecânico e, através de técnicas bioquímicas, examinar as alterações dos componentes da matriz extracelular após a indução da patologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameye L, Young MF: Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 2002;12:107-16.
- Archambault JM, Hart DA, Herzog W: Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res* 2001;42:13-23.
- Backman C, Boquist L, Fridén J, Lorentzon R, Toolanen, G: Chronic achilles paratenonitis with tendinosis: an experimental model in the rabbit. *Orthop Res Soc* 1990;8:541-7.
- Beattie DS: Bioenergética e metabolismo oxidativo – Espécies reativas de oxigênio (ROS), in Devlin T (ed): *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. São Paulo, SP, Brasil, Editora Edgard Blücher, 2003, pp 521-4.
- Benevides GP, Gomes L: Effect of electrical muscle stimulation on the biomechanical properties of tendons. artigo 1.
- Benevides GP, Gomes L: Alterações bioquímicas da matriz extracelular em um modelo experimental de tendinopatia crônica. artigo 2.
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Gomes L: Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res* 2004;45:206-15.
- Berenson MC, Blevins FT, Plaas AHK, Vogel KG: Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res* 1996;14:518-25.
- Bernard C: Tecido Conjuntivo, in Geneser F (ed): *Histologia*, ed 5. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Editorial Médica Panamericana, Editora Guanabara Koogan, 2003, pp 157-79.
- Blaschke UK, Hedbom E, Bruckner P: Distinct isoforms of chicken decorin contain either one or two dermatan sulfate chains. *J Biol Chem* 1996; 271:30347-53.
- Buchanan CI, Marsh RL: Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:1101-7.
- Carpenter JE, Flanagan CL, Thomopoulos S, Yian EH, Soslowsky LJ: The effects of overuse combined with intrinsic or extrinsic alterations in an animal model of rotator cuff tendinosis. *Am J Sports Med* 1998;26:801-7.
- Cook JL, Khan KM, Purdam C: Achilles tendinopathy. *Manual Ther* 2002; 7:121-30.
- Cribb AM, Scott JE: Tendon response to the tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon. *J Anat* 1995;187:423-8.
- Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ: Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 1999;79:308-19.
- Curwin SL, Vailas AR, Wood J: Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J Appl Physiol* 1988;65:2297-301.
- Endoh T, Nakajima T, Sakamoto M, Komiyama T: Effects of muscle damage induced by eccentric exercise on muscle fatigue. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:1151-56.
- Gathercole LJ, Keller A: Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix* 1991;11:214-34.
- Grounds MD, Sorokin L, White J: Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scand J Med Sci Sports* 2005;15:381-91.
- Hedbom E, Heinegård D: Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem* 1989;264:6898-905.
- Keene DR, Antonio JDS, Mayne R, et al.: Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem* 2000;275:21801-4.
- Kjær M: Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004;84:649-98.

- Landis WJ, Silver FH: The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:1135-57.
- Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ: Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 2004;37:865-77.
- Maganaris CN, Narici MV, Almekinders LC, Maffulli N: Biomechanics and pathophysiology of overuse tendon injuries – Ideas on insertional tendinopathy. *Sports Med* 2004;34:1005-17.
- Magnusson SP, Hansen P, Kjær M: Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13:211-23.
- Magnusson SP, Qvortrup K, Larsen JO, et al.: Collagen fibril size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. *Matrix Biol* 2002;21:369-77.
- Messner K, Wei Y, Andersson B, Gillquist J: Rat model of Achilles tendon disorder. *Cells Tissues Organs* 1999;165:30-9.
- Ministério da Previdência Social. *Base de dados do anuário estatístico da previdência social*. Disponível no: <http://www.mpas.gov.br>. Acessado em dezembro de 2005.
- Ministério da Saúde. *Observatório nacional de saúde do trabalhador*. Disponível no: <http://portal.saude.gov.br/saude/sas/strabalhador>. Acessado em dezembro de 2005.
- Nakama LH, King KB, Abrahamsson S, Rempel DM: Evidence of tendon microtears due to cyclical loading in an in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res* 2005; 23:1199-205.
- Paillard T, Noé F, Passelergue P, Dupui P: Electrical stimulation superimposed onto voluntary muscular contraction. *Sports Med* 2005;35:951-66.
- Pette D, Vrbová G: Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992;120:115-202.
- Riley GP: Gene expression and matrix turnover in overuse and damaged tendons. *Scand J Med Sci Sports* 2005;15:241-51.
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL: Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendonitis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:367-76.
- Robinson PS, Huang T-F, Kazam E, Iozzo RV, Birk DE, Soslowsky LJ: Influence of decorin and biglycan on mechanical properties of multiple tendons in knockout mice. *J Biomech Eng – Trans ASME* 2005;127:181-5.
- Samiric T, Ilic MZ, Handley CJ: Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. *Matrix Biol* 2004;23:127-40.
- Scott JE: Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988;252:313-23.
- Shah JS, Palacios E, Palacios L: Development of crimp morphology and cellular changes in chick tendons. *Dev Biol* 1982;94:499-504.
- Sharma P, Maffulli N: Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Surg* 2005;87:187-202.
- Silver FH, Christiansen DL, Snowhill PB, Chen Y: Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. *Connect Tissue Res* 2000;41:155-64.
- Silver FH, Horvath I, Foran DJ: Mechanical implications of the domain structure of fiber-forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the $\alpha 1$ -chains found in types I–III collagen. *J Theor Biol* 2002;216:243-54.
- Trotter JA: Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:1127-33.
- Vogel KG, Heinegård D: Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* 1985;260:9298-306.
- Yoon JH, Brooks R, Kim YH, Terada M, Halper J: Proteoglycans in chicken gastrocnemius tendons change with exercise. *Arch Biochem Biophys* 2003;412:279-86.

ARTIGO 1

EFFECT OF ELECTRICAL MUSCLE STIMULATION ON THE BIOMECHANICAL PROPERTIES OF TENDONS

Authors:

Gustavo Pereira Benevides, MS

Laurecir Gomes, PhD

Affiliations:

From the Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Correspondence:

All correspondence and request for reprints should be addressed to

Laurecir Gomes, PhD, Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-863, Campinas, SP, Brazil. Phone: +55 19 3788-6113;

Fax: +55 19 3788-6111; E-mail: laure@unicamp.br

Disclosures:

Gustavo P. Benevides was supported by a CAPES fellowship and a FAPESP grant (04/14619-3).

Each author certifies that he or she has no commercial associations that might pose a conflict in connection with the submitted article.

All experimental procedures were approved by the institutional Ethics Committee for Animal Research (CEE/IB/UNICAMP).

Presented, in part, in abstract and poster form at the 16th Brazilian National Meeting of Physical Therapy, October 2005, São Paulo, SP., Brazil.

Running head:

Muscle stimulation and tendon property

ABSTRACT

Objective: This study evaluated the effects of different patterns of electrical muscle stimulation on the biomechanical properties of gastrocnemius and superficial digital flexor tendons in chickens.

Design: Chickens were exercised using protocols mimicking strength training, endurance training or strenuous exercise. The main difference between protocols was the number of load cycles per session. The tendons were compared on the basis of the mechanical tensile strain test and collagen content.

Results: The protocols produced different degrees of tendon remodeling, and the same protocol often led to distinct responses in the tendons. For the gastrocnemius tendon, the lowest number of cycles yielded a strong tendon, and more cycles decreased its biomechanical properties, including stiffness. For the superficial tendon, the smallest number of cycles reduced the stress strength, whereas a larger number of cycles had little effect on the biomechanical properties of the tendon. There was a negative correlation between the tangent modulus and the cross-sectional area, and a positive correlation between the cross-sectional area and collagen content.

Conclusion: These findings suggest that tendons may respond to the number of contractions rather than to the absolute tension exerted. In addition, these results provide some support for the clinical application of electrical muscle stimulation, modifying the stiffness of the tendon to improve neuromuscular function or its ability to control joint rotation.

Key Words: Biomechanical, Chicken, Collagen, Electrical Stimulation, Tendon

INTRODUCTION

The extracellular matrix (ECM) present in tendons ensures a functional link between skeletal muscle cells and bone, and transforms the force developed from the muscle to the bone into mechanical loading that allows the coordinated movement of joints in the body. The transmission of force from the muscle–tendon complex depends on the structural integrity of individual muscle fibers and the ECM, as well as on the fibrillar arrangement of the tendon and its ability to absorb and store energy. Similarly, the tensile strength of the ECM is based on intra- and intermolecular cross-links and on the orientation, density, and length of collagen fibrils and fibers.¹ The properties of tendons can significantly influence the behavior of the entire muscle-tendon complex. In addition, a number of conditions related to physical activity, including overuse injuries, involve tendons and their associated connective tissue.²

Tendons undergo remodeling in response to strength or endurance training,³ and changes in the mechanical environment significantly affect the mechanical properties of tendon tissue.⁴ However, the mechanisms of tendon injury and the relationship between such injury and the level of physical activity are still incompletely understood. Consequently, the ability of clinicians to provide optimal treatment and to prevent injury remains limited.²

Studies examining the mechanical changes in tendon in response to physical activity suggest that the ultimate failure strength, stiffness, thickness, and collagen concentration of tendons are improved with endurance or strength training.^{2,3,5-9} Conversely, other studies have reported a decrease in the biomechanical properties of tendons under similar conditions.^{4,10-14} These contradictory findings probably reflect differences in the experimental conditions, including the type of treadmill, the load applied and the resting period used. Repair and remodeling occur continuously in healthy tendons, with the rate of repair being equal to the rate of damage.⁶ When submitted to mechanical strain, tendons respond to the total number of

contractions rather than to the absolute magnitude of the contractions, but moderate intensity training produces a hypertrophic response, suggesting that the adaptation of the tendon may depend in part on the magnitude of the stimulus.^{2,6,12}

Injuries associated with exercise and/or repetitive motions are often limited to the tendon.⁶ This implies that, although activity can stimulate collagen synthesis in tendons and skeletal muscle, greater activity is needed to stimulate ECM turnover in tendon than in muscle.¹ Increased tensile strength might be expected to maintain the level of safety factors when the tendon is loaded, a state when it is more susceptible to injury.⁶ Tendons can act as a mechanical buffer and potentially protect the muscle fiber against stretch and possible damage.² After injury, healing of tendons results in the formation of a fibrotic scar. The structure, organization, and mechanical properties of this healed tissue are inferior to those of healthy, undamaged tendon. Although these properties improve over time, they do not return to normal levels without specific clinical treatment, even after long periods of recovery.^{1,15}

Tendons in the lower extremities are also subject to overuse injuries through sports, work and recreational activities.⁵ The mechanism of overuse is a repetitive microtrauma caused by the repeated exposure of tissue to a low magnitude force, which itself does not result in tissue injury.¹⁴ The understanding of how tendons adapt to different patterns of exercise may ultimately contribute to our knowledge of the mechanisms of injury and the process of healing, and may help to improve rehabilitation treatment. In the present report, we studied the relationship between electrical muscle stimulation and different levels of physical activity and biomechanical tendon properties.

MATERIALS AND METHODS

Animals

One-day-old Pedrês chickens (*Gallus domesticus*) were randomly assigned to five groups of eight chickens each. The animals were housed in 0.5 m² cages (4 animals/cage) in the Animal House of the Department of Cell Biology, UNICAMP, with all animals receiving the same type of feed. After 4 weeks, the animals were arbitrarily assigned to a control group (C), untrained group, or one of four exercise groups (I, II, III and IV).

Electrical stimulation apparatus and protocols

When required, the animals were anesthetized by intramuscular injection of ketamine (20 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg), which is sufficient to maintain anesthesia for at least 1 hour. The need for a second dose was the exception. Subsequently, the skin overlying both legs was shaved and the chickens were placed in the supine position on a concave board, with the thorax and hip being fixed with Velcro straps to maintain the animals in dorsal decubitus. Surface electrodes measuring 1.30 cm in diameter and greased with watery gel (Gelectrus – KLD[®], Biosistemas Equipamentos Eletrônicos, Amparo, SP, Brazil) to improve contact were placed separately on the gastrocnemius muscle belly and fixed in place with crepe paper. At the beginning of each session, the amperage (the amplitude of electrical current) of the apparatus used for electrical stimulation (Endophasys-R/ET 9701 – KLD[®]) was set to produce the greatest possible muscle contraction against a moderate resistance,¹⁶ and was periodically readjusted to account for muscle adaptation.¹⁷ The patterns of the stimuli are shown in Table 1. The other electrical stimulation parameters were the same for all groups: the duration of muscle contraction consisted of a 3 seconds fixed ramp, i.e., a progressive increase in intensity, with the active phase (the peak

intensity) varying between groups (Table 1). The carrier-wave frequency was set at 2500 Hz (rectangular, symmetric, alternate, and interrupted wave) and modulated at 30 Hz using a 50% duty cycle.¹⁷

Tendon excision

After 8 weeks of electrical stimulation, the chickens were weighed, anesthetized with chloral hydrate (0.3 mg/kg, i.v.), and then killed by injection of 1 mL 4 M KCl, i.v. The gastrocnemius tendon (*GT*) and the superficial digital flexor tendon (*ST*), i.e., the tendon of the musculus flexor perforatus digiti III and IV, were used. For biomechanical testing, the muscle-tendon complex was excised as a single unit. The *ST* was removed with the muscles and phalanges to which it was attached, whereas the *GT* was removed only with its muscles because the tendon was inserted along the tarsometatarsal bone.³ For biochemical analysis, the tendons were divided into proximal (*p*) and distal (*d*) regions. The *p* region of the *ST* is compressed by the sesamoid bone of the *GT* against the trochlea of the tibia, and therefore receives compressive forces in addition to tensile forces. The *d* region, which runs parallel to the tarsometatarsal bone, is exposed to tensile strength only.¹⁸ For each group, 16 specimens of each type of tendon were used: 10 tendons for biomechanical analysis and 6 for the biochemical test.

Biomechanical test

Before the mechanical tensile strain test, the length (mm) and cross-sectional area (mm²) of each tendon were determined in the mid-distal region with calipers. The clamping technique for the tendons was based on the method described by Probst et al,¹⁹ with some adaptations for the present specimens, including a new clamping device. Before fixation, the muscle fibers were scraped off with the back of a scalpel blade until the entire length of the fan-shaped pattern of the

tendon fibers originating from the muscle became visible. The intramuscular tendon fibers were placed between two sheets of filter paper (100 g/m^2), which were then folded twice longitudinally and clamped in the clamping device. The specimens were fixed to a mechanical support through plate clamps (Fig. 1) which attached the intramuscular tendon at one end and the phalanges (*ST*) or distal insertion (*GT*) at the other. The procedure for distal insertion of the *GT* was analogous to that used for the intramuscular tendon.

The plate clamps, made of steel/carbon 1045, were square with a size ($80 \times 80 \text{ mm}$) sufficient to accommodate the fan-shaped intramuscular tendon without altering its width. To avoid guillotine effects, the inner surfaces of the plates had different shapes, with one side being flat and the other wavy. Each wave had a triangular profile with a rounded peak. In addition, on the underside of the flat plate, the right angle was cut out because in this region the specimens could be strangled. The locking screws were found to be adequate to grip the specimens without macroscopic damage or slippage of the clamped part during the testing procedures.¹⁴

An MTS model Teststar II apparatus was used for the test. Each tendon was submitted to a gradual increase in load at a constant displacement rate of 20 mm/minute using a 1 kN load cell,⁴ with consecutive load (N) x displacement (mm) data pairs. The whole procedure was carried out at room temperature and physiological saline was used to prevent the fibers from drying.¹⁰ The following parameters were then determined for each sample: stress (N/mm^2 , i.e., MPa) x strain (%) curve, where strain was calculated and is expressed as the percentage of the initial reference length ($\Delta L = (L_f - L_i)/L_i$, where L_f is the length reached by the tendon immediately before the disruption and L_i the initial length of the tendon),³ the load at which the tendon ruptured (maximum load), and the maximum stress strength that was calculated by dividing the maximum load by the cross-sectional area. The tangent modulus (MPa) was calculated from a least squares linear regression of the linear region of the apparent stress-strain

curve. The boundary between the toe part and linear part was set at 2% and 3% strain. This range was chosen to guarantee that the reported tangent modulus was referenced to a functionally equivalent point (rupture) across specimens.^{4,20}

Biochemical test

Tendon samples were assayed for hydroxyproline (as an indicator of total collagen content) as described by Stegemann and Stalder.²¹ Briefly, samples were hydrolyzed in 6 N HCl (1 mL/10 mg tissue) for 16 hours at 107°C. The hydrolysates were then oxidized with chloramine-T solution and the chromophores were developed after 20 minutes by the addition of aldehyde/perchloric acid solution. The mixture was incubated for 15 minutes at 60°C and cooled and the resulting absorbance was read in a spectrophotometer (Hewlett Packard 8452A) at $\lambda = 550$ nm. The hydroxyproline content of the tissue samples was deduced from a standard calibration curve.

Statistical analysis

The results are expressed as means $\pm$ SD. The data were analyzed statistically by nonparametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (*H*-test) when all groups were compared, and by the Mann-Whitney test (*U*-test) when the control group was compared to each electrically stimulated group. Statistical analysis was performed using the BioEstat software²². A *P* value ≤ 0.05 indicated significance in all cases.

RESULTS

No significant difference in body weight was observed between the various groups (data not shown).

The maximum biomechanical data and corresponding statistical analysis for each group are shown in Table 2A, B and C. For *GT*, there were opposite responses mainly between groups II and III, with one group showing the highest results and the other showing the lowest. The highest values for maximum displacement, maximum strain and time to failure were observed in group III, with lower values in group II; the opposite was noted for maximum stress strength. For maximum load, the largest difference was observed between groups III and IV, whereas cross-sectional area mainly differed between groups II and IV. Compared to the control group, the largest differences for most data were observed for group III.

The *ST* showed a different biomechanical response to the protocols, with a pattern that was not as well defined as that seen in the *GT*. Briefly, the maximum load was higher in group I and lower in group II. The changes in group I were more significant when compared to the control group. The maximum displacement was higher in the control group and lower in group III. Only group IV did not differ significantly from the control group. As in *GT*, the cross-sectional area was greater in group IV and smaller in group I, with group I differing significantly from the control group. The maximum stress strength was higher in group I and lower in group IV, with groups I and III being significantly different from the control group. The maximum strain was more pronounced in group IV and less marked in group I, although only group IV did not differ significantly from the control group. The time to failure was greater in the control group and shorter in group III. Once again, only group IV did not differ significantly from control.

The results for the apparent break points and the corresponding statistical analysis are

shown in Table 3A, B and C. The term “apparent” was used here because these values are an average of curve superpositions.^{20,23} Regarding *GT*, it was possible to define a pattern for groups III and IV. Group IV presented a higher load, displacement and time, whereas group III showed the lowest values. Consequently, the largest differences were seen between these two groups. For other measures (stress strength, strain and tangent modulus), the largest differences were observed between groups II and III. Group III generally presented values that were significantly different from the control group. In *ST*, the load measure did not differ significantly between groups. However, group IV showed a more prominent displacement, strain and time, while group I showed higher stress strength and tangent modulus values.

The pattern of the load-displacement curve for *GT* showed a marked variation (Fig. 2). The largest difference was observed between groups III and IV, with group IV withstanding more load and displacement until rupture. Regarding the stress-strain curve (Fig. 3), group II withstood more stress strength but showed less strain, whereas group IV had a slope similar to the control group and group I showed more strain. When strain was plotted against time to failure (Fig. 4), a similar pattern was observed, except for group III which presented faster rupture and group IV which showed a longer time to failure.

For *ST*, the apparent load-displacement curves (Fig. 5) showed a similar pattern in all groups, with no significant differences in load, although greater displacement was observed for group IV. The stress-strain plot showed heterogeneous curves (Fig. 6); control group suffered less stress, similar to groups II and IV, and group I withstood more stress strength. On the other hand, group IV showed more strain until rupture and group I presented premature failure. The strain-time curve (Fig. 7) showed great homogeneity with respect to the slope (data not shown). However, group IV presented more strain and a longer time to failure than the other groups.

Hydroxyproline content varied significantly between groups (Table 4A and B).

Hydroxyproline content was higher in the *GTP* and *GTd* regions of group IV, whereas the lowest content was observed for group II. In *ST*, the results were almost the same: hydroxyproline content was highest in the *STp* region of group IV and lowest in group II, while in the *STd* region the content was highest in group III and lowest in group II, with no significant difference between groups III and IV.

DISCUSSION

Exercise influences the biomechanical properties of tendons,⁷ and the biomechanical and biochemical characteristics of chicken tendons can be altered by controlling the area available for locomotion.²³ In the present study, we examined the influence of different exercise protocols on the strength, i.e., the structural and mechanical properties, of tendons. This investigation can provide useful results for application in rehabilitation protocols and for improving tendon properties, preventing the etiological factors of overuse injuries. With respect the number of contractions per session, the protocols used were chosen to mimic strength training, endurance training²¹ and strenuous exercise, i.e., chronic repetitive loading.^{5,10} However, the magnitude of the contractions was the same for all groups. Cyclic loading was used as a realistic representation of locomotion because tendon stress is generally oscillatory in life.¹²

When electrical stimulation is used to control the generation of force, altering the degree of stretch is the best means of providing mechanical stress in a coordinated fashion,¹ without the interference of other external forces, e.g., weight bearing or heterotypical movements. Transcutaneous stimulation was used in the present study because it is non-invasive, is focused, is easily reproduced, is convenient for repeated application, and is useful for clinical treatment. The frequency was set at 30 Hz because the muscle groups in chicken legs contain a high proportion of slow-twitch muscle fibers,²⁴ and stimulation with 30 Hz is more effective in this

type of fiber than other frequencies.²⁵

The finding that the chickens did not differ significantly in body weight indicates that the muscular tension produced in response to the birds' weight was practically the same for all groups, and confirmed that electrical stimulation was the main factor responsible for modifying the tendons. As shown here, it was possible to remodel tendons over an 8-week period, with the same protocol producing distinct responses in *GT* and *ST*. These different responses most likely reflected the marked variations between the muscles involved (*ST* is a deep muscle compared to *GT*).¹⁸ In addition to the anatomical position, the shape and functions of the tendon can influence the tissue response.²⁶ In this respect, *ST* is cylindrical whereas *GT* is flat, and *GT* extends the ankle joint and exerts a flexor moment at the knee, whereas *ST* has the same function but also flexes the toes.¹⁸ Proportionally, the most advantageous protocol, particularly for *GT*, was that used in group IV, while the least advantageous one was the protocol used in group III. The most useful protocol led to a stronger tendon when applied three times a week for only 15 minutes per session. In contrast, application of the shortest cycle for 1 hour per session produced a weak tendon. A similar protocol of 1 hour per day, but with fewer contraction cycles (group I), provided some biomechanical improvement, mainly for *ST*. This finding agrees with the hypothesis about the "time-dependent damage" experienced by tendons under a tensile load,²⁷ i.e., that fatigue involves routine damage and repair is needed for homeostasis. Damage may accumulate if the number of load cycles increases.⁶ Any alteration in the balance between collagen synthesis and degradation can influence tissue architecture, impair organ function, and change the mechanical properties of the tissue.¹⁵

Force and deformation provide information about the quantitative mechanical behavior of a structure, without taking into consideration its length and size, while stress and strain account for the dimensions of the structure and provide information about its qualitative properties. The

application of an external tensile force will be opposed by the internal arrangement of the structure, and this creates the tensile stress of the material.² Fibrous collagen is the major mechanical element found in tendons, with type I being the main collagen present.¹¹ However, the internal arrangement involves other factors, such as crimp morphology,²⁸ intra- and intermolecular cross-links, and proteoglycans.^{1,27} Ultimately, the strength of a tendon is basically related to its thickness and collagen content.⁷ Consequently, increasing the tendon cross-sectional area may serve to reduce stress.²

In the present study, the mid-distal region was used to assess the cross-sectional area. This region was chosen because the difference in tendon cross-sectional area between athletes and sedentary individuals is most pronounced in the distal part of the tendon. This observation supports the idea of region-specific hypertrophy in response to habitual running, and provides the basis for identifying tendon regions that are susceptible to injury.¹ The metatarsal site was defined as the point at which the cross-sectional area reached a minimum.¹³ However, an increased tendon cross-sectional area cannot be attributed solely to an enhanced collagen content since the geometrical configuration of collagen fibrils affects the behavior of the tendon under a load.¹⁰ Some authors^{13,29} have reported that collagen content is negatively correlated with tendon cross-sectional area, whereas others have found that collagen content increases in direct proportion to the cross-sectional area in trained pigs⁹ and mice.³⁰ In contrast, Buchanan and Marsh³ found no correlation between these parameters. As shown here, there was a positive relationship between collagen content and cross-sectional area in all groups. This finding indicates that some protocols of electrical stimulation enhance collagen synthesis, in agreement with biomechanical studies.

During loading, tendons show a non-linear viscoelastic response with an initial toe region followed by a progressively steeper region.² Tendon fibers possess a wave form at rest, but only a

low load is required for them to become straightened. The force to stretch these fibers is increased, and therefore the slope of the stress-strain curve increases suddenly and becomes more linear.^{9,23,28} Thus, the curve can be divided into (1) a toe region, which exhibits a very low stiffness, i.e., small increases in stress accompanied by marked increases in extension that correspond to a straightening out of the collagen kinks, (2) a linear region in which the collagen fibers become progressively oriented in the direction of the load, thereby increasing the effective stiffness of the tendon, with the tendon being reversibly extendable, a situation that corresponds to the gliding of molecules within the fibril, and (3) a yield and failure region, which shows a linear relationship between stress and strain before rupture that is determined by the intrinsic properties and interaction of the loaded collagen fibers, with extension of the tendon fibers damaging their structure.^{2,20} During a tensile load, slippage of neighboring collagen fibrils occurs,¹¹ although tendons that have been exercised orient their collagen fibrils in a more organized manner parallel to the lines of tension that creates highly organized inter-fibrillar cross-links with less slack,²⁰ as reflected in the apparent strain seen in group IV.

The stress-strain curve provided a measure of stiffness³ in which the tangent corresponded to the elastic modulus, with the elastic modulus of the curve in the linear region frequently being referred to as Young's modulus.²⁷ Comparison of the tangent modulus revealed significant changes in tendon stiffness. Groups I and II presented a higher tangent modulus for *ST* and *GT*, respectively, in the same way that groups IV and III had a lower modulus. In both tendons of all groups, there was an inverse correlation between strain and the tangent modulus.

Increased stiffness results in less extensibility of the tendon and may cause less damage to the tendon.⁶ Hence, if the tendons were essentially inextensible, the muscle spindle would sense changes in length in a manner similar to that of the entire muscle-tendon complex, with a potential for muscle injury, and this would lead to excessive fiber lengthening and structural

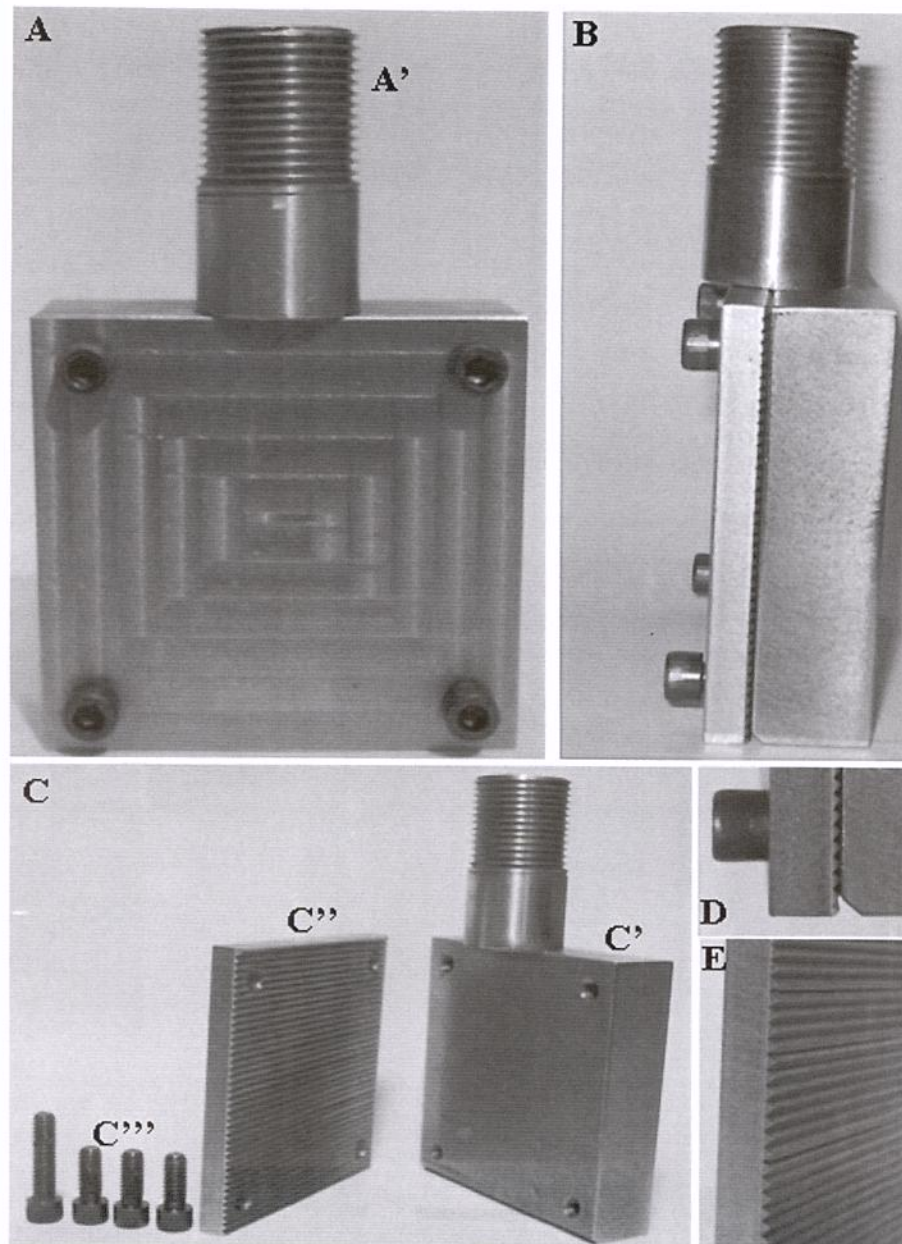
damage to the sarcomeres. In contrast, in a muscle with a very extensible tendon, the storage and recovery of elastic energy would be favored, and the large absolute elongation of the tendon might exceed that of the muscle fascicles, a situation that would likely curtail joint position control. Clinically, a lower stiffness would facilitate neuromuscular ability to maintain a constant force in the presence of any perturbation that would affect tendon length, while increased stiffness would improve the ability to control joint rotation.^{2,3} Ker et al⁸ and Mass et al²⁰ suggested that tendon thickness and collagen content contribute to stiffness, and Riemersma and Schamhardt¹³ showed that the modulus of elasticity was inversely proportional to the cross-sectional area. Our results agree with those reported by these authors since they showed a negative correlation between the tangent modulus and the cross-sectional area and collagen content.

The focus of the present study was on the biomechanical relevance of tendon properties, but also had clinical implications, permitting the determination of the time pattern of responses to exercise. The time pattern needs to be determined both in the resting state and during exercise. This will be a prerequisite to improve treatment and evaluate intervention in tendons.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Luís Lisboa (Laboratory of Mechanical Properties, Department of Materials Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, UNICAMP) for help with the mechanical tensile strain test, and Glauco José Longo (KLD[®] Biosistemas Equipamentos Eletrônicos, Amparo, SP, Brazil) for lending the apparatus for electrical stimulation. The chickens were kindly provided by Incubadora Paraíso (Itatiba, SP, Brazil).

FIGURE 1 Clamping device consisting of steel/carbon 1045.



Front view of the square plates (80 x 80 mm) (A). Screw used to fix the clamping device to the MTS apparatus (A'). Lateral view of the square plates (B). Internal view of the square plates (C), flat plate (C'), wavy plate (C''), and locking screws used to fix the clamps to each other (C'''). Underside of the flat plate showing the inclination to avoid strangling the tissue (D). Wavy plate showing the triangular profile and rounded peak of the waves (E).

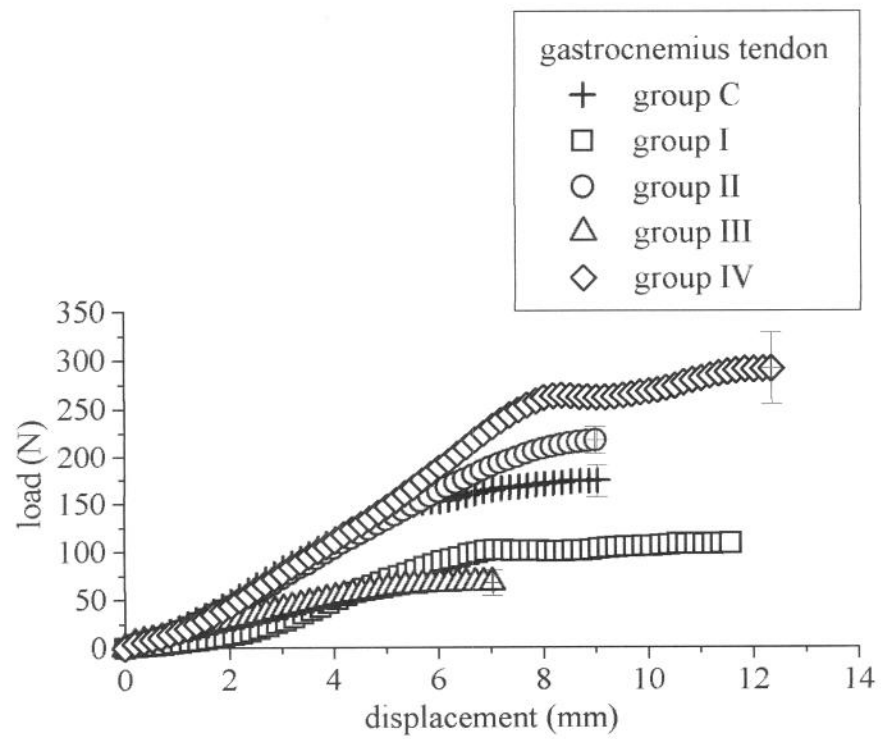
FIGURE 2 Load-displacement curve for *GT*.

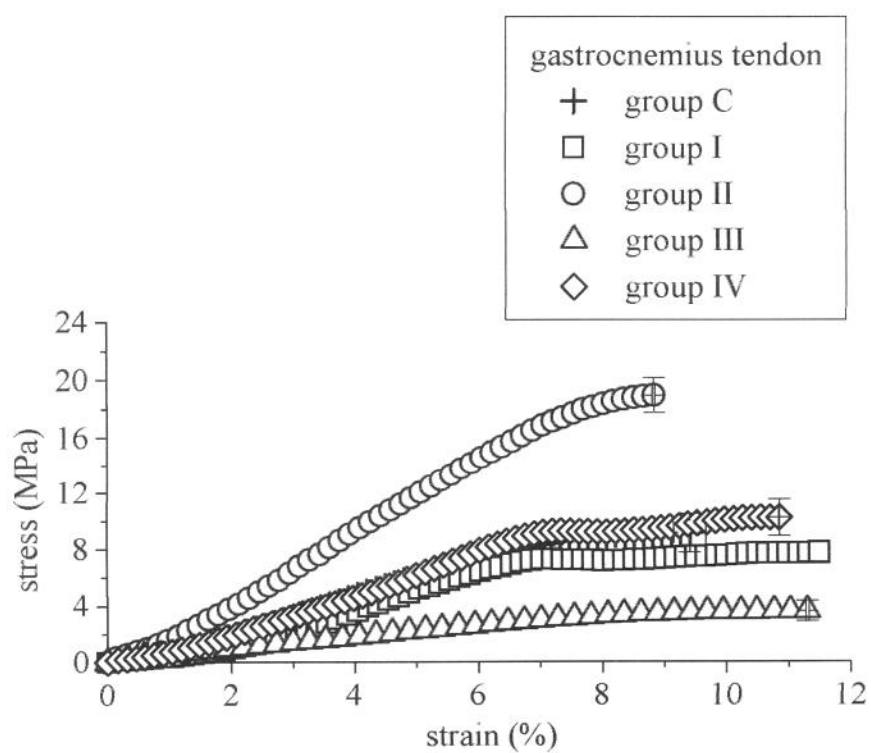
FIGURE 3 Stress-strain curve for *GT*.

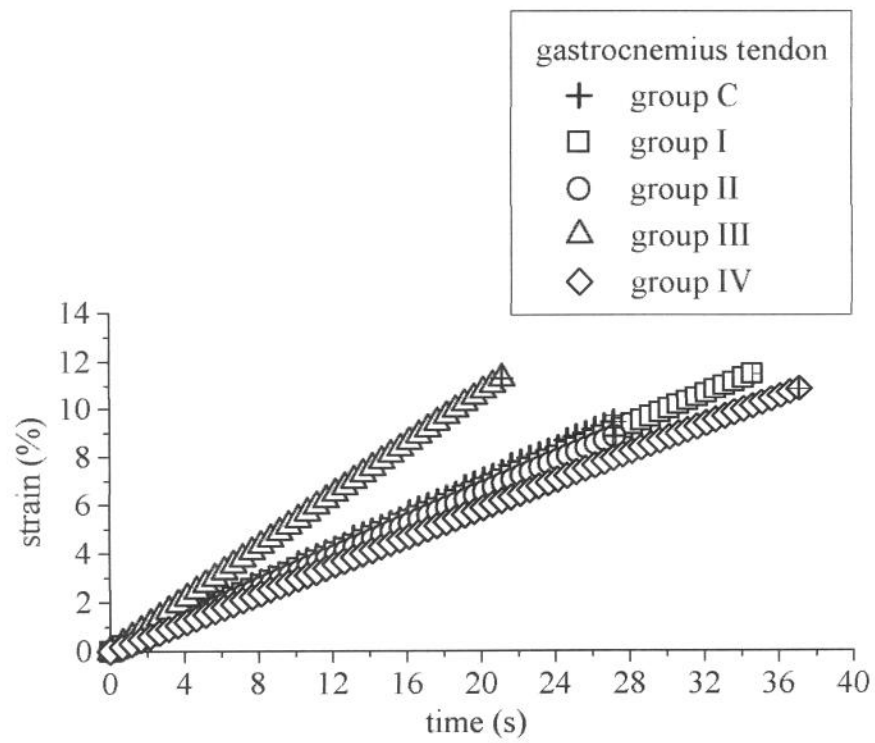
FIGURE 4 Strain-time curve for *GT*.

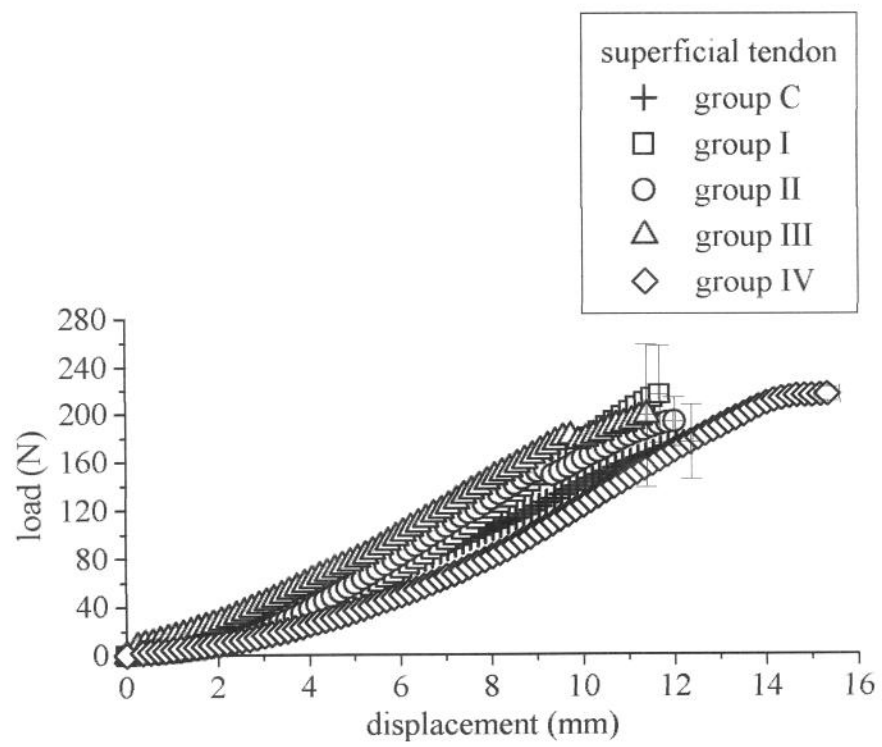
FIGURE 5 Load-displacement curve for *ST*.

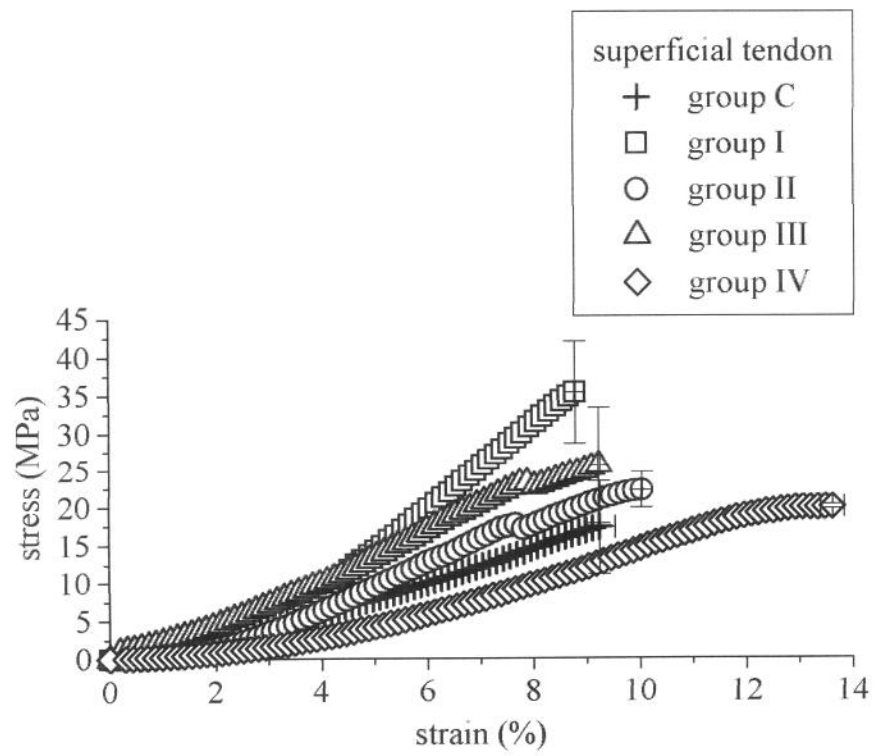
FIGURE 6 Stress-strain curve for *ST*.

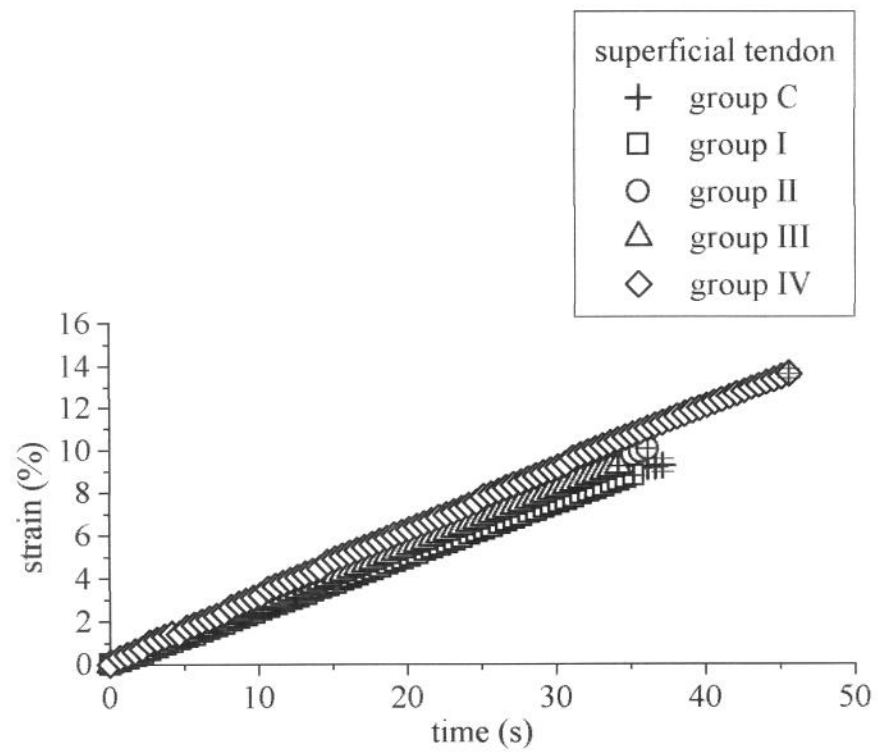
FIGURE 7 Strain-time curve for *ST*.

TABLE 1 Electrical Muscle Stimulation Protocols

animal group	protocol duration (week)	sessions per week	session duration (minute)	increment of session duration per week	duration of contraction phase (second)	duration of rest phase (second)	increment of phases duration (second)	load cycles per session
I	8	5	60	-	6	6	-	240
II	8	5	15	10%	6	6	-	85.25±19.70
III	8	5	60	-	6	3	-	300
IV	8	3	15	-	9	9	3 for each 2 weeks	31.25±7.64

(-) Patterns that were unaltered. The values of load cycles per session are expressed as mean $\pm$ SD. Each cycle consisted of a fixed ramp of 3 seconds, a contraction phase, and rest periods that varied in each group.

TABLE 2A Maximum Biomechanical Data

tendon	animal	load	displacement	cross-sectional	stress	strain	time
	group	(N)	(mm)	area	strength	(%)	(s)
				(mm ²)	(MPa)		
<i>GT</i>	C	204.01±9.00	12.12±1.60	18.20±1.94	10.10±0.85	9.74±2.04	34.38±5.78
	I	152.54±15.50	10.26±1.27	13.98±0.23	10.91±1.10	10.20±1.27	30.89±3.89
	II	218.09±14.99	9.13±0.11	11.47±2.43	19.00±1.30	8.97±0.10	27.52±0.21
	III	79.31±11.30	29.30±1.16	18.66±3.69	4.21±1.09	47.09±1.87	88.00±3.51
	IV	319.10±2.24	14.10±2.50	28.47±4.20	11.20±0.07	12.39±2.20	42.40±7.38
<i>ST</i>	C	210.21±18.28	16.21±2.08	8.85±1.66	22.70±2.29	12.82±1.78	50.15±7.56
	I	242.59±3.67	12.52±1.15	6.11±1.96	39.68±0.60	9.42±0.87	37.70±3.52
	II	194.91±18.32	12.25±0.33	8.66±0.75	22.48±2.11	10.25±0.27	36.90±1.07
	III	233.92±13.13	11.73±0.27	7.96±2.01	29.83±1.34	9.50±0.22	35.18±0.88
	IV	216.75±0.03	15.98±0.78	10.73±3.15	20.20±0.01	13.33±0.65	47.41±1.80

The values are expressed as the mean ± SD.

TABLE 2B Statistical Analysis of the Maximum Biomechanical Data for *GT*

	load		displacement		cross sectional		stress strength		strain		time	
	(N)		(mm)		area (mm ²)		(MPa)		(%)		(s)	
animal groups	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test
	0.0089	-	0.0014	-	0.0025	-	0.0019	-	0.0053	-	0.0017	-
C x I	0.3309	0.0339	0.2716	0.1025	0.0745	0.0126	0.4803	0.2294	0.4406	0.3502	0.4850	0.2049
C x II	0.4495	0.0771	0.0326	0.006	0.0182	0.0126	0.0119	0.0126	0.3658	0.3297	0.0486	0.0237
C x III	0.0423	0.0209	0.0236	0.006	0.7353	0.5371	0.0511	0.0055	0.0019	0.0041	0.0102	0.0047
C x IV	0.1051	0.0339	0.3432	0.1025	0.0511	0.0126	0.1400	0.0522	0.1162	0.0868	0.2037	0.0630
I x II	0.1059	-	0.4597	-	0.6373	-	0.1396	-	0.1773	-	0.3545	-
I x III	0.3642	-	0.0053	-	0.0683	-	0.0315	-	0.0855	-	0.0095	-
I x IV	0.0153	-	0.0896	-	0.0023	-	0.5295	-	0.5235	-	0.1124	-
II x III	0.0084	-	0.0001	-	0.0200	-	0.0002	-	0.0009	-	0.0001	-
II x IV	0.4188	-	0.0106	-	0.0004	-	0.3960	-	0.0423	-	0.0087	-
III x IV	0.0005	-	0.3298	-	0.1508	-	0.0048	-	0.2994	-	0.3708	-

P values for the Kruskal-Wallis (*H*-test) and Mann-Whitney (*U*-test) tests. The *P* value for the entire test is shown below the *H*-test; the other values are for pairs of groups.

A value of $P \leq 0.05$ indicated significance. (-) Not applicable.

TABLE 2C Statistical Analysis of the Maximum Biomechanical Data for *ST*

	load		displacement		cross sectional		stress strength		strain		time	
	(N)		(mm)		area (mm ²)		(MPa)		(%)		(s)	
animal	<i>H</i> - test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test
groups	0.0092	-	0.0011	-	0.1007	-	0.0007	-	0.0016	-	0.0008	-
C x I	0.0119	0.0247	0.0215	0.0142	0.1007	0.0321	0.0008	0.0034	0.0098	0.0180	0.0212	0.0102
C x II	0.2614	0.1258	0.0284	0.0112	0.1007	0.4750	0.9272	0.7595	0.1411	0.0425	0.0193	0.0102
C x III	0.0385	0.0281	0.0002	0.0022	0.1007	0.4642	0.0337	0.0034	0.0009	0.0022	0.0001	0.0018
C x IV	0.4177	0.2207	0.8243	0.6726	0.1007	0.1846	0.4108	0.2207	0.7500	0.6726	0.5954	0.3502
I x II	0.0025	-	0.9310	-	0.1007	-	0.0067	-	0.3708	-	0.9779	-
I x III	0.4734	-	0.4979	-	0.1007	-	0.2636	-	0.8718	-	0.4237	-
I x IV	0.1572	-	0.0941	-	0.1007	-	0.0007	-	0.0194	-	0.1572	-
II x III	0.0079	-	0.4386	-	0.1007	-	0.0814	-	0.2453	-	0.4419	-
II x IV	0.1089	-	0.1124	-	0.1007	-	0.5444	-	0.1489	-	0.1492	-
III x IV	0.3873	-	0.0108	-	0.1007	-	0.0155	-	0.0055	-	0.0172	-

P values for the Kruskal-Wallis (*H*-test) and Mann-Whitney (*U*-test) tests. The *P* value for the entire test is shown below the *H*-test; the other values are for pairs of groups.

A value of $P \leq 0.05$ indicated significance. (-) Not applicable.

TABLE 3A Apparent Values for the Break-point Curves

tendon	animal group	load (N)	displacement (mm)	Stress strength (MPa)	strain (%)	time (s)	tangent modulus (MPa)
<i>GT</i>	C	173.87±16.92	9.03±0.01	9.13±1.37	9.42±0.25	27.16±0.04	1.11±0.25
	I	108.45±11.02	11.57±0.01	7.75±0.78	11.50±0.01	34.64±0.01	0.79±0.25
	II	217.32±13.91	8.99±0.02	18.93±1.21	8.84±0.02	27.21±0.07	2.39±0.01
	III	67.78±13.28	7.03±0.01	3.60±0.70	11.30±0.02	21.17±0.02	0.32±0.06
	IV	291.22±37.18	12.36±0.01	10.22±1.30	10.85±0.01	37.15±0.02	1.07±0.13
<i>ST</i>	C	175.99±31.09	12.38±0.02	17.32±6.15	9.25±0.29	37.16±0.04	1.86±0.69
	I	216.29±40.86	11.69±0.01	35.38±6.68	8.80±0.01	35.20±0.05	4.37±0.61
	II	192.96±20.75	12.01±0.01	22.25±2.39	10.04±0.01	36.15±0.01	2.57±0.15
	III	198.07±59.78	11.40±0.02	25.60±7.72	9.23±0.01	34.16±0.06	2.98±0.85
	IV	216.54±6.20	15.35±0.27	19.98±0.30	13.63±0.22	45.65±0.02	1.74±0.05

The values are expressed as the mean ± SD.

TABLE 3B Statistical Analysis of the Apparent Values for the Break-point Curves for *GT*

	load		displacement		stress strength		strain		time		tangent	
	(N)		(mm)		(MPa)		(%)		(s)		modulus	
											(MPa)	
animal	<i>H</i> - test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test
groups	0.0049	-	0.0005	-	0.0032	-	0.0004	-	0.0000	-	0.0023	-
C x I	0.2800	0.0339	0.1366	0.0126	0.6533	0.4595	0.0111	0.0126	0.0234	0.0011	0.1504	0.0896
C x II	0.3642	0.0339	0.3294	0.0790	0.0273	0.0126	0.1658	0.0126	0.9025	0.8273	0.0338	0.0055
C x III	0.0687	0.0209	0.0203	0.0055	0.0238	0.0055	0.0048	0.0055	0.0097	0.0005	0.0394	0.0136
C x IV	0.0919	0.0339	0.0291	0.0126	0.2927	0.0961	0.1658	0.0126	0.0014	0.0011	0.8456	0.8774
I x II	0.0630	-	0.0442	-	0.0301	-	0.0013	-	0.0511	-	0.0025	-
I x III	0.5452	-	0.0018	-	0.1657	-	1.0000	-	0.0001	-	0.5972	-
I x IV	0.0097	-	0.5715	-	0.2202	-	0.3457	-	0.4530	-	0.2906	-
II x III	0.0095	-	0.3298	-	0.0002	-	0.0006	-	0.0501	-	0.0004	-
II x IV	0.4669	-	0.0099	-	0.3457	-	0.0236	-	0.0069	-	0.0489	-
III x IV	0.0007	-	0.0002	-	0.0070	-	0.3134	-	0.0000	-	0.1129	-

P values for the Kruskal-Wallis (*H*-test) and Mann-Whitney (*U*-test) tests. The *P* value for the entire test is shown below the *H*-test; the other values are for pairs of groups.

A value of $P \leq 0.05$ indicated significance. (-) Not applicable.

TABLE 3C Statistical Analysis of the Apparent Values for the Break-point Curves for *ST*

	load		displacement		stress strength		strain		time		tangent	
	(N)		(mm)		(MPa)		(%)		(s)		modulus	
											(MPa)	
animal	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test	<i>H</i> -test	<i>U</i> -test
groups	0.1616	-	0.0008	-	0.0191	-	0.0010	-	0.0000	-	0.0023	-
C x I	0.1616	0.0662	0.0286	0.0143	0.0021	0.0143	0.0962	0.0321	0.0082	0.0012	0.0016	0.0066
C x II	0.1616	0.3074	0.4096	0.3074	0.2842	0.2207	0.0625	0.0143	0.0835	0.0012	0.2120	0.0894
C x III	0.1616	0.1877	0.0093	0.0034	0.0381	0.0404	0.9596	1.0000	0.0000	0.0003	0.0768	0.0570
C x IV	0.1616	0.0662	0.1470	0.0143	0.8127	0.5403	0.0109	0.0143	0.0835	0.0012	0.4540	0.3082
I x II	0.1616	-	0.2578	-	0.0957	-	0.0035	-	0.4530	-	0.0975	-
I x III	0.1616	-	1.0000	-	0.2160	-	0.1138	-	0.3308	-	0.1669	-
I x IV	0.1616	-	0.0025	-	0.0184	-	0.0005	-	0.0003	-	0.0007	-
II x III	0.1616	-	0.2058	-	0.5316	-	0.0916	-	0.0746	-	0.7154	-
II x IV	0.1616	-	0.0593	-	0.4892	-	0.5715	-	0.0044	-	0.0837	-
III x IV	0.1616	-	0.0007	-	0.1619	-	0.0204	-	0.0000	-	0.0287	-

P values for the Kruskal-Wallis (*H*-test) and Mann-Whitney (*U*-test) tests. The *P* value for the entire test is shown below the *H*-test; the other values are for pairs of groups.

A value of $P \leq 0.05$ indicated significance. (-) Not applicable.

TABLE 4A Hydroxyproline Content (mg/g tissue) of the Tendon Regions.

animal group	tendon region			
	<i>GTP</i>	<i>GTd</i>	<i>STp</i>	<i>STd</i>
C	19.80±3.88	32.58±1.24	36.30±4.71	24.70±1.76
I	19.37±1.20	26.56±0.39	28.68±0.67	24.29±0.47
II	15.34±2.43	25.04±0.40	27.19±0.03	21.39±0.46
III	22.72±8.53	32.29±6.55	33.60±5.66	34.70±9.62
IV	26.06±0.91	34.57±0.70	41.38±0.54	33.95±0.48

The values are expressed as the mean ± SD.

TABLE 4B Statistical Analysis of the Hydroxyproline Content in the Tendon Regions

animal groups	tendon region							
	<i>GTp</i>		<i>GTd</i>		<i>STp</i>		<i>STd</i>	
	<i>H</i> - test	<i>U</i> - test	<i>H</i> - test	<i>U</i> - test	<i>H</i> - test	<i>U</i> - test	<i>H</i> - test	<i>U</i> - test
	0.0342	-	0.0042	-	0.0042	-	0.0072	-
C x I	0.9902	0.8197	0.0606	0.0167	0.0934	0.0201	0.6767	0.5688
C x II	0.1095	0.0874	0.0055	0.0167	0.0071	0.0201	0.0606	0.0167
C x III	0.4581	0.4250	0.2888	0.1106	0.2510	0.0707	0.1531	0.0874
C x IV	0.0450	0.0167	0.2416	0.0527	0.2004	0.0201	0.0424	0.0167
I x II	0.1796	-	0.4462	-	0.3792	-	0.2175	-
I x III	0.5375	-	0.4907	-	0.6464	-	0.1188	-
I x IV	0.0882	-	0.0100	-	0.0104	-	0.0387	-
II x III	0.4682	-	0.1468	-	0.1808	-	0.0052	-
II x IV	0.0023	-	0.0008	-	0.0006	-	0.0010	-
III x IV	0.0203	-	0.0593	-	0.0355	-	0.6116	-

P values for the Kruskal-Wallis (*H*-test) and Mann-Whitney (*U*-test) tests. The *P* value for the entire test is shown below the *H*-test; the other values are for pairs of groups.

A value of $P \leq 0.05$ indicated significance. (-) Not applicable.

REFERENCES

1. Kjør M: Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004;84:649-98
2. Magnusson SP, Hansen P, Kjør M: Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13:211-23
3. Buchanan CI, Marsh RL: Effects of long-term exercise on the biomechanical properties of the Achilles tendon of guinea fowl. *J Appl Physiol* 2001;90:164-71
4. Tohyama H, Yasuda K: The effects of stress enhancement on the extracellular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J Biomech* 2000;33:559-65
5. Archambault JM, Hart DA, Herzog W: Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res* 2001;42:13-23
6. Buchanan CI, Marsh RL: Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:1101-07
7. Cherdchutham W, Meershoek LS, van Weeren PR, Barneveld A: Effects of exercise on biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon in foals. *Am J Vet Res* 2001;62:1859-64
8. Ker RF, Wang XT, Pike AVL: Fatigue quality of mammalian tendons. *J Exp Biol* 2000;203:1317-27
9. Woo SL-Y, Ritter MA, Amiel D, et al: The biomechanical and biochemical properties of swine tendons – long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect Tissue Res* 1980;7:177-83
10. Carpenter JE, Flanagan CL, Thomopoulos S, Yian EH, Soslowsky LJ: The effects of overuse combined with intrinsic or extrinsic alterations in an animal model of rotator cuff tendinosis. *Am J Sports Med* 1998;26:801-7

11. Landis WJ, Silver FH: The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:1135-57
12. Pike AVL, Ker RF, Alexander RM: The development of fatigue quality in high- and low-stressed tendons of sheep (*Ovis aries*). *J Exp Biol* 2000;203:2187-93
13. Riemersma DJ, Schamhardt HC: In vitro mechanical properties of equine tendons in relation to cross-sectional area and collagen content. *Res Vet Sci* 1985;39:263-70
14. Schechtman H, Bader DL: Fatigue damage of human tendons. *J Biomech* 2002;35:347-53
15. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ: Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 1999;79:308-19
16. Kendall FP, McCreary EK, Provance PG: Músculos Provas e Funções, ed 4. São Paulo, SP, Brasil, Editora Manole, 1995
17. Fuirini N, Longo G: Recursos físicos I – corrente russa – fortalecimento e alongamento de músculos utilizando correntes elétricas, in Cohen M, Abdalla RJ (eds): Lesões nos esportes – diagnóstico, prevenção, tratamento. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Revinter, 2003, pp 317-29
18. Getty R: Anatomia dos animais domésticos, ed 5. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Interamericana, 1981
19. Probst A, Palmes D, Freise H, Langer M, Joist A, Spiegel HU: A new clamping technique for biomechanical testing of tendons in small animals. *J Invest Surg* 2000;13:313-8
20. Mass DP, Tuel RJ, Labarbera M, Greenwald DP: Effects of constant mechanical tension on the healing of rabbit flexor tendons. *Clin Orthop Relat Res* 1993;296:301-6
21. Stegemann H, Stalder K: Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1967;18:267-73
22. Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AS: BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Manaus, AM, Brasil, Sociedade Civil Mamirauá, 1998

23. Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Gomes L: Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res* 2004;45:206-15
24. Young RB, Bridge KY, Strietzel CJ: Effect of electrical stimulation on β -adrenergic receptor population and cyclic AMP production in chicken and rat skeletal muscle cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000;36:167-73
25. Goldspink G, Scutt A, Martindale J, Jaenicke T, Turay L, Gerlach G-F: Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* 1991;19:368-73
26. Józsa LG, Kannus P: Functional and mechanical behavior of tendons, in Washburn R, Frey R, Smith N, Woolsey H, Johnson P (eds): Human tendons: anatomy, physiology, and pathology. Champaign, IL, Human Kinetics, 1997, pp 98-113
27. Ker RF: The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:987-1000
28. Gathercole LJ, Keller A: Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix* 1991;11:214-234
29. Loren GJ, Lieber RL: Tendon biomechanical properties enhance human wrist muscle specialization. *J Biomech* 1995;28:791-9
30. Michna H, Hartmann G: Adaptation of tendon collagen to exercise. *Int Orthop* 1989;13:161-5

ARTIGO 2

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DA MATRIZ EXTRACELULAR EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE TENDINOPATIA CRÔNICA.

Gustavo Pereira Benevides e Laurecir Gomes

RESUMO

Um modelo experimental para induzir a síndrome do uso excessivo tendíneo foi desenvolvido a fim de analisar os seus aspectos patobiológicos. Para satisfazer as condições etiológicas dessa patologia, isto é, uma oscilação freqüente da tensão baseada no número de ciclos e não propriamente na carga aplicada a cada ciclo, foram utilizados estimuladores elétricos para o controle da geração e duração da contração muscular. Músculos flexores plantar de frangos, foram submetidos ao protocolo de indução da tendinopatia crônica durante 8 semanas. Os tendões do músculo gastrocnêmio e os flexores digitais superficiais apresentam duas regiões distintas, uma que recebe forças principalmente tensionais e outra que, além da força tensional, está sujeita a forças compressivas. Após extração com cloridrato de guanidina, os componentes da matriz extracelular das regiões tendíneas de ambos os tendões e grupos de animais (controle e estimulado), foram purificados em cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica e suas frações analisadas em SDS-PAGE. Os géis de todas as regiões tendíneas apontaram a presença de componentes que provavelmente são os pequenos proteoglicanos, decorim e fibromodulim, os quais são tidos como organizadores teciduais participando na fibrilogênese e estabilização mecânica do colágeno. Entretanto os perfis eletroforéticos foram diferentes entre as regiões tendíneas e principalmente entre os grupos. A região de tensão do tendão gastrocnêmio do grupo eletro-estimulado apresentou um grande aumento na concentração de proteínas solúveis, uma significativa diminuição do conteúdo de pequenos proteoglicanos e um aumento exacerbado na concentração dos glicosaminoglicanos. A proporção entre essas quantificações sugere degeneração no tendão, sendo caracterizada como tendinopatia crônica. Entretanto, o tipo de

glicosaminoglicano não foi alterado em nenhuma das regiões e grupos analisados, sendo o condroitim sulfato predominante nas duas regiões. Além das análises tendíneas, a diminuição do conteúdo de proteínas solúveis musculares também sugere degeneração no grupo eletroestimulado. Assim, a partir desse modelo experimental foi possível simular a tendinopatia crônica, a qual tem como característica bioquímica mais evidente uma alteração na concentração dos principais componentes da matriz extracelular.

INTRODUÇÃO

O movimento articular é causado pela transmissão da força da contração muscular ao osso através do tendão. As propriedades do tendão podem influenciar significativamente no comportamento do complexo músculo-tendíneo. O número de patologias relacionadas com a atividade física, incluindo as freqüentes injúrias por uso excessivo (*overuse*), envolve prioritariamente o tendão, mas também podem estar associadas a outros tecidos conjuntivos. Estudar o mecanismo de injúria nos tendões, e saber como eles são influenciados pelo nível de atividade física, irá prover um melhor tratamento e prevenção dessa patologia (Magnusson et al., 2003).

O comportamento do tendão depende de sua organização estrutural e composição bioquímica, assim como, sua localização e função. A remodelação tecidual ocorre durante o desuso, o exercício, a reparação de injúrias e a cicatrização (Hayashi, 1996). Injúrias e outras desordens tendíneas representam um diagnóstico habitual e um desafio terapêutico, uma vez que podem resultar em problemas crônicos (Jarvinen et al., 1997). O papel do *overuse* na patogênese de injúrias e desordens crônicas não é completamente entendido. Especula-se que quando o tendão é excessivamente estimulado, ocorre fadiga e a perda da habilidade da reparação basal (Archambault et al., 2001; Buchanan e Marsh, 2002). O processo de repetitivos microtraumas conduz a uma inabilidade irreversível das células tendíneas na reparação das fibras danificadas (Jarvinen et al., 1997; Noesberger e Eichenberger, 1997) por uma falência na adaptação entre a célula e a matriz extracelular (Selvanetti et al., 1997), que pode ser acompanhada por uma reação inflamatória asséptica (Kainberger et al., 1997). Essas considerações são importantes para o entendimento da relação entre estrutura e função, tendo implicações no desenvolvimento de tratamentos específicos para o tendão e mudanças de conduta clínica (Robinson et al., 2005).

Além do colágeno tipo I, outro constituinte importante do tendão são os proteoglicanos. Os proteoglicanos desempenham funções específicas e a concentração e o tipo dessas moléculas

variam em relação às diferentes forças que o tendão sofre (Kjær, 2004). Essas variações, de concentração e tipo, também são observadas durante o desenvolvimento, patologia e cicatrização, ou seja, todas as situações em que o ambiente mecânico é alterado (Robinson et al., 2005). Os proteoglicanos representam em torno de 1% dos constituintes do tendão (Vogel e Heinegård, 1985). Os pequenos proteoglicanos, que representam 80% do total de proteoglicanos presente nos tendões, pertencem à superfamília de proteínas ricas em leucina, sendo caracterizados por possuir pontes dissulfeto intracadeia. Neste grupo estão incluídos o fibromodulim e o decorim, sendo esse último o mais abundante (Ameye e Young, 2002). Os outros 20% são representados pelos grandes proteoglicanos versicam e agrecam, os quais estão presentes preferencialmente em regiões de compressão do tendão e em concentrações similares (Riley et al., 1994; Samiric et al., 2004a). Aos grandes proteoglicanos é atribuída a função de reter água provendo resistência à compressão (Vogel e Heinegård, 1985), enquanto os pequenos proteoglicanos atuam na fibrilogênese (Keene et al., 2000), regulando e organizando as interações das fibras de colágeno (Scott, 1995), a atividade celular (Culav et al., 1999) e as propriedades mecânicas do tendão (Robinson et al., 2005), facilitando o deslizamento entre as fibrilas de colágeno e minimizando o atrito de uma fibra contra outra (Scott 1988; Berenson et al., 1996). Apesar da similaridade estrutural, principalmente em relação à proteína central (Ameye e Young, 2002), esses proteoglicanos são significativamente diferentes em relação à regulação gênica, padrão de expressão e interação funcional (Ramamurthy et al., 1996). Especificamente os pequenos proteoglicanos podem modular a fibrilogênese dos colágenos tipo I e II. Entretanto, o fibromodulim e o decorim se ligam em locais distintos na fibra desses colágenos, não competindo com os mesmos sítios de ligação (Hocking et al., 1998). Além disso, o pico de expressão do fibromodulim é requerido durante a progressão do crescimento fibrilar sendo associada a estágios tardios do desenvolvimento tendíneo, enquanto que o decorim pode influenciar as interações moleculares do colágeno nos primeiros estágios de formação do tendão (Ezura et al., 2000). Esses

dados sugerem que o decorim tenha a função de regulação no diâmetro da fibrila de colágeno (Nakamura et al., 2000; Ker, 2002), influenciando na integração entre os componentes da matriz extracelular e na sua organização supramolecular através de interações com outras macromoléculas (Blaschke et al., 1996). O fibromodulim também participa na integração dos componentes da matriz, regulando o crescimento da fibra de colágeno, estabilizando as fibras no tecido já desenvolvido, privilegiando a integridade e função do tendão (Nurminskaya e Birk, 1996).

Além da cadeia protéica central, outro constituinte dos proteoglicanos são os glicosaminoglicanos, constituídos por cadeias de polissacarídeos (Scott, 1995). Nos tendões de frangos o decorim possui normalmente uma cadeia de condroitim sulfato (Yoon et al., 2003), entretanto em cartilagem de frangos foi descrita uma isoforma do decorim contendo duas cadeias de dermatam sulfato (Li et al., 1992; Blaschke et al., 1996). No fibromodulim existem quatro cadeias de queratam sulfato ligado à proteína central (Chakravarti, 2003). O agrecom possui aproximadamente 100 cadeias de condroitim sulfato e 30 cadeias de queratam sulfato ligadas a sua proteína central, enquanto que o versicam possui aproximadamente 30 cadeias de condroitim sulfato (Culav et al., 1999). Apesar da diferença quantitativa dos glicosaminoglicanos, os pequenos proteoglicanos possuem cadeias muito mais longas de glicosaminoglicanos do que os grandes proteoglicanos, entretanto a maior concentração de glicosaminoglicanos é característica de regiões que sofrem compressão (Vogel e Heinegård, 1985).

Pacientes com tendinopatia crônica são geralmente submetidos a prolongados tratamentos. A identificação das alterações na composição da matriz extracelular tendínea e sua relação com as propriedades biomecânicas desse tecido injuriado são as bases para se estabelecer condutas clínicas eficientes. Entretanto, estudos controlados envolvendo esses fatores são raros. Benevides e Gomes (artigo1) desenvolveram um modelo experimental de tendinopatia crônica o qual apresentou uma significativa fragilidade biomecânica. O objetivo do presente trabalho foi

analisar as alterações da composição da matriz extracelular, principalmente os proteoglicanos, de tendões submetidos a um protocolo de exercício que induz a tendinopatia crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais: Para os experimentos foram utilizados frangos da linhagem Pedrês (*Gallus domesticus*), adquiridos com 1 dia de idade. Após 4 semanas os animais foram randomicamente divididos em dois grupos: um eletro-estimulado (*E*) e o outro controle (*C*). Os dois grupos receberam o mesmo tipo de tratamento e ração e permaneceram confinados em gaiolas de 0,5m² (3 animais por gaiola) no biotério do Departamento de Biologia Celular – IB/UNICAMP.

2. Indução da tendinopatia crônica: O protocolo de *overuse* utilizado para induzir a tendinopatia crônica foi desenvolvido por Benevides e Gomes (artigo 1). A partir da quinta semana de vida o grupo *E* foi submetido a um protocolo de estimulação elétrica muscular que simula a etiologia da tendinopatia crônica. Esse protocolo durou 8 semanas, 5 sessões por semana, 1 sessão por dia com duração de 1h cada sessão. Antes do início de cada sessão os animais foram pesados, anestesiados por injeção intramuscular de ketamina (20mg/kg) e xilazina (4mg/kg) e os membros inferiores foram depenados. Posteriormente os animais foram colocados em pranchas côncavas e mantidos em decúbito dorsal com a fixação do quadril e do tórax com fitas de velcro. Eletrodos cutâneos com 1,3cm de diâmetro, untados com gel aquoso, para favorecer o contato elétrico, foram fixados aos membros inferiores posteriormente, nas regiões análogas às epífises da tibia (um eletrodo em cada extremidade do ventre do músculo gastrocnêmio lateral), utilizando fita crepe (Backman et al., 1990; Messner et al., 1999). O equipamento de estimulação muscular (ENDOPHASY-S-R-ET-9701 KLD[®]) foi calibrado para gerar uma corrente com frequência portadora de 2500Hz (retangular, simétrica, alternada e interrompida), modulada em 30Hz, com 50% de duração da fase da frequência de modulação (*duty cycle*). A contração muscular efetiva foi programada para durar 6s e a fase de repouso 3s. A

duração do estímulo elétrico na fase de contração muscular inclui 3s em uma rampa fixa, desta maneira em cada sessão ocorreram 300 ciclos de contração/repouso muscular. A intensidade da corrente foi ajustada até se obter uma tensão muscular classificada como grau “bom”, isto é, uma extensão completa do membro inferior contra resistência moderada (Kendall et al., 1995) e periodicamente reajustada devido à acomodação muscular a corrente elétrica.

3. Obtenção do material: Após o término de cada experimento (12 semanas de vida) os animais foram pesados, anestesiados com hidrato de cloral (0,3mg/kg) e sacrificados com 1mL de cloreto de potássio 4M, iv (Matsuda et al., 1986). Dos tendões dos músculos gastrocnêmio (*GT*) e flexores digitais superficiais (*ST*), isto é, os tendões dos músculos flexores *perforatus digiti* III e IV, (Figura 1a) foram analisadas duas regiões: *proximal* (*p*) que contorna a tróclea da tíbia e sofre forças de compressão além da tensão inerente a toda extensão do tendão e a região *distal* (*d*) que está sobre os dois terços distais posteriores do osso tarsometatarsal e sofre principalmente forças tensionais (Figura 1b) (Koch, 1973; Ghetie et al., 1981; King, 1981).

4. Extração dos constituintes da matriz extracelular: As amostras de cada região foram fragmentadas e tratadas separadamente com 25 volumes de cloridrato de guanidina (GuHCl) 4M em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,8, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 20mM, fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) 1mM. A extração durou 24h a 4°C sob agitação. O material obtido foi centrifugado a 39200g durante 20min a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para as análises bioquímicas (Heinegård e Sommarin, 1987).

5. Dosagem de proteínas solúveis: A dosagem de proteínas dos extratos totais tendíneos, das frações provenientes das cromatografias e dos extratos totais musculares foram realizadas pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como curva padrão. A leitura no espectrofotômetro foi em $\lambda = 596\text{nm}$.

6. Fracionamento e análise dos componentes da matriz extracelular: Os extratos das diferentes regiões dos tendões de ambos os grupos foram dialisados em tampão acetato de sódio

50mM, pH 6,0, contendo uréia 7M e posteriormente foram fracionados em coluna contendo Dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel) equilibrada com o mesmo tampão. As frações foram eluídas utilizando gradiente de cloreto de sódio de 0 a 1,5M. As frações foram coletadas e monitoradas no espectrofotômetro com absorbância em $\lambda = 280\text{nm}$. Aliquotas das frações foram analisadas em gel com gradiente de 4 a 16% de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), na presença de β -mercaptoetanol (Zingales, 1984). Padrões de peso molecular e de colágeno correram em paralelo às amostras. Para cada gel foi aplicado 30mA, posteriormente foram fixados com metanol 50% e ácido acético 12% e corados com Coomassie Blue (Evanko e Vogel, 1990).

As frações que continham os pequenos proteoglicanos, após análise em gel de SDS-PAGE, foram reunidas, dialisadas em tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,3, contendo 2M de GuHCl e submetidas à cromatografia utilizando Octyl-Sepharose CL-4B em tampão acetato de sódio descrito acima. A eluição das amostras foi realizada com gradiente de GuHCl de 2 a 6M em tampão acetato de sódio descrito acima. As amostras coletadas foram analisadas em SDS-PAGE.

7. Obtenção, quantificação e identificação dos glicosaminoglicanos sulfatados: Dos grupos experimentais foram obtidas amostras das diferentes regiões tendíneas as quais foram desidratadas com acetona por 24h, secadas a 37°C durante 24h e pesadas. Os glicosaminoglicanos foram obtidos após tratamento com papaína (40mg/g de tecido) em tampão citrato de sódio 30mM, pH 6,0, contendo EDTA 40mM e β -mercaptoetanol 80mM por 24h a 50°C . O material digerido foi centrifugado a 25700g por 20min. Ao sobrenadante foram adicionados dois volumes de etanol e mantido a 4°C por 24h. Após a centrifugação, ao precipitado foram adicionados dois volumes de etanol 80%. O material foi novamente centrifugado e o precipitado foi mantido em estufa a 37°C para secagem total e posteriormente ressuspendido em água destilada (Michelacci e Horton, 1989). A quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados foi determinada no

espectrofotômetro com $\lambda = 526\text{nm}$, pelo método de azul de dimetilmetileno (DMMB) utilizando condroitim sulfato (CS) para construir a curva padrão (Farndale et al., 1986).

Para identificação dos glicosaminoglicanos, amostras de 10 μL do material digerido e suspenso em água, foram incubadas por 6 horas a 37°C com 0,028 unidades de condroitinase ABC ou AC em tampão acetato de sódio 50mM, Tris-HCl 50mM e EDTA 100mM, pH 8,0 para a condroitinase ABC e pH 6,0 para condroitinase AC. Posteriormente as amostras foram precipitadas com etanol por 24 horas a 4°C, centrifugadas, ressuspendidas em 10 μL de água e analisadas em gel de agarose com padrões conhecidos de glicosaminoglicanos, CS, dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS). O tampão utilizado foi o propileno diamino 50mM, pH 9,0. Para cada gel foi aplicado 100mA. A seguir o gel foi fixado com Cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1% e corado com azul de toluidina 0,1% em etanol 50% e ácido acético 1% (Dietrich e Dietrich, 1976).

8. Quantificação das proteínas musculares: Foi baseado no protocolo proposto por Bär e Pette (1988), porém com algumas modificações. Os ventres musculares do gastrocnêmio e flexores digitais superficiais foram homogeneizados com Polytron (1g/7mL) por 5min a 4°C em tampão fosfato de potássio 0,15M, pH 6,5, contendo cloreto de potássio 0,3M, EDTA 10mM e PMSF 1mM. Os extratos foram centrifugados a 10000g por 15min, os sobrenadantes foram diluídos duas vezes com glicerol e a dosagem foi realizada pelo método de Bradford (1976).

9. Análise estatística: As diferentes dosagens das regiões tendíneas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney (*U-test*), baseado no BioEstat software (Ayres et al., 1998). Todos os testes foram realizados com 5% de nível de significância (Beiguelman, 1994).

RESULTADOS

A dosagem de proteínas solubilizadas em GuHCl (Tabela 1) indicou maior concentração em todas as regiões tendíneas do grupo eletro-estimulado com diferença significativa em relação

às mesmas regiões do grupo controle, sendo a maior diferença na região *Gtd*. A dosagem de proteínas (Tabela 1), realizada após a cromatografia das amostras, apontou maior concentração nas regiões tendíneas do grupo controle, com exceção da região *Std* onde o grupo eletroestimulado apresentou maior concentração, todas essas diferenças foram significativas, e mais uma vez a região *Gtd* apresentou a maior diferença. Na dosagem dos glicosaminoglicanos (Tabela 1) somente na região *Gtd* foi detectada diferença significativa, onde o grupo eletroestimulado apresentou maior concentração em relação ao grupo controle. Na dosagem das proteínas solúveis musculares (Tabela 1) o grupo controle apresentou maior concentração nos dois músculos analisados com diferenças significativas em relação ao grupo eletro-estimulado.

Nos géis de agarose (Figura 2) foi observada a presença predominante de CS em todas as regiões tendíneas independente do grupo de animais.

O extrato de cada região tendínea foi submetido à cromatografia de troca iônica e analisado em SDS-PAGE, como todos os géis apresentaram um perfil eletroforético muito semelhante foi escolhido a região *Gtd* de ambos os grupos de animais para representar esse primeiro estágio de purificação (Figura 3). Na maioria das frações de todos os géis foi detectada a presença das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ que compõe as moléculas de colágeno, também estavam presentes componentes massa molecular aparente (M_r) 126, 82, 74-68, 67, 60, 45-40, 32, 25, 23 e 18kDa, e a maioria dos componentes estava mais concentrada nos dois terços iniciais do gel. Visualmente é possível observar que as bandas do grupo controle são mais intensamente coradas em relação ao grupo eletro-estimulado. As frações que continham proteínas com M_r em torno de 60 e 70kDa foram reunidas, novamente purificadas e fracionadas em cromatografia de interação hidrofóbica e analisadas em SDS-PAGE (Figura 4). Todas as regiões tendíneas analisadas apresentaram componentes com o M_r de 60 e 70kDa. As bandas com 60kDa são nítidas, enquanto que o perfil eletroforético do componente com 70kDa é polidisperso. Nas regiões de compressão ocorreu um predomínio do componente com 70kDa, quando analisadas todas as frações eluídas das

cromatografias, já nas de tensão o componente com 60kDa aparece em mais frações. Uma característica marcante foi a presença concomitante desses dois componentes nas frações iniciais de todos os géis, entretanto, na região *Std* do grupo controle e principalmente em ambas as regiões do *GT* do grupo eletro-estimulado, o componente com 60kDa predominou quase que exclusivamente nas frações eluídas com maior concentração de GuHCl. Algumas frações também apresentaram componentes em torno de 40-45kDa.

DISCUSSÃO

Os fatores etiológicos do *overuse* tendíneo são caracterizados por freqüente oscilação de tensão enfocando a quantidade de ciclos do que propriamente a carga aplicada (Pike et al., 2000; Buchanan e Marsh, 2001). Nesse estudo, a fim de eliminar a interferência de cargas excedentes, isto é, o peso corpóreo e os movimentos heterotípicos, foram utilizados estimuladores elétricos para fornecer o controle da geração de força programado de modo cíclico. O padrão cíclico foi utilizado como uma representação realista da locomoção porque o estresse tendíneo é geralmente oscilatório durante a vida (Pike et al., 2000).

Os músculos flexores plantar de frangos foram eletro-estimulados, via eletrodos cutâneos, por um estimulador concebido prioritariamente à hipertrofia muscular e reabilitação do sistema músculo-esquelético. Entretanto, como previamente demonstrado por Benevides e Gomes (artigo 1), alterando os parâmetros desse estimulador, principalmente a razão entre tempo de contração e relaxamento e o número de ciclos por sessão, é possível induzir a tendinopatia crônica. A estimulação transcutânea foi utilizada, uma vez que é facilmente reproduzida, não invasiva, localizada e conveniente para repetidas sessões.

A modulação da freqüência média utilizada nesse estudo foi de 30Hz, uma vez que os músculos dos membros inferiores dos frangos possuem uma grande proporção de fibras musculares de contração lenta (Young et al., 2000) e a estimulação com 30Hz é mais efetiva

nesse tipo de fibra do que outras frequências (Goldspink et al., 1991; McDonough e Kitchen, 2003). Nos frangos, os músculos flexores digitais e o gastrocnêmio têm, respectivamente, a ação de promover a flexão plantar dos artelhos e estender o tarsometatarso (Koch, 1973; Ghetie et al., 1981; King, 1981).

A presença predominante do glicosaminoglicano CS foi observada em todas as regiões tendíneas, independente do grupo de animais. Portanto, não ocorreu modificação no tipo de glicosaminoglicano com a tendinopatia crônica. Nossos resultados estão de acordo com Yoon e colaboradores (2003) que analisaram tendões de galinhas que foram submetidos a um protocolo de exercício ativo e apresentaram a predominância do mesmo tipo de glicosaminoglicano. A alta afinidade da ligação do colágeno, com o pequeno proteoglicano, depende da sua proteína central. Entretanto as cadeias de glicosaminoglicanos podem prover ligações adicionais ao colágeno através de forças eletrostáticas (Blaschke et al., 1996). Essa interação com os glicosaminoglicanos pode influenciar a fibrilogênese (Scott, 1988), uma vez que as suas cadeias formam um arranjo antiparalelo com as cadeias de glicosaminoglicanos vizinhos de outros proteoglicanos estendendo essa rede para fibras de colágeno adjacentes (Culav et al., 1999). Assim, os pequenos proteoglicanos, tanto através da proteína central como pela cadeia de glicosaminoglicanos, afetam a interação entre as moléculas de colágeno e, portanto a formação e arranjo das fibrilas (Hedbom e Heinegård, 1989; Scott, 2003). Em condições fisiológicas normais, a manutenção das fibras de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas são reguladas e controladas através do equilíbrio entre síntese e degradação (Culav et al., 1999; Molloy et al., 2003). Os fatores de crescimento estão envolvidos na regulação da matriz extracelular (Kjær et al., 2006) estimulam os pequenos proteoglicanos promovendo a síntese e organização dos componentes da matriz extracelular (Iozzo, 1999; Molloy et al., 2003).

Durante a vida, danos tendíneos não sintomáticos é uma rotina e conseqüentemente, para manter a homeostase, a reparação deve ser contínua (Ker, 2002). A alteração desse equilíbrio

influencia a composição da matriz extracelular e a arquitetura tecidual, prejudicando o funcionamento tendíneo e suas propriedades mecânicas (Culav et al., 1999).

Uma vez injuriado, o reparo e remodelação do tendão são geralmente lentos ocorrendo formação de uma cicatriz fibrosa, sendo a composição dessa matriz provisória diferente de um tendão normal (Culav et al., 1999; Smith et al., 2002). O processo de cicatrização pode ser dividido em fases, nas quais são necessários à ocorrência de eventos bioquímicos sobrepostos (Lin et al., 2004); (i) Hemostase e inflamação, ocorrem após a injúria, com formação de hematoma ativando a cascata de vasodilatadores a plaquetas, assim como, a fagocitose e debridação do tecido necrosado, e o recrutamento de novos fibroblastos. Durante essa fase ocorre um aumento do conteúdo de DNA, fibronectina, glicosaminoglicanos, água e colágeno tipo III que irão formar e estabilizar a nova matriz extracelular. (ii) Proliferação e fibroplasia, nessa fase a matriz está desorganizada, principalmente em relação às fibras de colágeno, com predominância dos fibroblastos e um pequeno número de macrófagos e mastócitos. A atividade de síntese nos fibroblastos é aumentada e as concentrações de DNA e colágeno tipo III alcançam seus picos. Essas mudanças auxiliam na otimização da síntese do colágeno e uma gradual conversão do tipo III para o I. (iii) Remodelação e maturação, a síntese da matriz é diminuída, a proporção entre colágeno tipo III e I e suas ligações cruzadas retornam gradativamente aos níveis normais, assim como as concentrações de glicosaminoglicanos, água e DNA.

Durante o processo de reparação, a maior parte dos eventos fisiológicos envolve degradação, migração e síntese dos componentes da matriz extracelular tornando proeminente a maior atividade protéica em resposta à injúria (Ker, 2002; Lin et al., 2004). A concentração de proteínas solúveis foi maior em todas as regiões dos tendões eletro-estimulados, principalmente na região *GTD*, indicando possível atividade reparadora. O aumento da concentração protéica pode estar relacionado com o aumento do conteúdo de DNA em tendões degenerados indicando um aumento na celularidade (Gimbel et al., 2004; Riley et al., 1994). Entretanto, em um trabalho

realizado por Benevides e Gomes (artigo 1) no qual foram analisados esses mesmos tendões submetidos às mesmas condições, foi observado que não houve alteração no conteúdo de colágeno entre os dois grupos de animais. A relação entre o alto conteúdo protéico, observado aqui, e nenhum aumento na síntese de colágeno, observado anteriormente (Benevides e Gomes, artigo 1), sugere debilidade no processo de cicatrização e acusa um maior grau de injúria no *GT* pelo acúmulo de microtraumas (Ker, 2002; Lin et al., 2004). Além disto, a quantificação dos glicosaminoglicanos, que é realizada após o tratamento dos espécimes com papaína para a remoção de todas as proteínas, inclusive a maior parte da porção protéica dos proteoglicanos, apontou um maior conteúdo de glicosaminoglicanos apenas na região *GTd* do grupo eletroestimulado. Essas quantificações indicam que as outras regiões tendíneas estão na fase de remodelação tecidual, enquanto a região *GTd* ainda está na fase inflamatória, como relatada por Riley e colaboradores (1994) e Yamamoto e colaboradores (2002). A persistência desta fase está relacionada com a deficiência da atividade sintética dos componentes da matriz extracelular, o que é uma característica de tendinopatia causada por *overuse* (Riley et al., 1994; Cook et al., 2002).

Segundo Scott (1995; 2003) a maior concentração de glicosaminoglicanos teria como função “inflar” os espaços interfibrilares formando canais através dos quais pequenas moléculas solúveis em água poderiam se movimentar favorecendo o transporte nas células inflamatórias. Há duas hipóteses para a origem desses glicosaminoglicanos; uma delas sugere que com a intensa degradação protéica e reduzida atividade sintética, a maior concentração de glicosaminoglicanos seria proveniente da clivagem da proteína central dos pequenos proteoglicanos (Scott et al., 1995; Culav et al., 1999; Samiric et al., 2004a; 2004b), e a outra hipótese sugere que esses glicosaminoglicanos seriam produzidos durante a fase inflamatória do processo de cicatrização como ocorre, por exemplo, na osteoartrite (Riley et al., 1994). Entretanto, independente de sua origem, a formação de fibrocartilagem, em uma região ectópica, predispõe o tendão a um quadro

degenerativo, e a presença da alta concentração de glicosaminoglicanos pode ser indicador de estado patológico (Berenson et al., 1996), precedendo a ruptura tendínea e as subseqüentes manifestações clínicas provenientes das mudanças anatomopatológicas (Firth, 2006).

Todas as regiões analisadas apresentaram componentes com Mr em torno de 60 e 70kDa. Benevides e colaboradores (2004) identificaram a presença desses componentes com o mesmo perfil eletroforético em SDS-PAGE e demonstraram através do seqüenciamento da porção N-terminal, que esses componentes são os pequenos proteoglicanos; decorim, com Mr em torno de 70kDa (Ramamurthy et al., 1996) e fibromodulim, com 60kDa. O fibromodulim se apresenta como uma banda concentrada e com coloração bem acentuada (Berenson et al., 1996), enquanto o perfil eletroforético do decorim é mais polidisperso, como caracterizado por Vogel e Heinegård (1985). A natureza polidispersa pode ser devida à existência de isoformas do decorim (Blaschke et al., 1996) ou também pela diversidade de tamanho das cadeias dos glicosaminoglicanos (Vogel e Heinegård, 1985). Em todas as regiões de compressão ocorreu um predomínio do decorim, já nas de tensão o fibromodulim aparece em mais frações. Nas frações iniciais de todos os géis esses dois pequenos proteoglicanos estão presentes, entretanto, na região *Std* do grupo controle e principalmente em ambas as regiões do *GT* do grupo eletro-estimulado, o fibromodulim predominou quase que exclusivamente nas frações eluídas com maior concentração de GuHCl, como descrito por Benevides e colaboradores (2004). Algumas frações apresentaram componentes em torno de 40-45kDa provavelmente correspondentes à proteína central dos pequenos proteoglicanos (Ameye e Young, 2002; Yoon et al., 2004).

As frações contendo os pequenos proteoglicanos, após fracionamento em cromatografia de interação hidrofóbica, foram quantificadas e foi observada uma diminuição no conteúdo protéico da região *Gtd* do grupo eletro-estimulado. Alfredson e colaboradores (2003) relataram que em humanos com tendinopatia crônica, além da alta concentração de glicosaminoglicanos, ocorre uma diminuição acentuada do decorim, sendo duas vezes menor ou até menos ainda em

alguns casos, esses dois fatores associados sugerem características degenerativas. A região *GTd* do grupo eletro-estimulado apresentou uma concentração de proteínas, após as cromatografias, 2,5 vezes menor em relação ao controle, em contrapartida a região *STd* do grupo eletro-estimulado foi a única região que apresentou maior concentração em relação ao controle. Um aumento na concentração de pequenos proteoglicanos, principalmente decorim, associado com o aumento das fibras de colágeno recém sintetizadas, indica proliferação e atividade reparadora (Riley et al., 1994).

A integridade estrutural do tendão depende da habilidade dos fibroblastos responderem a uma injúria, repondo e mantendo a matriz do tendão (Riley et al., 1994). Essa diferença na resposta tecidual está relacionada com a magnitude do exercício, além das características inerentes a cada região tendínea, isto é, tensão e/ou compressão (Riley et al., 1994; Feitosa et al., 2002). O tendão *ST* é profundo em relação ao tendão *GT* (Koch, 1973; Ghetie et al., 1981; King, 1981), estando mais distante dos eletrodos os músculos *ST* recebem menor amperagem (McDonough and Kitchen, 2003), portanto geram contrações musculares com menor intensidade e, conseqüentemente, transmitem menor tração para o tendão, imprimindo menor tensão tecidual em relação à tensão sofrida pelo tendão *GT*. A contração excessiva muscular causa danos nas miofibrilas, alterando a concentração protéica intramuscular, resultando em uma persistente redução de força, edema e aumento da sensibilidade à dor (Endoh et al., 2005), em músculos debilitados a concentração de cadeias pesadas de miosinas diminui drasticamente (Kennedy et al., 1986). Na dosagem de proteínas musculares solúveis, que é um indicativo da concentração de miosinas (Bär e Pette, 1988), uma vez que elas são as proteínas mais abundantes nos músculos (Wackerhage e Rennie, 2006), foi notada uma redução na concentração em ambos os músculos eletro-estimulados, sinalizando lesão muscular. Segundo Wackerhage e Rennie (2006), o exercício tem profundos efeitos sobre o *turnover* protéico, durante e após a atividade física, e, tanto em roedores como em humanos, a intensa contração muscular diminui a síntese protéica e

ainda aumenta a sua degradação. Essa alteração protéica gera um significativo déficit de força que perdura por vários dias mesmo após a interrupção do protocolo injuriante (Cutlip et al., 2005).

Os resultados bioquímicos apresentados nesse artigo dão suporte aos achados biomecânicos prévios apresentados por Benevides e Gomes (artigo 1) que apontaram alterações significativas nas propriedades mecânicas de tendões com tendinopatia crônica. Com esses dados pode ser concluído que, a partir desse modelo experimental, a etiologia do *overuse* tendíneo foi alcançada, a natureza crônica dessa patologia produziu uma reparação tecidual insuficiente, com perda e alterações significativas dos componentes da matriz extracelular, conduzindo a uma ineficiente função do tendão. Desta forma, esse trabalho, além de identificar as alterações quantitativas dos principais componentes da matriz extracelular na tendinopatia crônica, descreve também o perfil eletroforético desses componentes em tendões de frangos. Assim esse estudo estabelece um modelo experimental que poderá ser utilizado para aplicações clínicas, como por exemplo, o desenvolvimento de novos tratamentos para tendinopatia crônica.

Agradecimentos

Muito obrigado ao Engenheiro Elétrico Glauco José Longo (KLD[®] Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, Amparo, SP, Brasil) por fornecer os equipamentos de estimulação elétrica muscular. Os frangos foram gentilmente cedidos pela Incubadora Paraíso (Itatiba, SP, Brasil). Obrigado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

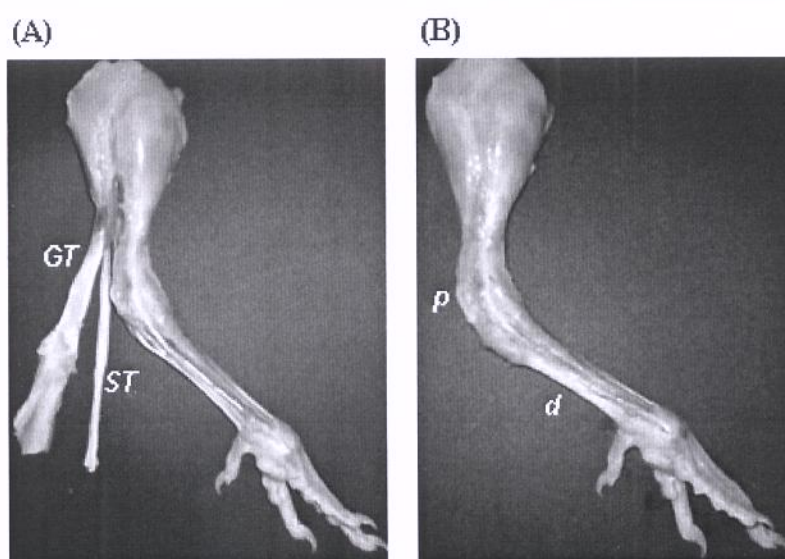


Figura 01. Situação anatômica do tendão do músculo gastrocnêmio (*GT*) e do tendão dos músculos flexores digitais superficiais (*ST*) (A). Localização das regiões *proximal* (*p*) e *distal* (*d*) dos tendões que foram analisadas bioquimicamente (B).

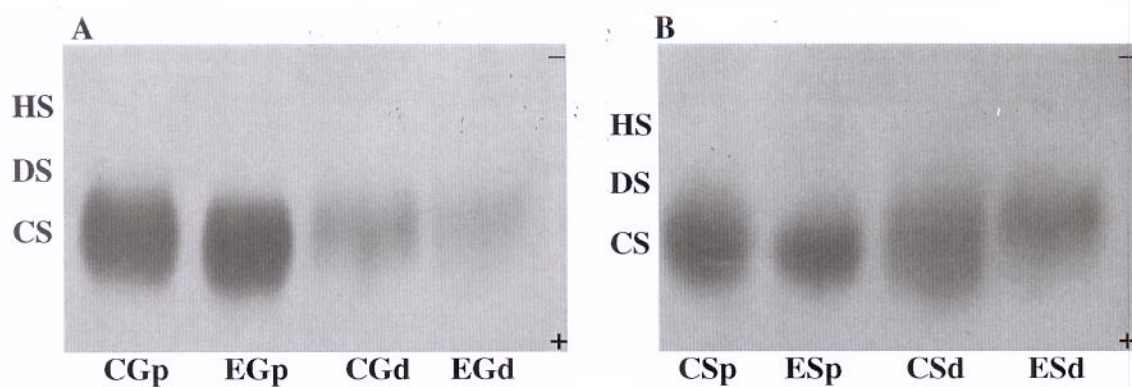


Figura 02. Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos obtido do tendão gastrocnêmio (A) e do flexor digital superficial (B). Todas as regiões tendíneas e grupo de animais apresentaram predominantemente condroitim sulfato. Padrão de heparam sulfato (HS), dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS) correram em paralelo com as amostras.

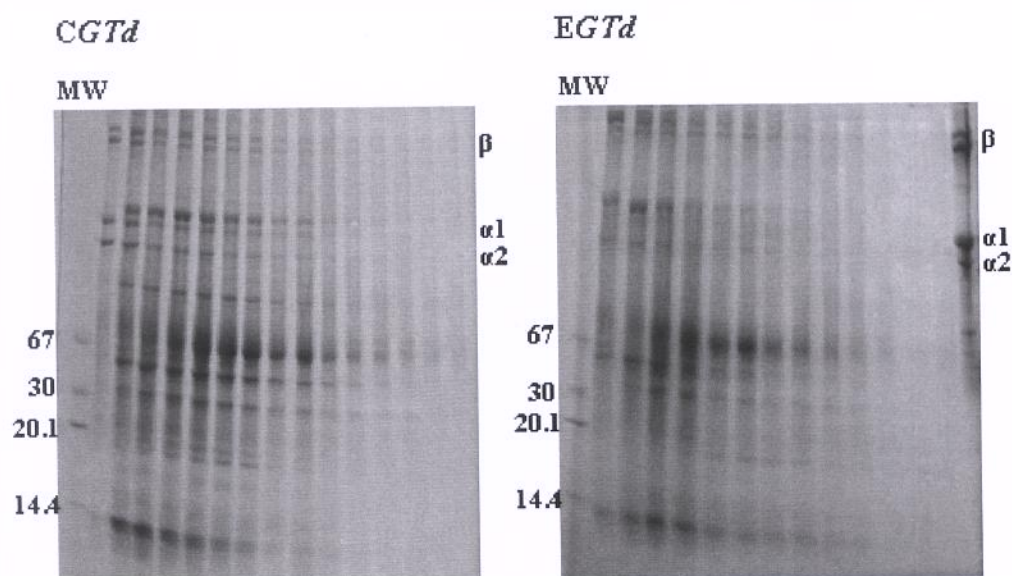


Figura 03. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS na presença de β -mercaptoetanol das frações provenientes da cromatografia de troca iônica das regiões *GTd* dos grupos controle (C) e eletro-estimulado (E). Na maioria das frações foi detectada a presença das cadeias que compõe as moléculas de colágeno β e α e componentes com Mr de 126, 82, 74-68, 67, 60, 45-40, 32, 25, 23 e 18kDa.

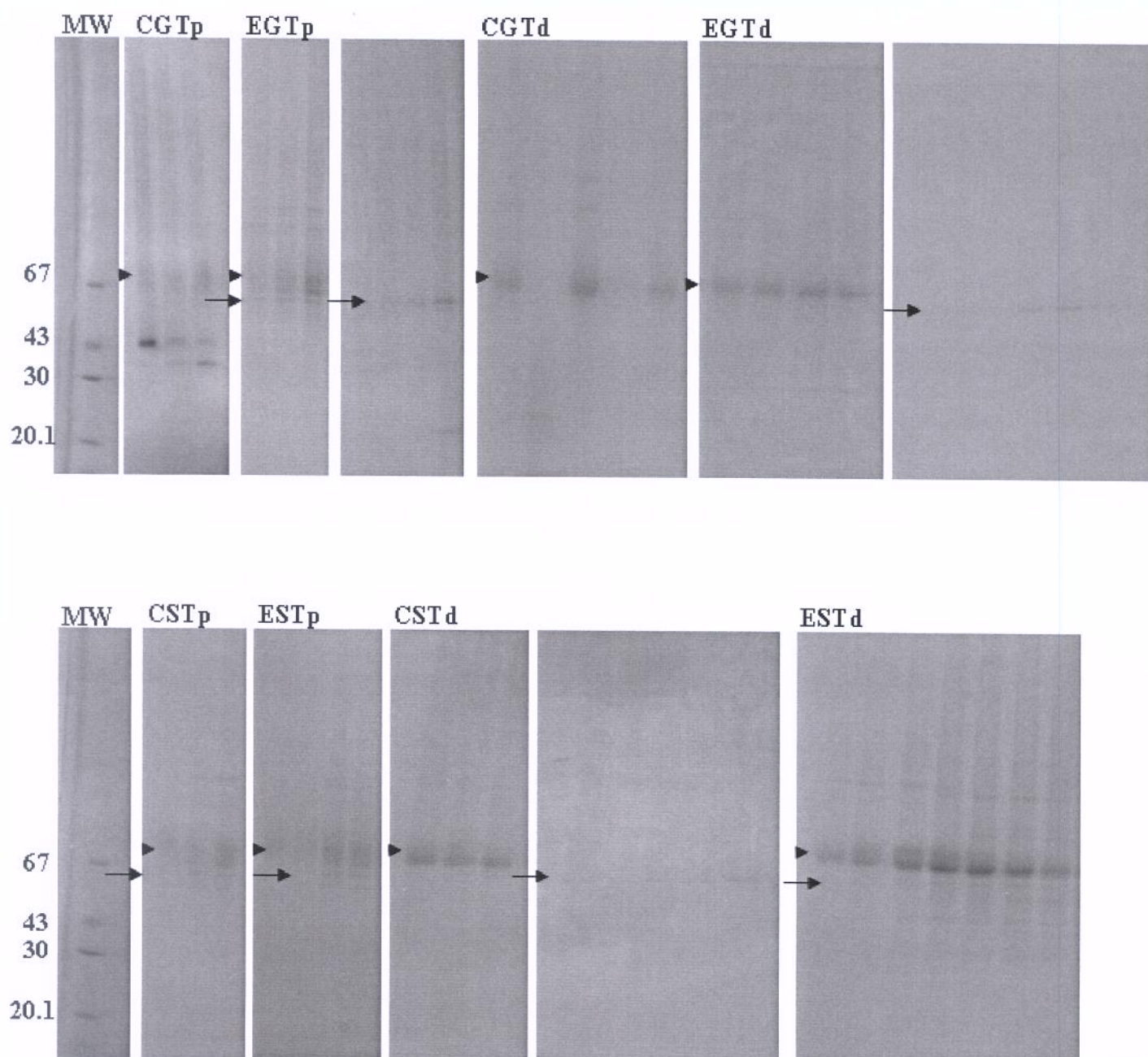


Figura 04. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS na presença de β -mercaptoetanol das frações provenientes da cromatografia de interação hidrofóbica. Todas as regiões contêm decorim (cabeça de seta), com apresentação polidispersa, e fibromodulim (seta), com bandas mais concentradas.

Tabela 1. Concentração em mg/g de tecido das proteínas solúveis em GuHCl, proteínas tendíneas pós cromatografias, glicosaminoglicanos sulfatados e proteínas solúveis musculares de cada região analisada, (*p*) proximal e (*d*) distal, do tendão gastrocnêmio (*GT*) e flexor digital superficial (*ST*), do grupos eletro-estimulado (*E*) e do controle (*C*).
(*) indica significância com $P < 0,05$.

Dosagem (mg/g)	grupos de animais	regiões anatômicas			
		<i>GT</i>		<i>ST</i>	
		<i>GTp</i>	<i>GTd</i>	<i>STp</i>	<i>STd</i>
proteínas solúveis tendíneas	<i>C</i>	17,75 ± 0,33	20,89 ± 0,37	16,57 ± 0,05	17,07 ± 0,10
	<i>E</i>	*21,14 ± 0,02	*24,59 ± 0,03	*18,46 ± 0,23	*20,08 ± 0,58
proteínas tendíneas pós cromatografias	<i>C</i>	*0,78 ± 0,02	*0,80 ± 0,02	*0,36 ± 0,01	0,47 ± 0,02
	<i>E</i>	0,63 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,23 ± 0,01	*0,61 ± 0,02
glicosaminoglicanos sulfatados	<i>C</i>	9,75 ± 0,10	1,77 ± 0,05	9,88 ± 0,02	2,74 ± 0,00
	<i>E</i>	9,17 ± 0,03	*3,21 ± 0,07	8,87 ± 0,20	2,21 ± 0,19
proteínas solúveis musculares	<i>C</i>	*49,75 ± 0,36		*51,04 ± 0,78	
	<i>E</i>	49,02 ± 0,02		45,83 ± 0,43	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfredson H, Lorentzon M, Bäckman S, Bäckman A, Lerner UH: cDNA-arrays and real-time quantitative PCR techniques in the investigation of chronic achilles tendinosis. *J Orthop Res* 2003;21:970-5.
- Ameye L, Young MF: Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 2002;12:107-16.
- Archambault JM, Hart DA, Herzog W: Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res* 2001;42:13-23.
- Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AS: *BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Manaus, AM, Brasil, Sociedade Civil Mamirauá, 1998.
- Backman C, Boquist L, Fridén J, Lorentzon R, Toolanen, G: Chronic achilles paratenonitis with tendinosis: an experimental model in the rabbit. *Orthop Res Soc* 1990;8:541-7.
- Bär A, Pette D: Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 1988;235:153-5.
- Beiguelman B: A análise da variância, in Duarte F.A.M. (ed): *Curso Prático de Bioestatística*, ed 3. Ribeirão Preto, SP, Brasil, Revista Brasileira de Genética, 1994, pp 153-81.
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Gomes L: Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res* 2004;45:206-15.
- Benevides GP, Gomes L: Effect of electrical muscle stimulation on the biomechanical properties of tendons. Artigo submetido/artigo 1.
- Berenson MC, Blevins FT, Plaas AHK, Vogel KG: Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res* 1996;14:518-25.
- Blaschke UK, Hedbom E, Bruckner P: Distinct isoforms of chicken decorin contain either one or two dermatan sulfate chains. *J Biol Chem* 1996; 271:30347-53.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Buchanan CI, Marsh RL: Effects of long-term exercise on the biomechanical properties of the Achilles tendon of guinea fowl. *J Appl Physiol* 2001;90:164-71.
- Buchanan CI, Marsh RL: Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:1101-7.
- Chakravarti S: Functions of lumican and fibromodulin: Lessons from knockout mice. *Glycoconjugate J* 2003;19:287-93.
- Cook JL, Khan KM, Purdam C: Achilles tendinopathy. *Manual Ther* 2002; 7:121-30.
- Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ: Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 1999;79:308-19.
- Cutlip RG, Geronilla KB, Baker BA: Impact of stretch-shortening cycle rest interval on *in vivo* muscle performance. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:1345-55.
- Dietrich CP, Dietrich SMC: Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffer. *Anal Biochem* 1976;70:645-7.
- Endoh T, Nakajima T, Sakamoto M, Komiyama T: Effects of muscle damage induced by eccentric exercise on muscle fatigue. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:1151-56.
- Evanko SP, Vogel KG: Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix* 1990;10:420-36.

- Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg Å, Chervoneva I, Birk DE: Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* 2000;151:779-87.
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ: Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem Biophys Acta* 1986;883:173-7.
- Feitosa VLC, Esquisatto MAM, Joazeiro PP, Gomes L, Felisbino SL, Pimentel ER: Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. *Cell Mol Biol* 2002;48:359-67.
- Firth E: The response of bone, articular cartilage and tendon to exercise in the horse. *J Anat* 2006; 208: 513-26.
- Ghetie V, Chitescu ST, Cotofan V, Hillebrand A (eds): *Atlas de anatomia de las aves domesticas*. Acribia-Paraninfo, Zaragoza and Madrid, 1981, pp 18-137.
- Gimbel JA, Van Kleunen JP, Mehta S, Perry SM, Williams GR, Soslowsky LJ: Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model. *J Biomech* 37;2004:739-49.
- Goldspink G, Scutt A, Martindale J, Jaenicke T, Turay L, Gerlach G-F: Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* 1991;19:368-73.
- Hayashi, K: Biomechanical studies of the remodeling of knee joint tendons and ligaments. *J Biomech* 1996;29:707-16.
- Hedbom E, Heinegård D: Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem* 1989;264:6898-905.
- Heinegård D, Sommarin Y: Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods Enzymol* 1987;144:319-72.
- Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ: Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 1998;17:1-19.
- Iozzo RV: The biology of the small leucine-rich proteoglycans, functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999;274:18843-6.
- Jarvinen M, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TLN, Kvist M, Leadbetter W: Histopathological finding in chronic tendon disorders. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7:86-95.
- Kainberger F, Mittermaier F, Seidl G, Parth E, Weinstabl R: Imaging of tendons - adaptation, degeneration, rupture. *Eur J Radiol* 1997;25:209-22.
- Keene DR, Antonio JDS, Mayne R, et al.: Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem* 2000;275:21801-4.
- Kendall FP, McCreary EK, Provance PG: *Músculos Provas e Funções*, ed 4. São Paulo, SP, Brasil, Editora Manole, 1995.
- Kennedy JM, Kamel S, Tambone WW, Vrbova G, Zak R: The expression of myosin heavy chain isoforms in normal and hypertrophied slow muscle. *J Cell Biol* 1986;103:977-83.
- Ker RF: The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:987-1000.
- King AS: Introdução às aves. In: Sisson, S., Grossman, D. (eds.), *Anatomia dos Animais Domésticos*, 1981, pp 1678-727.
- Kjær M: Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004;84:649-98.
- Kjær M, Magnusson P, Krogsaard M, et al.: Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J Anat* 2006;208:445-50.
- Koch T: Locomotion System, in Skold BH, DeVries L, (eds): *Anatomy of the chicken and domestic birds*. Ames, Iowa, USA, The Iowa State University Press, 1973, pp 6-60.

- Li W, Vergnes J, Cornuet PK, Hassell JR: cDNA clone to chick corneal chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan reveals identity to decorin. *Arch Biochem Biophys* 1992;296:190-7.
- Lin TW, Cardenas L, Soslowky LJ: Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 2004;37:865-77.
- Magnusson SP, Hansen P, Kjær M: Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13:211-23.
- Matsuda JJ, Zernicke RF, Vailas AC, Pedrini VA, Pedrini-Mille A, Maynard JA: Structural and mechanical adaptation of immature bone to strenuous exercise. *J Appl Physiol* 1986;60:2028-34.
- McDonough, S., Kitchen, S., 2003. Estimulação elétrica neuromuscular e muscular. In: Kitchen, S. (ed.), *Eletroterapia – Prática Baseada em Evidências*. São Paulo, Br., Manole, pp. 241-258.
- Messner K, Wei Y, Andersson B, Gillquist J: Rat model of Achilles tendon disorder. *Cells Tissues Organs* 1999;165:30-9.
- Michelacci YM, Horton DSPQ: Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp Biochem Physiol B -Biochem Mol Biol* 1989;92:651-8.
- Molloy T, Wang Y, Murrell GAC: The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;33:381-94.
- Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, et al.: Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis *in vivo*. *J Orthop Res* 2000;18:517-23.
- Noesberger B, Eichenberger AR: Overuse injures of the hip and snapping hip syndrome. *Oper Techn Sport Med* 1997;5:138-42.
- Nurminskaya MV, Birk DE: Differential expression of fibromodulin mRNA associated with tendon fibril growth: isolation and characterization of a chicken fibromodulin cDNA. *Biochem J* 1996;317:785-9.
- Pike AVL, Ker RF, Alexander RM: The development of fatigue quality in high- and low-stressed tendons of sheep (*Ovis aries*). *J Exp Biol* 2000;203:2187-93.
- Ramamurthy P, Hocking AM, McQuillan DJ: Recombinant decorin glycoforms purification and structure. *J Biol Chem* 1996;271:19578-84.
- Riley GP: Gene expression and matrix turnover in overuse and damaged tendons. *Scand J Med Sci Sports* 2005;15:241-51.
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL: Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendonitis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:367-76.
- Robinson PS, Huang T-F, Kazam E, Iozzo RV, Birk DE, Soslowky LJ: Influence of decorin and biglycan on mechanical properties of multiple tendons in knockout mice. *J Biomech Eng – Trans ASME* 2005;127:181-5.
- Samiric T, Ilic MZ, Handley CJ: Large aggregating and small leucine-rich proteoglycans are degraded by different pathways and at different rates in tendon. *Eur J Biochem* 2004a;271:3612-20.
- Samiric T, Ilic MZ, Handley CJ: Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. *Matrix Biol* 2004b;23:127-40.
- Scott JE: Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J* 1988;252:313-23.
- Scott JE: Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat* 1995;187:259-69.
- Scott JE: Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *J Physiol* 2003;553:335-43.
- Selvanetti A, Cipolla M, Puddu G: Overuse tendon injures: Basic science and classification. *Oper Techn Sport Med* 1997;5:110-7.

- Smith R KW, Birch HL, Goodman S, Heinegård D, Goodship AE: The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration - hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comp Biochem Physiol A* 2002;133:1039-50.
- Vogel KG, Heinegård D: Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* 1985;260:9298-306.
- Wackerhage H, Rennie MJ: How nutrition and exercise maintain the human musculoskeletal mass. *J Anat* 2006;208:451-8.
- Yamamoto E, Hata D, Kobayashi A, Ueda H, Tangkawattana P, Oikawa M, Takehana K: Effect of Beta-aminopropionitrile and Hyaluronic Acid on Repair of Collagenaseinduced Injury of the Rabbit Achilles Tendon. *J Comp Path* 2002;126:161-70.
- Yoon JH, Brooks Jr. RL, Zhao JZ, Isaacs D, Halper J: The effects of enrofloxacin on decorin and glycosaminoglycans in avian tendon cell cultures. *Arch Toxicol* 2004;78: 599-608.
- Yoon JH, Brooks R, Kim YH, Terada M, Halper J: Proteoglycans in chicken gastrocnemius tendons change with exercise. *Arch Biochem Biophys* 2003;412:279-86.
- Young RB, Bridge KY, Strietzel CJ: Effect of electrical stimulation on β -adrenergic receptor population and cyclic AMP production in chicken and rat skeletal muscle cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000;36:167-73.
- Zingales B: Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, in Morel CM, (ed): *Genes and antigens of parasites*. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 1984, pp 357-63.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os tendões do músculo gastrocnêmio e do flexor digital superficial de frangos são heterogêneos na composição bioquímica da matriz extracelular e essas diferenças são determinadas pela magnitude e tipo de força (tensão e/ou compressão) que age sobre as regiões tendíneas.
- Em relação aos aspectos bioquímicos e biomecânicos analisados, os tendões do músculo gastrocnêmio e do flexor digital superficial responderam de maneira diferente a um mesmo protocolo de estimulação elétrica muscular.
- Os protocolos alteraram de maneira diferente a composição colagênica e produziram distintos desempenhos biomecânicos em um mesmo tendão.
- Para o tendão do músculo gastrocnêmio o protocolo IV (aplicado 3 vezes por semana, 15 minutos de duração de cada sessão, tempo da contração e repouso muscular iniciando com 9 segundos e média de 31 contrações por sessão) possibilitou a maior força de resistência à carga mantendo as mesmas características viscoelásticas (tensão, deformação e módulo elástico) em relação ao grupo controle.
- Para o tendão do músculo gastrocnêmio o protocolo III (aplicado 5 vezes por semana, 60 minutos de duração de cada sessão, tempo da contração muscular de 6 segundos e de repouso muscular de 3 segundos e média de 300 contrações por sessão) resultou em tendinopatia crônica com evidentes modificações na composição da matriz extracelular e no comportamento biomecânico.
- Para o tendão do músculo flexor digital superficial nenhum dos protocolos aplicados foi deletério ao tecido, uma vez que a força de resistência à carga não diminuiu, entretanto o protocolo que mais aumentou a força de resistência foi o I (aplicado 5 vezes por semana, 60 minutos de duração de cada sessão, tempo da contração e repouso muscular de 6 segundos e

média de 240 contrações por sessão), porém a tensão e o módulo elástico aumentaram em relação ao grupo controle.

- Apesar do pequeno acréscimo do número de ciclos de contração por sessão do grupo III em relação ao I, ocorreram diferenças significativas na análise biomecânica do tendão gastrocnêmio (ver tabela 3A). Essas diferenças podem ser atribuídas ao tempo de repouso durante o ciclo de contração muscular. Embora a diferença de 3 segundos aparente ser ínfima em um ciclo, a diferença entre os grupos I e III no tempo de repouso acumulado em uma sessão foi de 540 segundos.
- A concentração de colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanos podem ser um indicativo do estado, patológico ou sadio, dos tendões.

ANEXO 1

Considerações sobre a estimulação elétrica muscular

A estimulação elétrica muscular foi escolhida para controlar a geração de força de tensão tendínea a fim de se evitar as interferências que ocorrem em outros tipos de exercício induzido, como por exemplo, na corrida ou natação. Nesses tipos de exercício o peso corpóreo pode influenciar na tensão tendínea e se o animal for quadrúpede o peso em cada pata e conseqüentemente a tração em cada tendão não serão iguais. Além, os movimentos heterotípicos podem ocorrer, como por exemplo, a variação no passo assim como no número de repetições do movimento desejado. Alguns parâmetros importantes para a realização do exercício físico, como a coordenação e amplitude do movimento articular, o número de contrações musculares, a relação entre o tempo de contração e relaxamento muscular e a magnitude da força de contração muscular podem ser determinados e mantidos constantes durante toda sessão de estimulação elétrica. Outros fatores primordiais para a escolha da estimulação elétrica foram: fácil reprodução, não invasivo, ação pontual em determinado grupo muscular e conveniente para repetidas aplicações. Além, o equipamento da KLD[®] não sofreu nenhuma modificação, ele saiu da fábrica como se fosse para ser utilizado em uma clínica de fisioterapia e os eletrodos cutâneos são do tipo facial de fácil aquisição.

ANEXO 2

Considerações sobre os anestésicos

A associação da ketamina com a xilazina foi realizada para se obter rápido efeito sedativo, anestésico e relaxamento muscular ao mesmo tempo. Esses anestésicos agem no sistema nervoso central evitando dor e reflexos musculares, os quais seriam inconvenientes para a estimulação muscular pela perda do contato elétrico entre o eletrodo e a pele do animal. A administração intramuscular foi eleita por conta do número de sessões que um mesmo animal teve que ser anestesiado. A via preferencial, e mais rentável, é a intravenosa, entretanto para não comprometer a integridade das pernas dos animais, as veias que poderiam ser utilizadas para a administração dos anestésicos eram as da asa, as quais são muito pequenas para repetidas aplicações. Apesar da via intramuscular exigir uma dose um pouco maior dos anestésicos, em relação à via intravenosa, uma única dose de ketamina (20mg/kg) e xilazina (4mg/kg) foi geralmente suficiente para manter o animal anestesiado por 1 hora.