

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

WILSON ROMERO NAKAGAKI

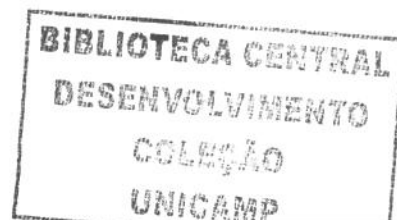
**“EFEITO DA IDADE E DO AMBIENTE DE CRIAÇÃO NA
BIOMECÂNICA E BIOQUÍMICA DE TENDÕES DE FRANGOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Wilson Romero Nakagaki
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes

Campinas, 2006



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TIVUNICAMP
	N145e
V	EX
TOMBO BCI	10218
PROC.	16.P.00123.06
C	DR
PREÇO	M.00
DATA	05/10/06
Nº CPD	

BIB ID. 388464

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

N145e

Nakagaki, Wilson Romero

Efeito da idade e do ambiente de criação na
biomecânica e bioquímica de tendões de frangos / Wilson
Romero Nakagaki. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Laurecir Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tendões. 2. Frangos. 3. Biomecânica. 4.
Exercício. 5. Idade. I. Gomes, Laurecir. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effect of age caged and penned environments on the biomechanics and
biochemistry of chicken tendons.

Palavras-chave em inglês: Tendons; Chickens; Biomechanics; Exercise; Age.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Laurecir Gomes, Edson Rosa Pimentel, Miguel Arcanjo Areas.

Data da defesa: 15/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 15 de Agosto de 2006.

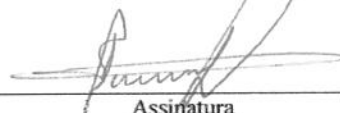
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laurecir Gomes (Orientadora)



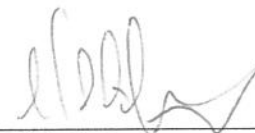
Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



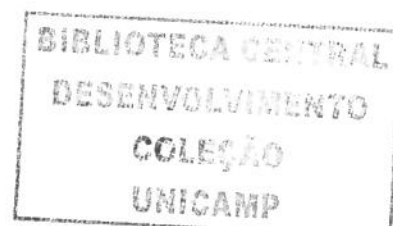
Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Assinatura

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Assinatura



Dedicatória

A Deus!

A minha família

Aos meus pais Wilson e Neide, minha irmã Paula e minha avó Rosa pelo amor, incentivo, confiança e dedicação que tiveram comigo em todas as fases de minha vida. Como foi difícil estar longe do amor e dos conselhos de vocês. Esta distância reforçou a importância que vocês têm em minha vida. Que Deus os abençoe!

A minha namorada

Carol, você mais uma vez me compreendeu e soube entender que esta experiência não seria prejudicial a nossa união. Pelo contrário, ela só nos trouxe coisas boas. Juntos tínhamos a certeza de que duas consequências seriam inevitáveis: o conhecimento e o fortalecimento de nosso sentimento. Conseguimos! Obrigado por me ajudar a realizar os meus sonhos. Amo você!

Aos meus tios

Henrique e Ruti, obrigado por apoiarem meus ideais e incentivarem meus estudos, sem esperar nada em troca. Tenho orgulho de vocês e fico feliz de tê-los em minha vida!

“O grande homem é aquele que não perde o coração de criança!”

(Mêncio)

Aos meus amigos

Tatiana, Fernanda, Flávia, Sheila, Taize, Adriano, Manuel e Alexandre.

“O que antes parecia distante, hoje é presente. As noites a fio que juntos assistimos passar e que pareciam infindáveis, agora somam o calendário do passado. E que sabor terão agora as noites do futuro? Sem dúvida terá o inconfundível gosto da saudade. Saudade do já vivido, do amigo ausente, das palavras que aos poucos vão querendo virar lágrimas. Mas a despedida muda de tom quando a certeza do reencontro permanece tão viva. Quando se percebe que sentir é muito mais honesto que se dizer que sente. Quando se acredita que adeus existe somente para os que querem dizer adeus. Quando se vê que nem sempre estar junto é estar perto, fica tudo mais simples e puro. É mais fácil acreditar que ninguém se vai, ou então que vamos todos juntos!”.

(Autor Desconhecido)

Amizade e saudades são pra quem sabe ter!

Agradecimento Especial

Professora Laurecir Gomes,

A primeira conversa que tivemos foi muito especial. Através dela você deu a oportunidade de eu realizar mais um sonho, de aumentar meus conhecimentos e de crescer e amadurecer como homem. Obrigado pela orientação, dedicação, amizade, preocupação, confiança e, também, por me ensinar a enxergar as coisas de uma maneira diferente. O dia a dia foi me mostrando suas qualidades e me fazendo compreender que são poucas as pessoas, assim como você, que desfrutam de grande saber e dedicação ao trabalho. Sem dúvida você foi muito importante para minha vida!

Agradecimentos

Ao Professor Edson Rosa Pimentel pela amizade, paciência, sugestões e ajuda à busca de respostas dos problemas encontrados neste trabalho. Sua educação e sabedoria são fantásticas!

A Liliam S. Panagio pela amizade, pela paciência, pelas conversas e pela ajuda nos momentos de sufoco. Somente uma pessoa muito especial como você para conseguir compreender as dúvidas e relembrar as obrigações dos alunos. Parabéns por sua competência!

À professora Shirlei Maria Recco Pimentel por me assistir sabiamente durante meu exame de qualificação. Sua gentileza e ensinamentos foram muito importantes.

À professora Maria Júlia Marques por manter alunos e professores informados de tudo que está vinculado ao Instituto de Biologia.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta pela ajuda na realização dos experimentos, pelas explicações e amizade.

Ao professor Miguel Arcanjo Areas por suas valiosas sugestões e por ter dedicado seu tempo para ler e corrigir meu trabalho.

Ao programa de pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural por ter me acolhido, dando-me a oportunidade de estudar e de entender e aprender o que é pesquisa.

Ao CNPq pela concessão de bolsa, a FAPESP pelo auxílio a pesquisa (2006/00044-4) e ao aviário Fazenda Aves do Paraíso (Itatiba, SP) por ter cedido os animais.

Índice

Resumo	9
Abstract	10
Introdução	11
Objetivos	20
Referências	21
Artigo I	27
Resumo	28
Introdução	29
Material e métodos	32
Resultados	35
Figura 1	38
Figura 2	39
Figura 3	43
Figura 4	44
Figura 5	46
Figura 6	47
Tabela 1	40
Tabela 2	41
Tabela 3	48
Tabela 4	48
Discussão	49
Referências	59
Artigo II	65
Resumo	66
Introdução	67
Material e métodos	70
Resultados	72
Figura 1	78
Figura 2	79
Figura 3	81
Figura 4	82
Tabela 1	75
Tabela 2	76
Tabela 3	83
Tabela 4	83
Discussão	84
Referências	91
Conclusões	96

Resumo

Os tendões transmitem forças de tração entre músculo e osso. Os efeitos dos estímulos mecânicos dependem da localização anatômica e níveis de atividade no tendão e da contração muscular. Além disto, em um mesmo tendão é possível observar a presença de regiões sob tensão e compressão. Diversos estudos têm relacionado alterações bioquímicas na matriz extracelular de tendões em função do exercício físico e da idade, porém há poucos trabalhos com tendões de frangos submetidos ou não ao exercício ativo não forçado. Neste trabalho foram analisados aspectos bioquímicos e biomecânicos do tendão calcâneo e do tendão flexor digital superficial de frangos com 1, 5 e 8 meses de idade, criados em gaiolas e em ambiente amplo. Os resultados de biomecânica mostraram que no tendão calcâneo o exercício aumentou a resistência à força de tração a partir do quinto mês, maior absorção de energia no oitavo mês, maior tensão no primeiro mês e maior rigidez no quinto mês. O exercício e a idade estimularam o aumento no conteúdo de colágeno no quinto mês. O exercício aumentou o conteúdo de glicosaminoglicanos no primeiro e oitavo mês e com o avanço da idade aumentou no oitavo mês na região de compressão e diminuiu progressivamente na região de tensão. Para o tendão flexor digital superficial, sinal de mineralização foi observado no quinto mês. Com a maturação, no grupo criado em ambiente amplo, a força (até o quinto mês) e a absorção de energia aumentaram, mas não houve alteração da rigidez, da tensão e da deformação. O exercício demonstrou que resistência à força, tensão e rigidez foram maiores no quinto mês. O conteúdo de colágeno aumentou com a idade do grupo amplo e aumentou com o exercício no quinto e oitavo meses. O conteúdo de glicosaminoglicanos diminuiu na região de tensão no oitavo mês no grupo amplo enquanto na região de compressão se manteve constante a partir do quinto mês. Com o exercício a quantidade de glicosaminoglicanos é substancialmente maior em SDFT jovens do que em maturos. Nossos resultados mostraram que o aumento da resistência do tendão, a maior capacidade em absorver energia e o maior conteúdo de colágeno são dependentes do próprio crescimento e maturação, mas também são influenciados pelo exercício ativo não forçado, indicando que a matriz extracelular é capaz de detectar alterações físicas, como andar e correr, e de transmitir esta informação para as células.

Abstract

The tendons transmit tensile strength between muscle and bone. The effects of the mechanical stimuli depend on the anatomical location and activity levels in the tendon and of the muscular contraction. Also, in a same tendon it is possible to observe the presence of regions under tension and compression. Several studies have related biochemical differences in the extracellular matrix of tendons in function of physical exercise and age, however there are few works with tendons of chickens submitted or not to the nonforced active exercise. In this work the biochemical and biomechanical aspects of the calcaneus tendon and the superficial digital flexor tendon from 1, 5 and 8 months old chickens, caged and penned raised were analyzed. For the calcaneus tendon the exercise increased the resistance to the load starting from the fifth month, larger absorption energy in the eighth month, larger stress in the first month and larger stiffness in the fifth month. The exercise and the age stimulated the increase in the collagen content in the fifth month. The exercise increased the glycosaminoglycans content in the first and eighth months and with the age it increased in the eighth month in the compression region and it decreased progressively in the tension region. For the superficial digital flexor tendon, mineralization was observed in the fifth month. With the maturation, in the penned group, the load (until the fifth month) and the absorption of energy increased, but there was not change in the stiffness, stress and strain. The exercise demonstrated that load, stress and stiffness were greater in the fifth month. The collagen content increased with the age on the penned group and with the exercise in the fifth and eighth months. The glycosaminoglycans content decreased in the tension region in the eighth month in the penned group while in the compression region it remained constant starting from the fifth month. With the exercise the glycosaminoglycans expression is substantially larger in young SDFT than in mature ones. Our results demonstrated that the raise in the tendon resistance, the larger capacity in energy absorption and the largest collagen content depend on the own growth and maturation, and they're also influenced by the nonforced active exercise, indicating that the extracellular matrix is able to detect physical alterations, like walk and run, and transmit this information to the cells.

Introdução

O tendão é uma forma especializada de tecido conjuntivo fibroso denso, consistindo de fibras colagênicas altamente orientadas que transmitem a força mecânica da contração muscular ao osso (Kannus, 2000). Quando saudáveis, os tendões apresentam textura fibroelástica, demonstrando grande resistência às cargas mecânicas (Józsa and Kannus, 1997) tendo capacidade de retornar a sua forma original após ser tracionado (Hayem, 2001).

O tendão é formado por uma bainha sinovial, na qual ele desliza durante o seu trajeto, diminuindo o atrito contra os acidentes ósseos e tecidos adjacentes. Em tendões que não apresentam uma bainha sinovial verdadeira pode existir uma outra estrutura com a mesma função, dita bainha paratendinosa ou paratenônio (Benjamin and Ralphs, 2000; Kannus, 2000). Sob o paratenônio, o tendão está circundado por uma fina bainha de tecido conjuntivo, o epitenônio. Mais internamente, o endotenônio reveste e liga cada feixe de fibra terciário de tendão, assim como cada feixe de fibra secundário (ou fascículo) e primário (ou sub-fascículo). Cada sub-fascículo é formado por um conjunto de fibras, sendo que esse conjunto é composto por um feixe de fibrilas (Kannus, 2000), sendo a fibrila considerada como a unidade básica de transmissão de força do tendão (Magnusson et al., 2003).

Os constituintes do tendão são células (tenócitos e tenoblastos), colágeno, proteoglicanos e proteínas não colagênicas (Kannus, 2000; Silver et al., 2003). Os tenoblastos e tenócitos, que são formas especializadas de fibroblastos e fibrócitos respectivamente, estão localizados entre as fibras de colágeno e são responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular dos tendões (Kannus, 2000; Hayem, 2001). Estas células compõem cerca de 90-95% dos elementos celulares do tendão, sendo que os outros 5-10% incluem os condrócitos nos locais de compressão

e inserção, as células sinoviais da bainha e as células vasculares no endotenônio e no paratenônio (Kannus, 2000). Análise estrutural tem mostrado que os tenoblastos são caracterizados pela presença de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, ribossomos livres e numerosas vesículas periféricas (Redaelli et al., 2003). Essas organelas são observadas em grande quantidade no início do desenvolvimento dos animais e se tornam menos proeminentes com o avanço da idade (Benjamin and Ralphs, 2000; Esquisatto et al., 2003). O colágeno é o principal componente nos tendões e varia entre 60-85% do peso seco, sendo que concentrações de elastina e de proteoglicanos correspondem de 1 a 2% e de 1%, respectivamente (Józsa and Kannus, 1997; Kjaer, 2004). A baixa concentração de elastina é responsável pela baixa elasticidade do tendão; caso contrário, o alongamento seria excessivo com a contração muscular, ao invés de transmitir a força ao osso, impossibilitando o movimento (Hall and Brody, 2001). Durante o envelhecimento ocorrem mudanças quantitativas e qualitativas nos componentes da matriz nos tecidos, devendo ser levada em consideração quando se decide pela prática ou não de atividades físicas (Józsa and Kannus, 1997).

O colágeno é composto por três cadeias de polipeptídeos que formam uma estrutura em tripla hélice possuindo cada cadeia a sequência repetitiva Gly-X-Y, sendo que X e Y podem ser qualquer aminoácido, embora freqüentemente sejam a prolina e a hidroxiprolina (Gelse et al., 2003). Atualmente são descritos vinte e três tipos de colágeno estruturalmente distintos (Gordon et al., 2000).

O tendão é composto predominantemente de colágeno tipo I, que corresponde a 60% do peso seco, e pequenas quantidades dos tipos III e V (Kjaer, 2004). A composição da fibrila quanto ao tipo e conteúdo de colágeno e proteoglicanos pode variar podendo influenciar em suas

propriedades mecânicas (Silver et al., 2003), na regulação do diâmetro das fibrilas (Birk and Mayne, 1997) e na formação da fibrila (Dressler et al., 2002).

A água presente no tendão está em grande parte associada aos proteoglicanos (Kjaer, 2004), que são grandes moléculas hidrofílicas, compostas por uma proteína central na qual estão covalentemente ligados uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos, que são açúcares sulfatados (Provenzano and Vanderby Jr., 2006). Nos tendões estão presentes os grandes proteoglicanos, representados pelo agregam e versicam (Evanko and Vogel, 1990), assim como os pequenos proteoglicanos ricos em leucina como o decorim, lumican e fibromodulin (Provenzano and Vanderby Jr., 2006). Segundo McCormick (1999), os pequenos proteoglicanos limitam o crescimento da fibrila de colágeno, direcionando o remodelamento do tendão em resposta às forças de tensão. Os proteoglicanos interagem com o colágeno, aumentando a capacidade do tecido de resistir às forças de compressão e de tensão (Kannus, 2000; Silver et al., 2003). Os proteoglicanos presentes no tendão participam da fibrilogênese do colágeno, influenciando na formação e tamanho das fibrilas (Provenzano and Vanderby Jr., 2006), sendo esta fibrilogênese reduzida com o envelhecimento (Silver et al., 2003).

Em um mesmo tendão é possível observar a presença de regiões sob tensão e tensão/compressão. Quando os tendões mudam de direção e contornam uma extremidade óssea ou uma articulação, é desenvolvida uma região de fibrocartilagem, ocorrendo assim uma resposta adaptativa que protege os tendões de pressões potencialmente prejudiciais, estimulando a síntese de colágeno tipo II e de proteoglicanos (Benjamin and Ralphs, 2004), como agregam e versicam, conferindo resistência ao tecido (Vogel et al., 1994). Estão presentes os pequenos proteoglicanos, como decorim, fibromodulin e biglican, que correspondem a 90% do total de proteoglicanos (Carvalho, 1995).

O comportamento dos tecidos biológicos em resposta ao *stress* mecânico é classicamente representado através de um gráfico em que é plotada a magnitude da força aplicada sobre o material em relação ao deslocamento apresentado (Engles, 2001). A curva força-deslocamento pode ser transformada em curva tensão-deformação, dividindo a força pela área de secção transversa do tendão, e a variação no comprimento pelo comprimento original. Esse procedimento permite comparar a resposta dos tendões à aplicação de carga através da normalização das discrepâncias em relação à forma e tamanho (Nordin et al., 2001).

Durante um ensaio mecânico a tração nos espécimes é capaz de provocar uma deformação e alterar a forma do *crimp* das fibras de colágeno. *Crimp* é uma característica morfofuncional presente no tendão, com arranjos regulares e sinuosos das fibras de colágeno (Gathercole and Keller, 1991) que permitem ao tendão reduzir o impacto de uma força de tração sobre o osso onde o tendão se insere (O'Brien, 1997; Kannus, 2000). A deformação do *crimp* corresponde a *toe region*, ou região inicial, da curva de tensão-deformação que pode ser dividida em regiões devido ao comportamento viscoelástico do tendão. O *crimp* é facilmente estendido, retificado em relação ao eixo de tração, sendo que pequenas forças são capazes de produzir grandes deformações. Assim, durante a deformação do tendão as forças atuantes dentro desta região reduzem o ângulo do *crimp* sem exceder o limite elástico do tendão. A continuação da aplicação de forças de tração leva à região intermediária (região linear) que possui maior rigidez do que a anterior sendo resultante da maior resistência ao alongamento das fibras retificadas. Nesta região a quantidade de *stress* sofrido está linearmente relacionada com a deformação (Woo et al., 1999) e no ponto final desta região algumas fibras começam a falhar. A deformação além da região linear conduz à região final, ou *yield and failure region*, aonde se acentuam as falhas das fibras

de uma maneira desordenada, podendo ocorrer ruptura completa do tendão (Maganaris et al., 2004).

A inclinação da curva tensão-deformação na região linear corresponde ao módulo elástico, ou de Young ou de elasticidade, do tendão e representa a rigidez do tendão, que está diretamente relacionada à resistência do tecido à deformação (McGinnis, 1999; Nordin et al., 2001). Quanto maior for o módulo elástico mais rígido é o tecido (Öskaya and Leger, 2001).

Vários fatores afetam as forças mecânicas nos tendões durante a locomoção normal como: os diferentes níveis de cargas mecânicas para diferentes tendões (Maganaris and Paul, 2002), o nível de contração muscular e o tamanho relativo do músculo influenciam as forças mecânicas em um tendão (Kellis, 1998) e as diferentes atividades induzem diferentes níveis de força até em um mesmo tendão (Malaviya et al., 1998).

Além do estado de ativação muscular, a velocidade da aplicação de carga é capaz de influenciar a resposta dos tecidos ao *stress* mecânico (Engles, 2001). Em ligamento cruzado anterior de macacos foi observado que o comportamento dos tecidos foi modificado com o aumento ou diminuição da velocidade com que a força externa é aplicada (Noyes and Grood, 1976).

O trabalho realizado para alongar o tendão é armazenado como energia de deformação (Maganaris et al., 2004), sendo que o armazenamento deste tipo de energia em tendões de pernas e pés de muitos animais é um mecanismo importante que economiza quantidades substanciais de energia muscular durante a locomoção (Alexander, 1981). Em animais, durante uma caminhada normal, o corpo é desacelerado assim que o pé toca o solo, fazendo com a energia cinética seja armazenada como energia elástica de deformação em músculos e tendões pelo impacto com o solo. O recuo elástico, primariamente pelos tendões, converte a maior parte da energia

armazenada de volta a energia cinética no momento que o pé sai do solo (Alexander, 1981). Segundo Shadwick (1990) a capacidade de armazenar energia em tendões é influenciada pela idade.

Alguns estudos têm mostrado que o envelhecimento pode tornar os tendões mais fortes, rígidos e resilientes (Shadwick, 1990; Johnson et al., 1994), enquanto outros têm contestado estes resultados (Vogel, 1983; Blevins et al., 1994). Esta discordância de resultados se deve a consideração do que é jovem em um determinado estudo, isto é, o grupo com menos idade em um estudo pode não corresponder à mesma fase de desenvolvimento de um outro estudo, podendo, por exemplo, demonstrar o efeito do desenvolvimento e maturação biológico em vez do envelhecimento (Maganaris et al., 2004).

As características estruturais dos tendões estão relacionadas com a matriz extracelular fibrosa, e muitos eventos associados com a idade destas estruturas estão vinculados à molécula de colágeno. Durante o envelhecimento ocorrem modificações nos tendões como enrijecimento, redução da resistência às forças de tração além de modificações nas ligações cruzadas, intra e interfibrilares, presentes no colágeno (Józsa and Kannus, 1997). Em coelhos velhos, dependendo do tendão, foi observado aumento no diâmetro das fibrilas de colágeno (Nakagawa et al., 1994; Kjaer, 2004) assim como o *turnover*, além de diminuição nos conteúdos de glicosaminoglicanos, água e elastina e ocorrência de calcificação (Ippolito et al., 1980). Em tendões bovinos foram descritas variações no conteúdo de colágeno e de proteoglicanos em regiões de compressão e tensão com o envelhecimento (Rees et al., 2000)

Semelhante a muitos tecidos, durante sua maturação e envelhecimento, os tendões sofrem um processo adaptativo em resposta às demandas mecânicas corporais e outras forças externas (Landis and Silver, 2002). Muitos estudos têm demonstrado que o tendão gastrocnêmio de perus

(Siperko and Landis, 2001; Landis and Silver, 2002) e flexores digitais de frangos (Abdalla, 1979) normalmente se mineralizam durante a maturação e envelhecimento do animal. A calcificação em tendões humanos está associada a condições patológicas enquanto que em aves é parte do desenvolvimento fisiológico dos tendões (Jósza and Kannus, 1997). A calcificação parece envolver a nucleação e deposição de mineral em associação com as superfícies da estrutura do colágeno (Landis and Silver, 2002). Ono and Nemoto (2005) observaram a existência de duas formas de deposição mineral em tendões de galinhas, sugerindo que uma das formas de mineralização é colágeno-dependente enquanto que a outra não. Observações morfológicas indicam que a mineralização ocorre nas proximidades do centro do tendão (Siperko and Landis, 2001), onde se observa a presença de vesículas contendo hidroxiapatita (Landis and Silver, 2002).

O processo de envelhecimento proporciona uma redução metabólica e morfofuncional do sistema músculo-esquelético, enquanto o desuso e a inatividade causam atrofia e diminuição da resistência de tendões e ligamentos (Stone, 1988). No entanto, o exercício físico pode influenciar a estrutura, composição química e propriedades mecânicas do tendão durante seu desenvolvimento e maturação (Curwin et al., 1994; Cherdchutham et al., 2001) e envelhecimento (Nielsen et al., 1998; Dressler et al., 2002).

O exercício físico promove efeitos locais e sistêmicos nos tecidos (Viidik et al., 1996). As variações na intensidade e programas de exercícios induzem mudanças na circulação hormonal que podem alterar o metabolismo dos componentes da matriz extracelular dos tendões (Curwin et al., 1988; Yoon et al., 2003). Paralelamente, estudos têm mostrado que a limitação ou não da prática de atividade física ativa espontânea e da área de deambulação parecem influenciar nas

características mecânicas e bioquímicas do tendão de ratos (Barfred, 1971), de cavalos (Cherdchutham et al., 2001) e de frangos (Benevides et al., 2004).

Estudos sobre as alterações mecânicas do tendão como resposta ao treinamento de resistência sugerem que ocorre um aumento na força de tensão e rigidez (Buchanan and Marsh, 2002). Woo e colaboradores (1980) estudaram tendões extensores de suínos treinados, e observaram um aumento no peso do tendão, assim como no conteúdo de colágeno. Por outro lado, aliado ou não ao exercício físico o processo de envelhecimento também torna os tendões mais rígidos e com a capacidade de deformação diminuída (Nielsen et al., 1998), enquanto que tendões imaturos podem responder ao exercício diferentemente dos maduros (Buchanan and Marsh, 2002).

Com os dados obtidos na literatura pôde ser observado que os tendões demonstram capacidade de remodelamento como resposta ao exercício (Buchanan and Marsh, 2002), como também alterações bioquímicas que envolvem as células e a matriz extracelular com o avanço da idade (Ippolito et al., 1980). Qualquer alteração na associação ordenada dos componentes da matriz como resposta ao *stress* mecânico e à idade expõe a célula a um desequilíbrio de forças (Vidal, 1993), ativando mecanismos eletroquímicos que monitoram a matriz (Gillard et al., 1979).

Diversos estudos têm relacionado diferenças bioquímicas na matriz extracelular de tendões em função de programas de treinamento de força e de resistência bem como seu remodelamento com o avanço da idade, porém há poucas informações sobre tendões de aves confinadas e com movimentação espontânea durante o processo de envelhecimento. Deste modo a investigação de tendões de frangos durante o processo de desenvolvimento e maturação associado aos efeitos da prática ou não de exercícios espontâneos, como correr e ciscar, oferece

um excelente modelo biológico para o estudo de suas adaptações funcionais, biomecânicas e bioquímicas.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Analisar as propriedades biomecânicas do tendão calcâneo e do tendão flexor digital superficial em função da idade e do ambiente de criação;
- Quantificar o conteúdo de colágeno e de glicosaminoglicanos presente nas regiões de tensão e de compressão do tendão calcâneo e do tendão flexor digital superficial em função da idade e do ambiente de criação.

Referências

- Abdalla, O., 1979. Ossification and mineralization in the tendons of the chicken (*Gallus Domesticus*). *J. Anat.* 129, 351-359.
- Alexander, R. McN., 1981. Mechanisms of skeleton and tendons. In: *Handbook of Physiology*, section A, *The Nervous System* ed. Brooks B., American Physiological Society, Bethesda, vol 2, pp. 17-42.
- Barfred, T., 1971. Experimental rupture of the Achilles tendon. Comparison of experimental ruptures in rats of different ages and living under different conditions. *Acta Orthop. Scand.* 42, 406-422.
- Benevides, G.P., Pimentel, E.R., Toyama, M.H., Novello, J.C., Marangoni, S., Gomes, L., 2004. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect. Tissue Res.* 45, 206-15.
- Benjamin, M., Ralphs, J.R., 2000. The cell and development biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.* 196, 85-130.
- Benjamin, M., Ralphs, J.R., 2004. Biology of fibrocartilage cells. *Int. Rev. Cytol.* 233, 1-45.
- Birk, D.E., Mayne, R., 1997. Localization of collagen types I, III and V during tendon development. *Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter.* *Eur. J. Cell Biol.* 72, 352-361.
- Blevins, F.T., Hecker, A.T., Bigler, G.T., Boland, A.L., Hayes, W.C., 1994. The effects of donor age and strain rate on the biomechanical properties of bone-patellar tendon-bone allografts. *Am. J. Sports Med.* 22, 328-333.
- Buchanan, C.I., Marsh, R.L., 2002. Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133, 1101-1107.

- Carvalho, H.F., 1995. Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. *J. Theor. Biol.* 172, 293-297.
- Cherdchutham, W., Meershoek, L.S., van Weeren, P.R., Barneveld, A., 2001. Effects of exercise on biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon in foals. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1859-1864.
- Curwin, S.L., Vailas, A.C., Wood, J., 1988. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* 65, 2297-2301.
- Curwin, S.L., Roy, R.R., Vailas, A.C., 1994. Regional and age variations in growing tendon. *J. Morphol.* 221, 309-320.
- Dressler, M.R., Butler, D.L., Wenstrup, R., Awad, H.A., Smith, F., Boivin, G.P., 2002. A potential mechanism for age-related declines in patellar tendon biomechanics. *J. Orthop. Res.* 20, 1315-1322.
- Engles, M. Tissue response. In Donatelli, R.A., Wooden, M.J. 2001. *Orthopaedic Physical Therapy*. 3rd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone. Cap1, p.1-24.
- Esquisatto, M.A.M., Joazeiro, P.P., Pimentel, E.R., Gomes, L., 2003. Ultrastructural characteristics of tensional regions and tendons from rats of different ages. *Braz. J. Morphol. Sci.* 20, 109-114.
- Evanko, S.P., Vogel, K.G., 1990. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix*, 10, 420-436.
- Gathercole, L.J., Keller, A., 1991. Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix*. 11, 214-234.
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T., 2003. Collagens – structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55, 1531-1546.
- Gillard, G.C., Reilly, H.C., Bell-Booth, P.G., Flint, M.H., 1979. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycans content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect. Tissue Res.* 7, 37-46.

- Gordon, M. K., Gerecke, D. R., Hahn, R. A., Bhatt, P., Goyal, M., Koch, M., 2000. Cloning of a new collagen, type XXIII, expressed in cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41, 3997.
- Hall, C.M., Brody, L.T., 2001. *Exercício Terapêutico na Busca da Função*, 1st ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, R.J.
- Hayem, G., 2001. Tenology, a new frontier. *Joint Bone Spine* 68, 19-25.
- Ippolito, E., Natali, P.G., Postacchini, F., Accinni, L., Martino, C., 1980. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J. Bone Joint Surg. Am.* 62A, 583-598.
- Johnson, G.A., Tramaglini, D.M., Levine, R.E., Ohno, K., Choi, N.Y., Woo, S.L-Y., 1994. The tensile and viscoelastic properties of human patellar tendon. *J. Orthop. Res.* 12, 796-803.
- Józsa, L.G., Kannus, P., 1997. *Human tendons. Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaigne, IL. Human Kinetics.
- Kannus, P., 2000. Structure of tendon connective tissue. *Scand. J Med. Sci. Sports* 10, 312-320.
- Kellis, E., 1998. Quantification of quadriceps and hamstring antagonist activity. *Sports Med.* 25, 37-62.
- Kjaer, M., 2004. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.* 84, 649-698.
- Landis, W.J., Silver, F.H., 2002. The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133, 1135-1157.
- Maganaris, C.N., Paul, J.P., 2002. Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon. *J. Biomech.* 35, 1639-1646.
- Maganaris, C.N., Narici, M.C., Almekinders, L.C., Maffulli, N., 2004. Biomechanics and pathophysiology of overuse tendon injuries. *Sports Med.* 34, 1005-1017.

- Magnusson, S. P., Hansen, P., Kjaer, M., 2003. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 13, 211-223.
- Malaviya, P., Butler, D.L., Korvick, D.L., Proch, F.S., 1998. In vivo tendon forces correlate with activity level and remain bounded: evidence in a rabbit flexor tendon model. *J. Biomech.* 31, 1043-1049.
- McCormick, R.J., 1999. Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poult. Sci.* 78, 785-791.
- McGinnis, P.M., 1999. *Biomechanics of Sports and Exercise*. Human Kinetics.
- Nakagawa, Y., Majima, T., Nagashima, K., 1994. Effect of ageing on ultrastructure of slow and fast skeletal muscle tendon in rabbit Achilles tendons. *Acta Physiol. Scand.* 152, 307-313.
- Nielsen, H.M., Skalicky, M., Viidik, A., 1998. Influence of physical exercise on aging rats III. Life-long exercises modifies the aging changes of the mechanical properties of limb muscle tendons. *Mech. Ageing Dev.* 100, 243-260.
- Nordin, M., Lorenz, T., Campello, M., 2001. Biomechanics of tendons and ligaments. In: Nordin, M., Frankel, V.H., *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 102-125.
- Noyes, F.R., Grood, E.S., 1976. The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys: age related and species-related changes. *J. Bone Joint Surg.* 58A, 1074-1082.
- O'Brien, M., 1997. Structure and metabolism of tendons. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 7, 55-61.
- Ono T., Nemoto, T.K., 2005. Two forms of apatite deposited during mineralization of the hen tendon. *Matrix Biol.* 24, 239-244.
- Öskaya, N., Leger, D., 2001. Introduction to biomechanics: basic terminology and concepts. In: Nordin, M., Frankel, V.H., *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2-16.

- Provenzano, P.P., Vanderby Jr., R., 2006. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.* 25, 71-84.
- Redaelli, A., Vesentini, S., Soncini, M., Vena, P., Mantero, S., Montevercchi, F.M., 2003. Possible role decorin glycosaminoglycans in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons – a computational study from molecular to microstructural level. *J. Biomech.* 36, 1555-1569.
- Rees, S.G., Flannery, C.R., Little, C.B., Hughes, C.E., Caterson, B., DenT, C.M., 2000. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem. J.* 350, 181-188.
- Shadwick, R.E., 1990. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J. Appl. Physiol.* 68, 1033-1040.
- Silver, F.H., Freeman, J.W., Seehra, G.P., 2003. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech.* 36, 1529-1553.
- Siperko, L.M., Landis, W.J., 2001. Aspects of mineral structure in normally avian tendon. *J. Struct. Biol.* 135, 313-320.
- Stone, M.H., 1988. Implications for connective tissue and bone alterations resulting from resistance exercise training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20, S162-S168.
- Vidal, B.C., 1993. Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Rev. Fac. Ciên. Med. Unicamp* 4, 1-6.
- Viidik, A., Nielsen, H.M., Skalicky, M., 1996. Influence of physical exercise on aging rats II. Life-long exercise delays aging of tail tendon collagen. *Mech. Ageing Dev.* 88, 139-148.
- Vogel, H.G., 1983. Age dependence of mechanical properties of rat tail tendons (hysteresis experiments). *Aktuelle Gerontol.* 13, 22-27.
- Vogel, K.G., Sandy, J.D., Pagony, G., Robbins, J.R., 1994. Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol.* 14, 171-179.

- Woo, S.L-Y., Ritter, M.A., Amiel, D., Sanders, M., Gomez, M.A., Kuei, S.C., Garfin, S.R., Akeson, W.H., 1980. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons – long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect. Tissue Res.* 7, 177-183.
- Woo, S.L-Y., Debski, R.E., Withrow, J.D., Janaushek, M., 1999. Biomechanics of knee ligaments. *Am. J. Sports Med.* 27, 533-543.
- Yoon, J.H., Brooks, R., Kim, Y.H., Terada, M., Halper, J., 2003. Proteoglycans in chicken gastrocnemius tendons change with exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 279-286.

Artigo I a ser submetido ao periódico *Mechanisms of Ageing and Development*

Efeito da idade e do ambiente de criação em tendão de frangos I - Tendão calcâneo

Resumo

Os efeitos dos estímulos mecânicos sobre os tendões dependem da localização anatômica do tendão e dos níveis de atividade no tendão e da intensidade da contração muscular. Estudos mostraram que alterações na matriz extracelular podem ser induzidas pelo exercício e pela idade. Este artigo analisou o tendão calcâneo de frangos com 1, 5 e 8 meses de idade, criados em ambiente amplo e restrito. Para a análise biomecânica foram analisados os tendões inteiros e para a bioquímica os tendões foram divididos em regiões de tensão e de compressão, para quantificação de hidroxiprolina e glicosaminoglicanos. Os resultados mostraram que o exercício aumentou a resistência à força a partir do quinto mês, maior absorção de energia no oitavo mês, maior tensão no primeiro mês e maior rigidez no quinto mês. A idade aumentou a força e o acúmulo de energia e diminuiu a rigidez, mas não alterou a tensão. O exercício e a idade estimularam o aumento no conteúdo de colágeno no quinto mês. O exercício aumentou o conteúdo de glicosaminoglicanos no primeiro e oitavo mês e com a idade aumentou no oitavo mês na região de compressão e diminuiu progressivamente na região de tensão. Nossos experimentos mostraram que algumas variações biomecânicas e bioquímicas são dependentes do próprio crescimento e maturação, mas também são influenciados pelo estímulo mecânico, de intensidade variada, do exercício ativo não forçado.

Palavras-chave: tendão, frangos, biomecânica, exercício, idade e colágeno.

1. Introdução

Os tendões possuem coloração esbranquiçada e brilhante quando saudáveis e demonstram grande resistência às forças mecânicas de tração. Os tendões podem ser curtos, grossos e planos como o tendão quadríceps, ou longos, finos e cilíndricos como os tendões flexores dos dedos nos humanos (Jósza and Kannus, 1997). A forma, cilíndrica ou laminar, de um tendão influencia diretamente nas suas propriedades mecânicas que pode variar consideravelmente. Durante a locomoção normal, tipos diferentes de tendões estão sujeitos a diferentes cargas mecânicas (Maganaris and Paul, 2002), assim como diferentes atividades induzem diferentes níveis de forças, dentro de um mesmo tendão (Malaviya et al., 1998).

A principal função do tendão é transmitir forças de tração do músculo ao osso, o que permite o movimento articular ou a manutenção da postura do corpo. Juntamente com ligamentos e cápsulas articulares, os tendões envolvem, conectam e estabilizam articulações (Nordin et al., 2001). Os tendões agem como molas biológicas que se alongam elasticamente, armazenando e liberando energia durante a locomoção, além de influenciar a performance mecânica dos músculos (Zajac, 1989). Em frangos a contração do músculo gastrocnêmio possibilita que o tendão calcâneo, que é laminar e biarticular, estenda a articulação do tornozelo e secundariamente influencie a flexão plantar dos dedos. O tendão calcâneo se origina da fusão das inserções aponeuróticas das cabeças do músculo gastrocnêmio e a sua forma laminar se deve a sua inserção ao longo do osso tarsometatarsal (Ghetie et al., 1981; Vanden Berge, 1981).

Os tendões tipicamente apresentam a propriedade mecânica denominada viscoelasticidade, que é a associação tanto de um componente viscoso quanto de um componente elástico. A viscosidade é a propriedade dos materiais para resistir a cargas que produzem fluxo. A

elasticidade pode ser definida como a capacidade que o material tem, após a retirada de uma carga, de retornar a sua forma original (Özkaya and Nordin, 1998). Em materiais elásticos a deformação ocorre instantaneamente quando uma força é aplicada, retornando ao seu comprimento inicial com a remoção dessa força. Na maioria dos materiais biológicos, como nos tendões, a deformação e a volta a sua forma original ocorre de forma gradual. Esse comportamento se deve às propriedades viscoelásticas presentes nos tendões (Nordin et al., 2001).

Em um mesmo tendão é possível observar a presença de regiões que suportam apenas forças de tração (região de tensão) como também regiões que sofrem forças de compressão além da de tração (região de compressão), como foi visto em frangos (Benevides et al., 2004) e porcos (Feitosa et al., 2002). Quando um tendão muda de direção e contorna uma extremidade óssea ou uma articulação, nessa região se desenvolve fibrocartilagem, apresentando uma composição da matriz extracelular muito diferente da região que sofre principalmente forças de tração, estimulando a síntese de colágeno tipo II e de proteoglicanos (Vogel, 2003; Benjamin and Ralphs, 2004).

Os tendões têm uma matriz extracelular abundante que contém elastina, proteoglicanos e principalmente colágeno tipo I (Kannus, 2000). As moléculas de colágeno se associam para formar fibrilas e feixes de fibrilas e posteriormente fibras. As propriedades biomecânicas dos tendões estão relacionadas com a orientação das fibrilas de colágeno, com seu diâmetro, com a organização e a ordem molecular (Vilarta and Vidal, 1989; Vidal and Carvalho, 1990). Assim, as fibrilas estão organizadas longitudinalmente em paralelo para maximizar a resistência às forças de tração (Kannus, 2000). As fibras de colágeno apresentam um padrão sinusoidal regular em forma de onda denominado *crimp*, que age como um amortecedor da tração dentro do tendão,

permitindo pequena deformação longitudinal das fibras sem causar danos ao tecido (O'Brien, 1997; Kannus, 2000).

Os proteoglicanos consistem de um esqueleto protéico central com pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAGs) covalentemente ligada e exercem importante papel na fibrilogênese do colágeno. Estudos mostram que pequenos proteoglicanos, como o decorim, o lumican e o fibromodulim, regulam a formação, a organização e a maturação das fibrilas de colágeno, a hidratação do tecido e também facilitam o deslizamento intra e interfibrilar durante o carregamento (Provenzano and Vanderby Jr., 2006).

Durante a maturação e no envelhecimento ocorrem modificações nos tendões como variações na viscoelasticidade e na resistência à força de tração, com modificações nas ligações dentro das fibrilas (Józsa and Kannus, 1997). Em geral, o conteúdo total de colágeno aumenta com a idade (Shadwick, 1990), principalmente pelo *turnover* bem como pela redução na síntese de enzimas colagenolíticas durante o envelhecimento (O'Brien, 1997). Entretanto, no envelhecimento outros aspectos foram observados, como a diminuição nos conteúdos de GAGs, de água e de elastina (Ippolito et al., 1980).

O processo de envelhecimento proporciona uma redução metabólica e morfofuncional do sistema músculo-esquelético, enquanto o desuso e a inatividade causam atrofia e diminuição da resistência de tendões e ligamentos (Stone, 1988). No entanto, o exercício físico pode influenciar a estrutura, composição química e propriedades mecânicas do tendão durante seu desenvolvimento e maturação (Cherdchutham et al., 2001) e até mesmo no envelhecimento (Nielsen et al., 1998; Dressler et al., 2002). Experimentalmente a limitação ou não da prática de exercício físico não forçado baseado na área disponível para a deambulação demonstrou exercer

influência nas características mecânicas e bioquímicas do tendão de ratos (Barfred et al., 1971), de cavalos (Cherdchutham et al., 2001) e de frangos (Benevides et al., 2004).

Poucos trabalhos mostram estudos com tendões de frangos assim o objetivo desse trabalho foi investigar as alterações biomecânicas e bioquímicas no tendão calcâneo (CT) de frangos com 1, 5 e 8 meses *caged*, com restrição de movimentos de deambulação, e animais *penned*, sob a prática de exercício ativo não forçado, ou seja, em atividades voluntárias como andar, correr, ciscar e levantar/abaixar.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Frangos da linhagem Pedrês, *Gallus Domesticus*, com 1 dia de idade foram divididos em dois grupos, um grupo *caged* criados em 0,5 m² (3 animais), no Biotério do Departamento de Biologia Celular – IB/UNICAMP, e o outro *penned* criados em 60 m² (3 animais), portanto com área livre para deambular. Após 1 mês (1M), 5 meses (5M) e 8 meses (8M) de idade, os animais foram sacrificados e seus tendões analisados.

2.2. Material Biológico

Os animais foram anestesiados com 2mL hidrato de cloral iv (10%) e sacrificados com 1mL de KCl 4M e pesados. Para a análise bioquímica o CT foi dividido em 2 regiões: uma que sofre forças compressivas além da força de tensão inerente a toda extensão do tendão (região

proximal – Cp) e outra que sofre principalmente forças tensionais (região distal – Cd). A região Cp contorna a tróclea da tíbia e a Cd está sobre os dois terços da porção distal posterior do osso tarsometatarsal (Ghetie et al., 1981; Vanden Berge, 1981) (Fig. 1). Para o teste biomecânico os tendões foram retirados em peça única. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNICAMP.

2.3. *Teste Biomecânico*

Para os ensaios mecânicos sob tração uniaxial foram utilizados 10 tendões, sem cortes ou lacerações que poderiam interferir na análise. Os testes biomecânicos foram realizados de acordo com o descrito por Benevides e colaboradores (2004). Antes do início do teste foi determinado com paquímetro o comprimento inicial (L_0) do CT e no ponto médio da região distal foi mensurado a largura e a espessura. Com estas medidas foi obtida a área de secção transversa (CSA) e com o valor do comprimento inicial e do deslocamento final ($\Delta L = L - L_0$) foi obtida a deformação ($\epsilon = \Delta L / L_0$, em %). A tensão (σ) foi calculada pela razão da força (N) pela área de secção transversa (mm^2) e expressa em MPa. Para evitar o ressecamento das fibras durante o ensaio mecânico os tendões foram mantidos úmidos com solução salina (PBS). Os espécimes foram fixados em placas metálicas no equipamento de tração (MTS, modelo TESTSTAR II) e submetidos a um aumento gradual de força com velocidade constante de 20mm/min, em célula de carga de 1KN (Tohyama and Yasuda, 2000).

Para cada grupo foram calculadas as médias dos valores máximos de força, deslocamento, tensão e deformação, e também foram construídas curvas de força-deslocamento e de tensão-deformação. As curvas foram obtidas da média de cada propriedade mecânica de cada grupo, a

partir de uma média da superposição de curvas de cada espécime. O módulo elástico, que indica a rigidez do tecido, de cada grupo foi obtido da inclinação da porção linear da curva tensão-deformação de cada amostra (Gupte et al., 2002). Da curva força-deslocamento foi calculada a área sob esta curva que corresponde à energia absorvida pelo tendão até o ponto de força máxima e indica a quantidade de forças externas que o tecido pode absorver até este ponto (Abramowitch et al., 2003; Sparrow et al., 2004). Esses testes foram realizados no Laboratório de Propriedades Mecânicas na Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP.

2.4. Quantificação de Hidroxiprolina

A determinação do conteúdo de hidroxiprolina, que é proporcional à concentração de colágeno, foi baseada em Stegemann and Stalder (1967). Amostras das regiões de tensão e de compressão foram hidrolisadas em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 16h a 107°C. Do material hidrolisado, foram utilizados 5µL para cada leitura, sendo acrescentado posteriormente 1mL de solução de cloramina-T. Após 20min foi adicionado 1mL de solução de ácido perclórico/aldeído e o material foi mantido em incubação por 15min a 60°C, resfriado até 20°C e lido em espectrofotômetro, $\lambda = 550\text{nm}$.

2.5. Obtenção e quantificação dos glicosaminoglicanos

Amostras de cada região do tendão foram desidratados com acetona e os GAGs foram obtidos após tratamento com papaína (40mg/g de tecido) em tampão citrato de sódio 30mM pH 6.5 contendo EDTA 40mM e 2-mercaptoetanol 80mM e incubados a 50°C por 24h. O material

foi centrifugado a 5.900 g por 5min. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol e mantidos a 4°C por 24h, e posteriormente centrifugado novamente. O precipitado foi lavado com etanol 80% e mantido em estufa a 37°C até a secagem total e ressuspenso em água destilada (Michelacci and Horton, 1989). O conteúdo de GAGs foi determinado pelo método de azul de dimetilmetileno (Farndale et al., 1986), e lido em espectrofotômetro, $\lambda = 526\text{nm}$.

2.6. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) One-Way seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância (Callegari-Jacques, 2003).

3. Resultados

Durante o experimento os animais foram pesados e com esses valores foi construída uma curva média de crescimento (Fig. 2). Os animais apresentaram um aumento no peso durante o envelhecimento demonstrando diferença significativa entre as idades analisadas ($p < 0,01$ para 1 mês vs 5 meses para os dois ambientes e $p < 0,01$ para 5 meses vs 8 meses para os dois ambientes), porém essa diferença não foi observada quando foram comparados os pesos dos animais dos dois ambientes de criação para cada idade analisada.

A medida da CSA foi significativamente diferente entre animais *caged* de todas as idades enquanto que os animais *penned* apresentaram essa diferença entre as idades de 1 e 5 e de 1 e 8

meses (Tabelas 1 e 2). Comparando os ambientes houve diferença entre animais com 1 e 8 meses de idade (Tabelas 1 e 2).

Os dados obtidos com a análise biomecânica mostram que para os animais de ambientes diferentes, as idades de 5 e 8 meses apresentaram diferença significativa no valor da força máxima (Figs. 3.b e 3.c e Tabela 2). Comparando separadamente os animais criados em mesmo ambiente a força máxima obteve um aumento até o quinto mês com diferença significativa entre animais com 1 mês vs 5 meses e 1 mês vs 8 meses (Figs. 4.a e 4.b e Tabela 2). Entre os animais de mesmo ambiente o deslocamento máximo foi significativamente diferente, porém comparando os dois ambientes a diferença foi observada entre os animais de 8 meses (Figs. 3.c, 4.a e 4.b e Tabela 2).

Os valores de tensão máxima apresentaram diferença somente entre animais de 1 mês quando foram comparados os dois ambientes (Fig. 5.a e Tabela 2). Analisando os dados para deformação máxima os animais *caged* apresentaram diferença entre 1 mês vs 5 meses e entre 5 meses vs 8 meses (Fig. 6.a e Tabela 2), enquanto que os *penned* apresentaram diferença entre 1 mês vs 8 meses e 5 meses vs 8 meses (Fig. 6.b e Tabela 2). Comparando os ambientes foi observada diferença entre animais com 8 meses (Fig. 5.c e Tabela 2).

Para os animais *caged* a absorção de energia aumentou do primeiro para o quinto mês, já nos animais *penned* a absorção de energia foi progressiva nas 3 idades estudadas. A diferença quando se compara os dois ambientes ocorreu somente entre animais com 8 meses. (Tabelas 1 e 2). Os dados do módulo elástico mostraram que não houve diferença entre os animais *caged* e para os animais *penned* ocorreu diferença entre 1 mês vs 8 meses e 5 meses vs 8 meses. Comparando os dois ambientes foi observada diferença entre animais com 5 e 8 meses (Tabelas 1 e 2).

Com relação às dosagens de hidroxiprolina, foi notado que na região de compressão (Cp) a concentração de hidroxiprolina aumentou nos animais *caged*, porém para os animais *penmed* esse aumento foi até o quinto mês, podendo observar diferença em ambos os casos. Comparando os ambientes houve diferença de concentração de hidroxiprolina entre os animais de 5 meses (Tabelas 3 e 4). Para a região de tensão (Cd) não houve diferença comparando os dois ambientes, porém houve diferença entre 1 mês vs 5 meses e 1 mês vs 8 meses tanto para animais *caged* como *penmed* (Tabelas 3 e 4). Comparando as duas regiões entre si (dados estatísticos não mostrados em tabela), as regiões de tensão (Cd) apresentaram maior concentração de hidroxiprolina do que as regiões de compressão (Cp) para os animais com 5 e 8 meses dos dois ambientes ($p < 0.01$ para animais com 5 meses e $p < 0.05$ para animais com 8 meses).

Com relação ao conteúdo de GAGs nas diferentes idades pode ser observado que houve um aumento no conteúdo em Cp em relação à maturação para animais *caged* e um aumento progressivo do quinto para o oitavo mês para animais *penmed*. Entre os ambientes houve diferença entre animais de 1 mês e entre os de 8 meses. Na região Cd houve diferença significativa entre as idades dos animais *penmed*, e nos animais *caged* entre 1 mês vs 5 meses e 5 meses vs 8 meses. Comparando os ambientes houve diferença entre os animais com 1 mês (Tabelas 3 e 4). Comparando as duas regiões entre si (dados estatísticos não mostrados em tabela), para todos os grupos as regiões de compressão (Cp) apresentaram maior conteúdo de GAGs do que as regiões de tensão (Cd) ($p < 0.01$ para todas idades e ambientes).

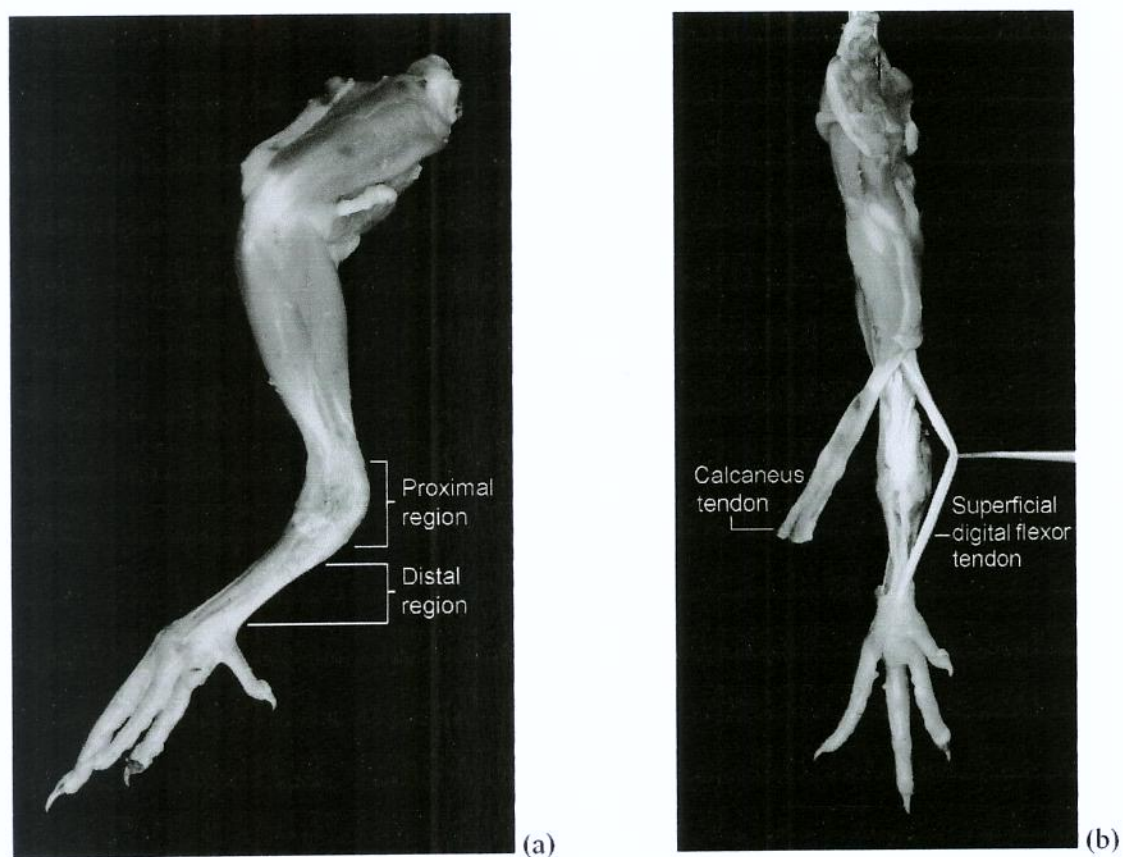


Fig. 1. (a) Vista lateral da perna de frango, mostrando as localizações das duas regiões tendíneas estudadas: proximal que contorna a tróclea da tíbia e a distal que está sobre os 2/3 distais do osso tarsometatarsal. (b) Vista posterior da perna de frango, apontando o tendão calcâneo (CT) e o tendão flexor digital superficial (SDFT).

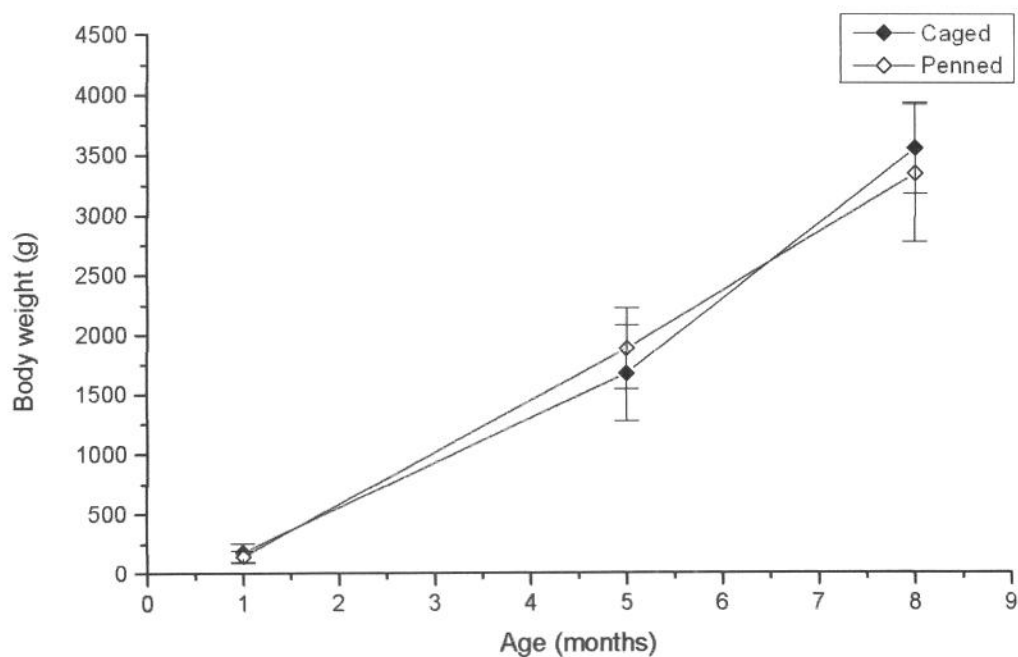


Fig. 2. Peso corpóreo vs idade de animais criados em ambientes distintos. Os animais com 1 mês de idade *caged* e *penned* apresentaram, respectivamente, $181 \pm 76.81\text{g}$ e $147.07 \pm 50.39\text{g}$. Os animais com 5 meses *caged* e *penned* apresentaram, respectivamente, $1,674.81 \pm 402.74\text{g}$ e $1,882.30 \pm 342.31\text{g}$. Os animais com 8 meses *caged* e *penned* apresentaram, respectivamente, $3,561.07 \pm 379.62\text{g}$ e $3,350.12 \pm 575.27\text{g}$.

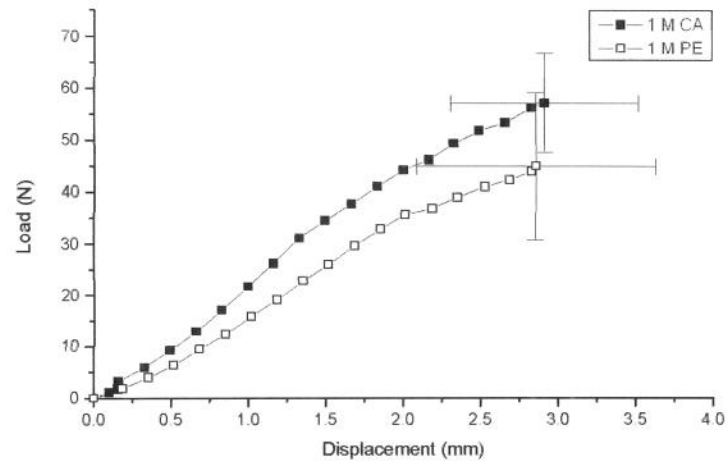
Tabela 1. Propriedades biomecânicas e anatômicas do tendão de frangos de diferentes idades criados em ambientes diferentes. Cross Sectional Area (CSA), 1 mês (1M), 5 meses (5M) e oito meses (8M).

Age	Animals	Energy at Failure (N·mm)	Elastic Modulus (MPa)	CSA (mm ²)
1M	<i>Caged</i>	93.77 ± 19.57	197.09 ± 58.31	6.98 ± 2.70
	<i>Penned</i>	85.66 ± 16.63	266.72 ± 69.09	2.92 ± 0.84
5M	<i>Caged</i>	1,106.82 ± 294.14	168.36 ± 10.83	24.31 ± 1.23
	<i>Penned</i>	1,384.49 ± 210.05	273.51 ± 59.80	28.87 ± 3.99
8M	<i>Caged</i>	835.84 ± 270.05	210.51 ± 46.01	21.27 ± 1.32
	<i>Penned</i>	2,491.53 ± 454.49	110.90 ± 22.67	33.98 ± 5.25

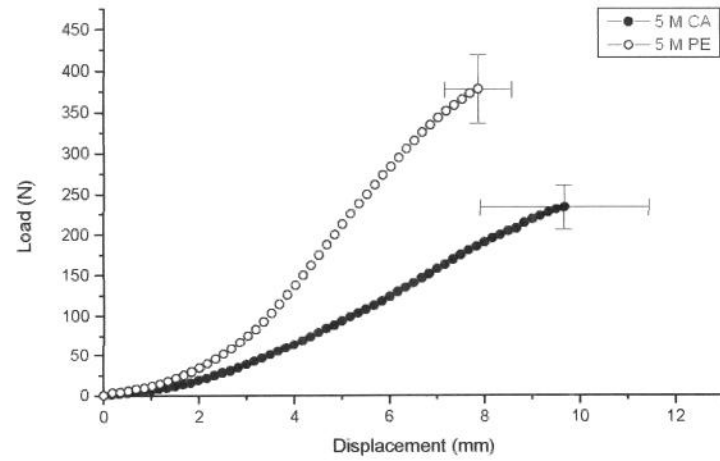
Tabela 2. Comparações estatísticas das propriedades mecânicas e anatômicas do tendão indicando diferenças entre os grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e ns = não significativos). CA e PE são, respectivamente, *caged* e *penned*, enquanto 1M, 5M e 8M são, respectivamente, 1, 5 e 8 meses.

	Maximum Load	Maximum Displacement	Energy at Failure	Maximum Stress	Maximum Strain	Elastic Modulus	CSA
1MCA vs 1MPE	ns	ns	ns	*	ns	ns	**
5MCA vs 5MPE	**	ns	ns	ns	ns	**	ns
8MCA vs 8MPE	*	**	**	ns	**	**	**
1MCA vs 5MCA	**	**	**	ns	*	ns	**
1MCA vs 8MCA	**	**	**	ns	ns	ns	**
5MCA vs 8MCA	ns	*	ns	ns	*	ns	**
1MPE vs 5MPE	**	**	**	ns	ns	ns	**
1MPE vs 8MPE	**	**	**	ns	**	**	**
5MPE vs 8MPE	ns	**	**	ns	**	**	ns

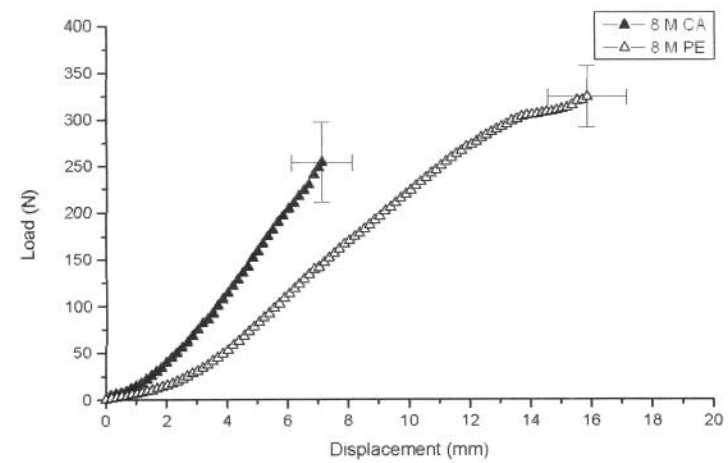
Fig. 3. Curva load-displacement para o tendão calcâneo comparando animais de mesma idade porém criados *caged* (CA) ou *penned* (PE). Em (a) animais com 1 mês onde valores de força máxima e de deslocamento máximo são, respectivamente, $57.11 \pm 9.58\text{N}$ e $2.91 \pm 0.60\text{mm}$ para o grupo *caged* (CA -■-) e $44.41 \pm 14.24\text{N}$ e $2.82 \pm 0.76\text{mm}$ para o grupo *penned* (PE -□-). (b) animais com 5 meses de idade com valores de força máxima e de deslocamento máximo, respectivamente, de $233.31 \pm 27.49\text{N}$ e $9.95 \pm 1.76\text{mm}$ para o grupo *caged* (CA -●-) e de $389.65 \pm 59.67\text{N}$ e $7.96 \pm 0.70\text{mm}$ para o grupo *penned* (PE -○-). (c) animais com 8 meses de idade onde os valores de força máxima e de deslocamento máximo são, respectivamente, $253.17 \pm 43.98\text{N}$ e $7.10 \pm 0.99\text{mm}$ para o grupo *caged* (CA -▲-) e $323.79 \pm 33.08\text{N}$ e $15.27 \pm 1.29\text{mm}$ para o grupo *penned* (PE -△-). Vide valor de *p* na tabela 2.



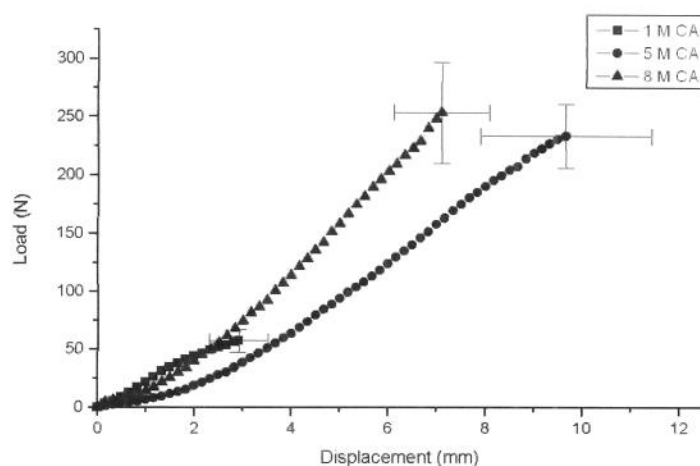
(a)



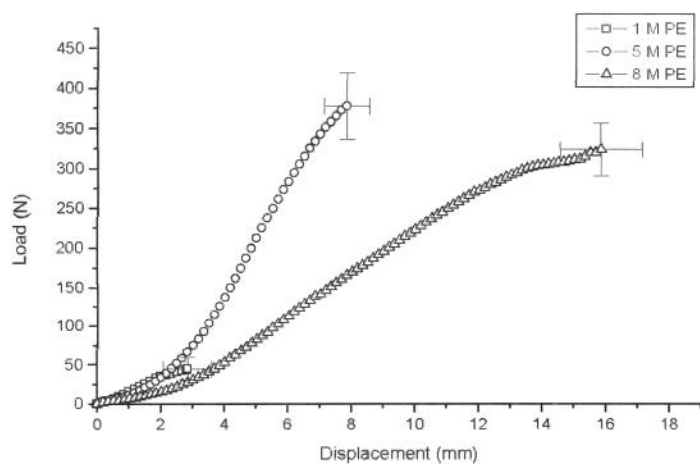
(b)



(c)



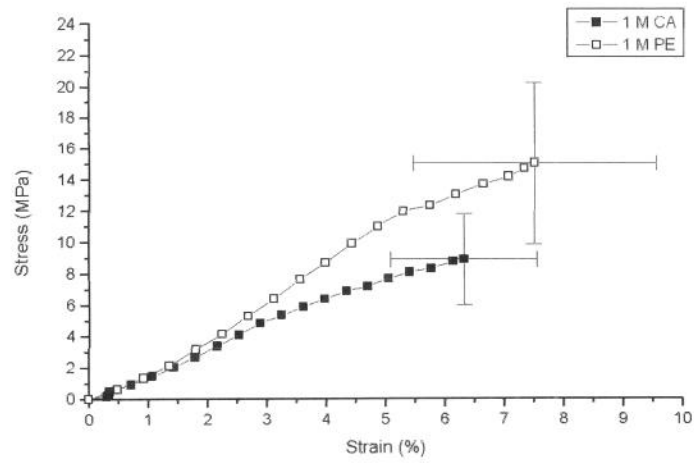
(a)



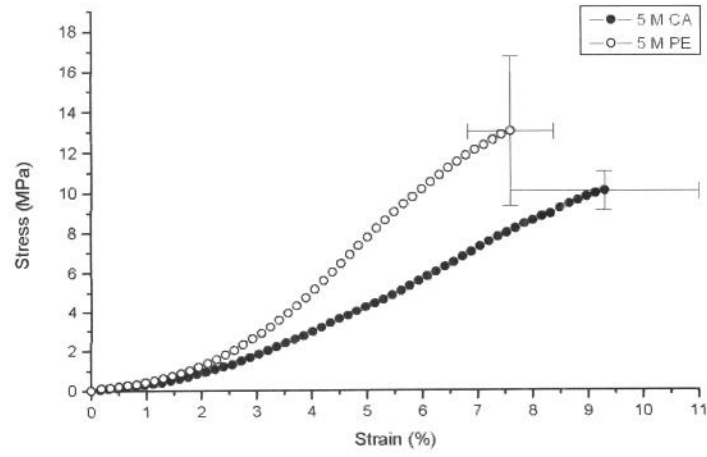
(b)

Fig. 4. Curva load-displacement para o tendão calcâneo comparando animais de idades diferentes criados em mesmo ambiente. Em (a) animais *caged* (CA), onde os valores de força máxima e de deslocamento máximo para 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, $57.11 \pm 9.58\text{N}$ e $2.91 \pm 0.60\text{mm}$ (-■-), $233.31 \pm 27.49\text{N}$ e $9.95 \pm 1.76\text{mm}$ (-●-) e $253.17 \pm 43.98\text{N}$ e $7.10 \pm 0.99\text{mm}$ (-▲-). (b) animais *penned* (PE) com valores de força máxima e de deslocamento máximo para 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, $44.41 \pm 14.24\text{N}$ e $2.82 \pm 0.76\text{mm}$ (-□-), $389.65 \pm 59.67\text{N}$ e $7.96 \pm 0.70\text{mm}$ (-○-) e $323.79 \pm 33.08\text{N}$ e $15.27 \pm 1.29\text{mm}$ (-△-). Vide valor de p na tabela 2.

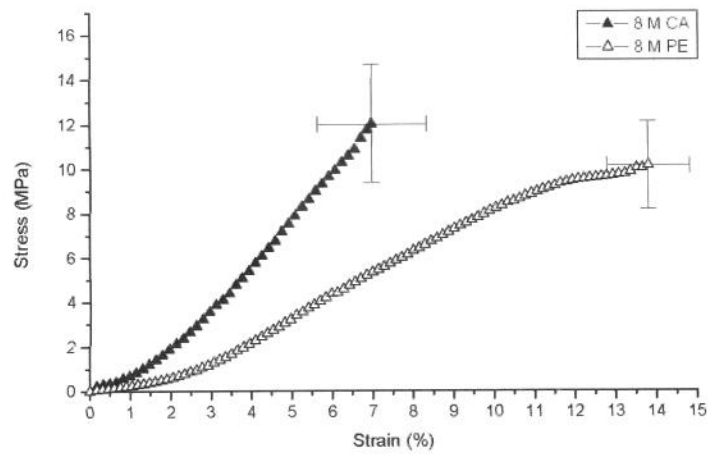
Fig. 5. Curva Stress-Strain para o tendão calcâneo de animais de mesma idade porém criados em ambiente diferente. (a) animais com 1 mês de idade apresentando valores de tensão máxima e de deformação máxima, respectivamente, de $8.91 \pm 2.92\text{MPa}$ e $6.30 \pm 1.20\%$ para o grupo *caged* (CA - ■-) e de $15.08 \pm 5.19\text{MPa}$ e $7.50 \pm 2.00\%$ para o grupo *penned* (PE - □-). (b) animais com 5 meses de idade com valores de tensão máxima e de deformação máxima, respectivamente, de $9.99 \pm 0.97\text{MPa}$ e $9.30 \pm 1.70\%$ para o grupo *caged* (CA - ●-) e de $13.02 \pm 3.69\text{MPa}$ e $7.60 \pm 0.70\%$ para o grupo *penned* (PE - ○-). (c) animais com 8 meses de idade onde os valores de tensão máxima e de deformação máxima são, respectivamente, $12.01 \pm 2.67\text{MPa}$ e $6.90 \pm 1.30\%$ para o grupo *caged* (CA - ▲-) e $9.95 \pm 2.15\text{MPa}$ e $13.8 \pm 1.70\%$ para o grupo *penned* (PE - △-). Vide valor de *p* na tabela 2.



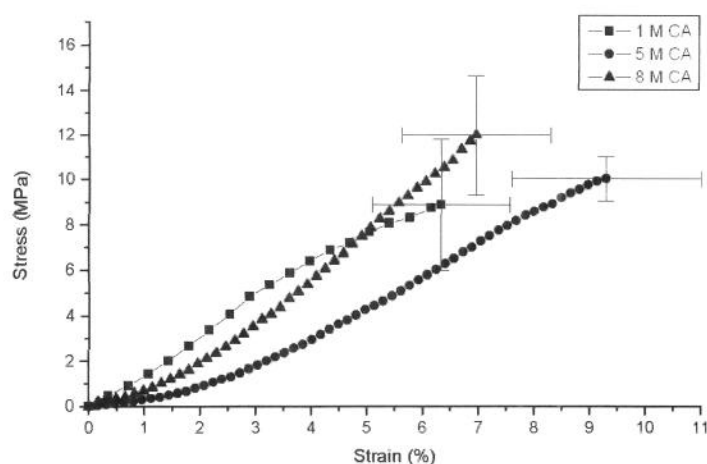
(a)



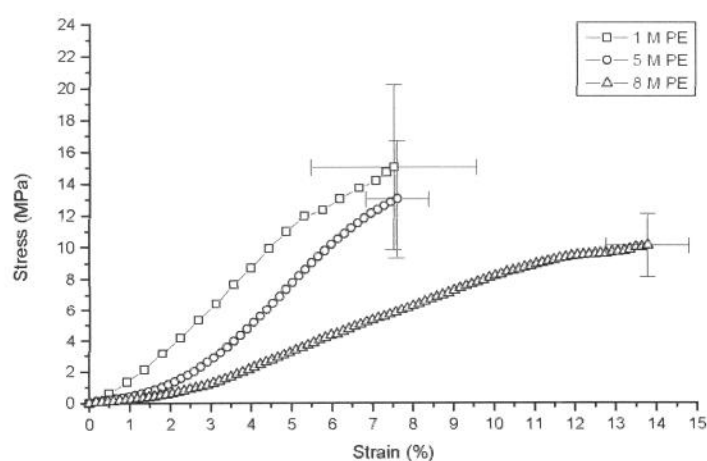
(b)



(c)



(a)



(b)

Fig. 6. Curva Stress-Strain para o tendão calcâneo de animais de idades diferentes porém criados em mesmo ambiente. (a) animais *caged* (CA) com valores de tensão máxima e de deformação máxima para 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, 8.91 ± 2.92 MPa e $6.30 \pm 1.20\%$ (-■-), 9.99 ± 0.97 MPa e $9.30 \pm 1.70\%$ (-●-) e 12.01 ± 2.67 MPa e $6.90 \pm 1.30\%$ (-▲-). (b) animais *penned* (PE) com valores de tensão máxima e de deformação máxima para 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, 15.08 ± 5.19 MPa e $7.50 \pm 2.00\%$ (-□-), 13.02 ± 3.69 MPa e $7.60 \pm 0.70\%$ (-○-) e 9.95 ± 2.15 MPa e $13.8 \pm 1.70\%$ (-△-). Vide valor de p na tabela 2.

Tabela 3. Concentração de hidroxiprolina (Ho-Pro) (mg/g de tecido úmido) e glicosaminoglicanos (GAGs) (mg/g – de tecido seco) em cada região do tendão. Cp – região proximal e Cd – região distal, sendo 1M, 5M e 8M são, respectivamente, 1, 5 e 8 meses.

		1MCA	1MPE	5MCA	5MPE	8MCA	8MPE
Ho-Pro	Cp	13.80 ± 1.99	16.89 ± 3.57	20.42 ± 1.56	23.95 ± 1.12	23.15 ± 2.00	24.11 ± 3.99
	Cd	16.22 ± 3.19	17.82 ± 3.77	28.38 ± 5.04	31.59 ± 3.16	27.27 ± 2.74	32.29 ± 7.94
GAGs	Cp	7.22 ± 3.12	22.34 ± 2.26	21.68 ± 4.30	25.16 ± 7.02	40.65 ± 2.89	51.84 ± 1.93
	Cd	2.48 ± 0.52	9.26 ± 1.72	5.08 ± 1.71	3.99 ± 0.52	2.21 ± 1.23	2.38 ± 0.84

Tabela 4. Comparações estatísticas das concentrações hidroxiprolina (Ho-Pro) e glicosaminoglicanos (GAGs) indicando diferenças entre os grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e ns = não significativos).

	Ho-Pro		GAGs	
	Cp	Cd	Cp	Cd
1MCA vs 1MPE	ns	ns	**	**
5MCA vs 5MPE	**	ns	ns	ns
8MCA vs 8MPE	ns	ns	**	ns
1MCA vs 5MCA	**	**	**	**
1MCA vs 8MCA	**	**	**	ns
5MCA vs 8MCA	*	ns	**	**
1MPE vs 5MPE	**	**	ns	**
1MPE vs 8MPE	**	**	**	**
5MPE vs 8MPE	ns	ns	**	**

4. Discussão

Os tendões integram as estruturas contráteis (músculos) e não-contráteis (ossos) do corpo e transmitem forças que possibilitam a realização de movimentos. O nível de força imposta a um tendão dependerá da sua localização anatômica, da sua função e também do seu nível de atividade metabólica (Shadwick, 1990; Nielsen et al., 1998). O CT de frangos apresenta um comportamento dinâmico e está sujeito a tensões contínuas, pois foi verificada uma considerável atividade eletromiográfica do músculo gastrocnêmio de galinha de Angola (*guinea fowl*) durante uma corrida (Daley and Biewener, 2003).

A contração muscular gerada para produzir a locomoção e movimentos de levantar/abaixar influencia a transmissão de forças no tendão. Uma mudança abrupta de *stress* mecânico ocorre logo após o nascimento e durante a maturação quando as estruturas estão sujeitas à gravidade e concomitante peso corporal (Lin et al., 2005a). Entretanto, neste estudo o peso corporal não se alterou entre os grupos em relação aos animais de mesma idade, assim a tensão no tendão sofrida em resposta ao peso do animal foi praticamente a mesma para animais *caged* e animais *penned*. Este resultado foi semelhante aos descritos na literatura (Curwin et al., 1988; Cherdchuthan et al., 2001; Benevides et al., 2004), concluindo que a tensão extra foi oriunda apenas do exercício ativo não-forçado praticado pelos animais *penned*.

Estudos têm mostrado que mudanças bioquímicas na matriz extracelular e alterações no comportamento biomecânico de tendões podem ser induzidas por estímulos mecânicos, resultantes de diferentes níveis de atividade física, tanto de exercícios forçados em porcos (Woo et al., 1980; Woo et al., 1981), frangos (Curwin et al., 1988) e galinhas de Angola (Buchanan and Marsh, 2001) quanto de não-forçados em frangos (Benevides et al., 2004) e potros (Cherdchuthan

et al., 2001). Outros pesquisadores têm demonstrado que estas alterações também sofrem influência do desenvolvimento e maturação (Lin et al., 2005a) e envelhecimento (Nielsen et al., 1998).

A curva de *stress-strain* pode ser dividida em regiões devido ao comportamento viscoelástico do tendão. No ensaio mecânico a tração nos espécimes é capaz de provocar uma deformação e alterar a forma do *crimp* das fibras de colágeno, e esta deformação do *crimp* corresponde a *toe region*, ou região inicial, da curva. O *crimp* é facilmente estendido, retificado em relação ao eixo de tração, sendo que pequenas forças são capazes de produzir grandes deformações. Assim, durante a deformação do tendão as forças atuantes dentro desta região reduzem o ângulo do *crimp* sem exceder o limite elástico do tendão. A *toe region* pode ser diferente com a idade do tendão, variando de 1,5 a 4% de deformação (Shadwick, 1990), e com o tipo de tendão (Nielsen et al., 1998). Fibras de colágeno com menor ângulo no *crimp* experimentam altos níveis de tensão precocemente a uma dada deformação sendo que suas fibras estarão alinhadas em relação a força de tração, e rompem antes daquelas com um ângulo *crimp* maior (Patterson-Kane et al., 1997; Wilmink et al., 1992). Segundo Järvinen e colaboradores (2004) cada tipo de tendão possui *crimp* com angulações próprias. A continuação da aplicação de forças de tração leva à região intermediária (região linear) que possui maior rigidez do que a anterior sendo resultante da maior resistência ao alongamento das fibras retificadas. Nesta região a quantidade de tensão sofrida está linearmente relacionada com a deformação (Woo et al., 1999) e no ponto final desta região algumas fibras começam a falhar. A deformação além da região linear conduz à região final (*yield and failure region*) onde se acentuam as falhas das fibras de uma maneira desordenada, podendo ocorrer ruptura completa do tendão (Maganaris et al., 2004).

No presente estudo foi observada uma deformação diferente para a *toe region* em ambos os grupos com 8 meses, sendo que graficamente a deformação maior foi para o grupo *penned* (aproximadamente 2% para *caged* e 4% para *penned*). No caso da deformação máxima nenhuma diferença foi observada entre os grupos *caged* e os *penned* tanto no primeiro quanto no quinto mês. Nossos resultados estão de acordo com Cherdchuthan e colaboradores (2001) que não verificaram diferenças significativas, até o quinto mês, na deformação máxima para tendões de potros não exercitados, exercitados e criados soltos em pasto, ou seja, durante o período de desenvolvimento destes animais. No entanto, no oitavo mês o grupo *penned* apresentou aproximadamente o dobro da deformação (cerca de 14%) apresentada pelo grupo *caged*, provavelmente por ser menos rígido. Alguns estudos observaram que o tendão flexor digital profundo (Devkota and Weinhold, 2003) e o flexor digital superficial (Nakagaki et al., em submissão – artigo II) de aves podem ser deformados até 14% e 12%, respectivamente, mostrando que um tendão extensor do membro inferior de frangos, como tendão calcâneo, pode ser deformado a uma taxa semelhante aos dos tendões flexores digitais.

Com os dados deste estudo foi obtida diferença significativa para a resistência à tensão máxima no primeiro mês quando foi analisada a influência do ambiente de criação. Nesta idade o grupo *penned* apresentou aproximadamente o dobro do valor da tensão máxima em relação aos animais *caged*, pois os tendões do grupo *penned* possuíam menor CSA dos que os tendões do grupo *caged* tendo resistido à mesma força máxima durante o teste. Para esta idade nossos resultados estão de acordo com os de Benevides e colaboradores (2004) que estudaram tendões de frangos jovens (com dois meses de idade) também submetidos ao exercício voluntário. Entretanto, no quinto e no oitavo mês os valores da tensão não apresentaram diferença significativa entre os grupos *caged* e *penned* em cada idade considerada. Cherdchuthan e

colaboradores (2001) ao estudar potros com 5 meses criados em pasto e criados no estábulo não encontraram diferenças nesta propriedade, enquanto que Nielsen e colaboradores (1998) ao treinar ratos até o envelhecimento verificaram que os animais sedentários suportaram maior tensão do que os treinados. No entanto deve ser levado em consideração que cavalos e ratos são quadrúpedes e que há diferenças no desenvolvimento e maturação deste tecido entre as espécies consideradas. Além disto, tendões imaturos podem responder ao exercício diferentemente do que tendões maduros (Buchanan and Marsh, 2002).

Considerando a influência da idade dos animais, neste estudo os tendões dos animais *caged* e dos animais *penned* apresentaram a mesma resistência à tensão máxima durante o teste. Apesar dos tendões dos grupos com 5 e 8 meses terem atingido maiores picos de força durante o teste, deve se considerar que as médias da CSA também eram maiores para os espécimes destes grupos. Deste modo uma CSA maior serve para diminuir a tensão no tendão (Rosanger et al., 2002). Dowling and Dart (2005) sugerem que a CSA não representa por si só a força de um tendão, mas que a sua resistência também está relacionada com a quantidade e organização de todos os componentes da matriz extracelular.

Em nosso experimento os tendões atingiram maiores valores de força até a maturidade (5 meses) tanto no grupo *caged* quanto no *penned*, demonstrando que o crescimento e a maturação do tendão influenciaram em sua resistência à força de tração provavelmente por apresentar quantidade maior de colágeno e tamanho maior do que os grupos com 1 mês. Segundo Buchanan and Marsh (2002) teoricamente pode-se esperar uma associação das propriedades mecânicas com a concentração de colágeno. Nossos dados mostram que o estímulo mecânico do exercício ativo não-forçado proporcionou maior produção de colágeno até o quinto mês já que os tendões *caged* só atingiram esta concentração aos 8 meses. Esta estabilização no conteúdo de colágeno pode

estar associada com a diminuição na atividade celular com o avanço da idade. Embora tenha estudado ratos, Esquisatto e colaboradores (2003) observaram que nas células do tendão calcâneo ocorria um aumento da atividade metabólica do retículo endoplasmático rugoso no início do desenvolvimento dos animais, tornando-se menos proeminentes com o decorrer da idade.

Neste estudo foi observado que o exercício ativo não forçado proporcionou valores de força máxima maiores para os grupos com 5 e 8 meses. Como no quinto mês há um maior conteúdo de colágeno e o valor de CSA também tenha sido levemente maior (mas não significativamente) no grupo *penned*, pode-se concordar com a idéia de Dowling and Dart (2005), anteriormente citada. Além disto, no oitavo mês a CSA foi maior no grupo *penned*, estando de acordo com Cherdchuthan e colaboradores (2001) que concluíram que a força de ruptura de um tendão é basicamente proporcional à sua CSA sendo que esta pode ser controlada pela soma das tensões a que o tendão é exposto. No entanto, deve ser considerado que tendões podem responder diferentemente ao estímulo mecânico se possuírem diferentes funções e níveis de atividade (Nielsen et al., 1998). Nossos resultados nos testes de tração foram semelhantes à de outros trabalhos que mostraram que a força máxima em tendões de porcos (Woo et al., 1980) e coelhos treinados (Viidik, 1969) e de frangos (Benevides et al., 2004), potros (Cherdchuthan et al., 2001) e ratos (Barfred, 1971) criados em ambiente amplo era maior em relação aos animais confinados.

Para Shadwick (1990) as alterações mecânicas que acontecem do nascimento à maturidade provavelmente resultam de um aumento do conteúdo de colágeno e da quantidade de *cross-links* entre as moléculas de colágeno. Um estudo citou que a falha mecânica do colágeno não se deve à quebra destas moléculas, mas a separação de moléculas adjacentes (Buchanan and Marsh, 2001). Assim, *cross-link* intermolecular é um fator importante na determinação do

módulo elástico (Buchanan and Marsh, 2001). Embora tenha realizado exercício estrênuo, Curwin e colaboradores (1988) sugeriram que um aumento no *turnover* de colágeno associado ao exercício no tendão gastrocnêmio de frangos, exercitados da terceira à décima primeira semana de vida, resulta em acúmulo de feixes de colágeno imaturos com poucos *cross-links*. Nossos resultados mostraram que animais criados em gaiolas possuem tendões com a mesma rigidez para as três idades consideradas, enquanto que os animais exercitados apresentaram a mesma rigidez até o quinto mês, tornando-se menos rígido aos 8 meses. Considerando que no *penned* ocorreu um aumento no conteúdo de colágeno no quinto mês e que se estabilizou no oitavo mês, podemos suspeitar que no oitavo mês o grupo *penned* continha feixes de colágeno com menos *cross-links* do que os tendões do grupo *penned* com 5 meses. Embora o exercício deste estudo não fosse forçado como no de Curwin e colaboradores (1988), deve-se considerar que durante 8 meses (32 semanas) os nossos animais tiveram a oportunidade de se movimentarem durante todo o dia e não somente em tempo estipulado para o treinamento. Além disto, os animais deste trabalho apresentaram diferentes taxas de aceleração do corpo para a deambulação, como por exemplo inúmeras corridas de curta duração, e variações na intensidade da contração muscular quando comparados aos animais criados em gaiola, estando de acordo com Cherdchuthan e colaboradores (2001) quando descreveram esta alternância na intensidade de exercícios espontâneos. Além disto, Mays e colaboradores (1991) relatam que nas fases finais da maturação a síntese de colágeno diminui consideravelmente, enquanto que a degradação aumenta. Nielsen e colaboradores (1998) relataram que o exercício físico pode estimular o *turnover* metabólico em tecidos conjuntivos, sendo que a formação de novos *cross-links* de colágeno é reduzida, ou seja, novos colágenos com *cross-links* divalentes são armazenados, enquanto que alguns dos colágenos mais velhos com *cross-links* maduros ou envelhecidos são removidos, indicando que o tendão fica

mais “jovem”. Isto poderia também explicar a menor rigidez dos tendões *penned* no oitavo mês, apesar da similaridade no conteúdo de colágeno para os grupos *caged* e *penned* nesta idade.

Para Shadwick (1990) a partir do nascimento até a maturação o tendão flexor digital de porcos aumenta sua capacidade de absorção de energia, da mesma forma que ocorreu durante o crescimento e a maturação dos tendões deste estudo. Para animais *caged* ocorreu uma estabilização na capacidade de acumular energia dos 5 aos 8 meses, possivelmente porque a CSA tenha diminuído no oitavo mês. Para os animais *penned*, ocorreu um aumento progressivo desta absorção. O exercício diário rotineiro dos frangos *penned* permitiu aos tendões de 8 meses absorver mais energia durante o teste de tração até o ponto de tensão máxima. Sob o efeito da idade e do exercício, este comportamento provavelmente tenha ocorrido por ser menos rígido e, conseqüentemente, apresentou maior deformação. Na literatura há uma discordância com relação à correspondência da capacidade de absorção de energia e a rigidez do tecido. Para Shadwick (1990) quanto mais rígido é o tendão mais ele acumulará energia, enquanto que Buchanan and Marsh (2001) hipotetizaram que um aumento da rigidez do tendão parece não estar associado com um aumento na armazenagem de energia no tendão já que para uma mesma força os tendões mais rígidos absorvem menos energia, pois para esta força apresenta menor deformação do que os tendões menos rígidos. Deste modo a capacidade de absorver energia até o ponto de falha dos tendões deste estudo não foi influenciada por uma rigidez maior, já que os tendões dos animais *penned* de 8 meses eram menos rígidos e absorveram quantidade maior de energia do que os tendões dos animais *caged* de mesma idade.

A presença de regiões de tensão e de compressão em um mesmo tendão é importante para verificar os efeitos do estímulo mecânico na atividade metabólica das células e dos componentes da matriz extracelular. Segundo Benevides e colaboradores (2004) a região de tensão apresenta

maior conteúdo de colágeno do que a região de compressão em tendões de frangos, já que fibras de colágeno são consideradas as estruturas capazes de resistir as forças de tração (Scott, 1997). Nossos resultados estão de acordo com estes autores, pois foi verificado que o conteúdo de colágeno era maior na região Cd do que na região Cp, a partir do quinto mês, tanto para os grupos *caged* quanto para os grupos *penned*. Esta variação talvez não tenha ocorrido nos tendões com 1 mês provavelmente porque nessa idade não houve tempo suficiente para as células responderem ao estímulo mecânico do exercício não forçado, já que em tendões flexores digitais superficiais de frangos na mesma idade (Nakagaki et al., em submissão – artigo II) não foi encontrada diferença no conteúdo de colágeno. Para reforçar nossa idéia, Benevides e colaboradores (2004) constataram que os tendões flexores digitais superficiais de frangos com 2 meses criados em ambiente amplo exibiam maior quantidade desta proteína na região de tensão em relação aos criados em gaiolas.

Além do colágeno o tendão também contém proteoglicanos e glicosaminoglicanos. A capacidade que estas macromoléculas têm de se ligar à água é considerável e capaz de favorecer o tendão a resistir às forças de compressão e de cisalhamento (Scott, 1997). Muitos estudos têm demonstrado maior concentração de glicosaminoglicanos na região de compressão do que na região de tensão (Feitosa et al., 2002; Benevides et al., 2004; Feitosa et al., 2005; Lin et al., 2005b). Assim, nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois todas as regiões de compressão aqui estudadas apresentaram maior conteúdo de glicosaminoglicanos, tanto para *caged* quanto para *penned*.

Nos tendões analisados foi verificado um aumento do conteúdo de glicosaminoglicanos na região de compressão e uma diminuição na região de tensão com o avanço da idade, com exceção para o grupo *caged* que apresentou a mesma concentração de glicosaminoglicanos na região Cd

de 1 e 8 meses. Nossos dados estão de acordo com os de Lin e colaboradores (2005b) que observaram em tendões de cavalos uma diminuição de glicosaminoglicanos na região de tensão e um aumento na região de compressão do nascimento até a maturidade. Apesar de que Lin e colaboradores (2005b) tenham utilizado outra espécie, deve-se considerar que tanto as forças de tração quanto as de compressão produzem o mesmo tipo de estímulo mecânico na matriz extracelular dos tendões.

Os tendões demonstram capacidade de remodelamento como resposta ao exercício físico (Buchanan & Marsh, 2002), como também alterações bioquímicas que envolvem as células e a matriz extracelular com o avanço da idade (Ippolito et al., 1980). Qualquer alteração na organização dos componentes da matriz como resposta ao *stress* mecânico e a idade expõe a célula a um desequilíbrio de forças (Vidal, 1993), ativando mecanismos eletroquímicos que monitoram a matriz (Gillard et al., 1979). O estudo com tendões submetidos a exercícios estrênuos, como o do estudo de Curwin e colaboradores (1988), mostram que sua adaptação a este tipo de exercício é seguida de alterações bioquímicas importantes. Por outro lado, o exercício forçado associado ao envelhecimento pode responder diferentemente dependendo da função e do nível de atividade do tendão (Nielsen et al., 1998). Nossos experimentos mostraram que algumas variações biomecânicas e bioquímicas no CT são dependentes do próprio processo de crescimento e de maturação, mas também é influenciado pelo estímulo mecânico, de intensidade variada, resultante do exercício ativo não forçado. Isto indica que a matriz extracelular é capaz de detectar alterações físicas como andar e correr e de transmitir esta informação para as células que são responsáveis pela expressão e síntese de macromoléculas da matriz.

Agradecimentos

Ao aviário “Fazenda Aves do Paraíso” (Itatiba, SP) por terem nos cedido os animais deste estudo. Wilson Romero Nakagaki recebeu bolsa do CNPq, Adriano Biancalana da FAPESP (04/14358-5) e Gustavo P. Benevides da CAPES, e o projeto auxílio FAPESP (2006/00044-4).

Referências

- Abramowitch, S.D., Papageorgiou, C.D., Debski, R.E., Clineff, T.D., Woo, S.L., 2003. A biomechanical and histological evaluation of the structure and function of the healing medial collateral ligament in a goat model. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 11, 155-162.
- Barfred, T., 1971. Experimental rupture of the Achilles tendon. Comparison of experimental ruptures in rats of different ages and living under different conditions. *Acta Orthop. Scand.* 42, 406-422.
- Benevides, G.P., Pimentel, E.R., Toyama, M.H., Novello, J.C., Marangoni, S., Gomes, L., 2004. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect. Tissue Res.* 45, 206-15.
- Benjamin, M., Ralphs, J. R., 2004. Biology of fibrocartilage cells. *Int. Rev. Cytol.* 233, 1-45.
- Buchanan, C.I., Marsh, R.L., 2001. Effects of long-term exercise on the biomechanical properties of the Achilles tendon of guinea fowl. *J. Appl. Physiol.* 90, 164-171.
- Buchanan, C.I., Marsh, R.L., 2002. Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133, 1101-1107.
- Callegari-Jacques, S.M., 2003. *Bioestatística: princípios e aplicações*, 1st ed. Artmed, Porto Alegre.
- Cherdchutham, W., Meershoek, L.S., van Weeren, P.R., Barneveld, A., 2001. Effects of exercise on biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon in foals. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1859-1864.
- Curwin, S.L., Vailas, A.C., Wood, J., 1988. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* 65, 2297-2301.

- Daley, M.A., Biewener, A.A., 2003. Muscle force-length dynamics during level versus incline locomotion: a comparison of in vivo performance of two guinea fowl ankle extensors. *J. Exp. Biol.* 206, 2941-2958.
- Devkota, A.C., Weinhold, P.S., 2003. Mechanical response of tendon subsequent to ramp loading to varying strain limits. *Clin. Biomech. (Bristol, Avon)* 18, 969-974.
- Dowling, B.A., Dart, A.J., 2005. Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *Vet. J.* 170, 184-192.
- Dressler, M.R., Butler, D.L., Wenstrup, R., Awad, H.A., Smith, F., Boivin, G.P., 2002. A potential mechanism for age-related declines in patellar tendon biomechanics. *J. Orthop. Res.* 20, 1315-1322.
- Esquisatto, M.A.M., Joazeiro, P.P., Pimentel, E.R., Gomes, L., 2003. Ultrastructural characteristics of tensional regions and tendons from rats of different ages. *Braz. J. Morphol. Sci.* 20, 109-114.
- Farndale, R. W., Buttle, D. J., Barret, A. J., 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta* 883, 173-177.
- Feitosa, V.L.C., Esquisatto, M.A.M., Joazeiro, P.P., Gomes, L., Felisbino, S.L., Pimentel, E.R., 2002. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. *Cell. Mol. Biol.*, 48, OL359-OL367.
- Feitosa, V.L.C., Esquisatto, M.A.M., Joazeiro, P.P., Gomes, L., Felisbino, S.L., Pimentel, E.R., 2005. Physicochemical and structural analysis of three regions of the deep digital flexor tendon of pigs. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 113-119.
- Ghetie, V., Chitescu, S.T., Cotofan, V., Hillebrand, A., 1981. Atlas de anatomia de las aves domésticas. Acribia-Paraninfo, Zaragoza and Madrid.
- Gillard, G.C., Reilly, H.C., Bell-Booth, P.G., Flint, M.H., 1979. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycans content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect. Tissue Res.* 7, 37-46.

- Gupte, C.M., Smith, A., Jamieson, N., Bull, A.M.J., Thomas, R.DeW., Amis, A.A., 2002. Meniscomfemoral ligaments – structural and material properties. *J. Biomech.* 35, 1623-1629.
- Ippolito, E., Natali, P.G., Postacchini, F., Accinni, L., Martino, C., 1980. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J. Bone Joint Surg. Am.* 62A, 583-598.
- Järvinen, T.A.H., Järvinen, T.L.N., Kannus, P., Józsa, L., Järvinen, M., 2004. Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *J. Orthop. Res.* 22, 1303-1309.
- Józsa, L.G., Kannus, P., 1997. Human tendons. *Anatomy, Physiology and Pathology.* Champaign, IL. *Human Kinetics.*
- Kannus, P., 2000. Structure of tendon connective tissue. *Scand. J Med. Sci. Sports* 10, 312-320.
- Lin, Y.L., Brama, P.A.J., Kiers, G.H., DeGroot, J., van Weeren, R., 2005a. Functional adaption through changes in regional biochemical characteristics during maturation of equine superficial digital flexor tendons. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1623-1629.
- Lin, Y.L., Brama, P.A., Kiers G.H., van Weeren, P.R., DeGroot, J., 2005b. Extracellular matrix composition of the equine superficial digital flexor tendon: relationship with age and anatomical site. *J. Vet. Med. A*, 52, 333-338.
- Maganaris, C.N., Paul, J.P., 2002. Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon. *J. Biomech.* 35, 1639-1646.
- Maganaris, C.N., Narici, M.C., Almekinders, L.C., Maffulli, N., 2004. Biomechanics and pathophysiology of overuse tendon injuries. *Sports Med.* 34, 1005-1017.
- Malaviya, P., Butler, D.L., Korvick, D.L., Proch, F.S., 1998. In vivo tendon forces correlate with activity level and remain bounded: evidence in a rabbit flexor tendon model. *J. Biomech.* 31, 1043-1049.

- Mays, P.K., McAnulty, R.J., Campa, J.S., Laurent, G.J., 1991. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. *Biochem. J.* 276, 307-313.
- Michelacci, Y.M., Horton, D.S.P.O., 1989. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 92, 651-658.
- Nakagaki, W.R., Benevides, G.P., Gomes, L., Em submissão. Efeito da idade e do ambiente de criação em tendão de frangos II - Tendão Flexor Digital Superficial. *Mech. Ageing Dev.*
- Nielsen, H.M., Skalicky, M., Viidik, A., 1998. Influence of physical exercise on aging rats III. Life-long exercises modifies the aging changes of the mechanical properties of limb muscle tendons. *Mech. Ageing Dev.* 100, 243-260.
- Nordin, M., Lorenz, T., Campello, M., 2001. Biomechanics of tendons and ligaments. In: Nordin, M., Frankel, V.H., *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 102-125.
- O'Brien, M., 1997. Structure and metabolism of tendons. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 7, 55-61.
- Özkaya, N., Nordin, M., 1998. *Fundamentals of biomechanics: equilibrium, motion, and deformation*. 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Patterson-Kane, J.C., Firth, E.C., Goodship, A.E., Parry, D.A.D., 1997. Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. *Aust. Vet. J.*, 75, 39-44.
- Provenzano, P.P., Vanderby Jr., R., 2006. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.* 25, 71-84.
- Rosanger, S., Aagaard, P., Dyhre-Poulsen, P., Neergaard, K., Kjaer, M., Magnusson, S.P., 2002. Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 12, 90-98.

- Scott, P.G., Nakano, T., Dodd, C.M., 1997. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Bioch. Biophys. Acta* 1336, 254-262.
- Shadwick, R.E., 1990. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J. Appl. Physiol.* 68, 1033-1040.
- Sparrow, K.J., Finucane, S.D., Owen, J.R., Wayne, J.S., 2005. The effects of low-intensity ultrasound on medial collateral ligament healing in the rabbit model. *Am. J. Sports Med.* 33, 1048-1056.
- Stegemann, H., Stalder, K., 1967. Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta* 18, 267-273.
- Stone, M.H., 1988. Implications for connective tissue and bone alterations resulting from resistance exercise training. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 20, S162-S168.
- Tohyama, H., Yasuda, K., 2000. The effects if stress enhancement on the extraceellular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J. Biomech.* 33, 559-565.
- Vanden Berge, J.C., 1981. Miologia das aves. In: Sisson, S., Grossman, D., *Anatomia dos Animais Domésticos*. 5 ed. Interamericana. pp.1691-1728.
- Vidal, B.C., Carvalho, H.F., 1990. Aggregational State and Molecular Order of Tendons as a Function of Age. *Matrix* 10, 48-57.
- Vidal, B.C., 1993. Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Rev. Fac. Ciên. Med. Unicamp* 4, 1-6.
- Viidik, S., 1969. Tensile strength properties of Achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. *Acta Orthop. Scabd.* 40, 261-272.
- Vilarta R., Vidal B.C., 1989. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation, aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix* 9, 55-6.



- Vogel, K.G., 2003. Tendon structure and response to changing mechanical load. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 3, 323-325.
- Wilmink, J., Wilson, A.M., Goodship, A.E., 1992. Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Res. Vet. Sci.* 53, 354-359.
- Woo, S.L-Y., Ritter, M.A., Amiel, D., Sanders, M., Gomez, M.A., Kuei, S.C., Garfin, S.R., Akeson, W.H., 1980. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons – long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect. Tissue Res.* 7, 177-183.
- Woo, S.L-Y., Gomez, M.A., Amiel, D., Ritter, M.A., Gelberman, R.H., Akeson, W.H., 1981. The effects of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. *J. Biomech. Eng.* 103, 51-56.
- Woo, S.L-Y., Debski, R.E., Withrow, J.D., Janaushek, M., 1999. Biomechanics of knee ligaments. *Am. J. Sports Med.* 27, 533-543.
- Zajac, E.F., 1989. Muscle and tendon: properties, models, scaling and application to biomechanics and motor control. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17, 359-411.

Artigo II a ser submetido ao periódico *Mechanisms of Ageing and Development*

Efeito da idade e do ambiente de criação em tendão de frangos II - Tendão flexor digital superficial

Resumo

Os tendões transmitem forças de tração entre músculo e osso, permitindo o movimento articular. Estudos mostraram que alterações na matriz extracelular podem ser induzidas pelo exercício e pela idade. Foi analisado o SDFT de frangos com 1, 5 e 8 meses de idade, criados em ambiente amplo e restrito. Para a análise biomecânica foram analisados os tendões inteiros e para a bioquímica os tendões foram divididos em regiões de tensão e de compressão, para quantificação de hidroxiprolina e glicosaminoglicanos. Os resultados mostraram sinal de mineralização no quinto mês. Com a maturação do grupo *penned* a força (até o quinto mês) e a absorção de energia aumentaram, mas não alterou a rigidez, a tensão e a deformação. O exercício demonstrou que força, tensão e rigidez foram maiores no quinto mês. O conteúdo de colágeno aumentou com a idade do grupo *penned* e com o exercício no quinto e oitavo meses. O conteúdo de glicosaminoglicanos diminuiu na região de tensão no oitavo mês no grupo amplo enquanto na região de compressão se manteve constante a partir do quinto mês. Com o exercício a expressão de glicosaminoglicanos é substancialmente maior em SDFT jovens do que em maturos. Nosso experimento mostrou que algumas variações biomecânicas e bioquímicas são dependentes do crescimento, mas também são influenciadas pelo exercício.

Palavras-chave: tendão, frango, biomecânica, exercício, idade e colágeno.

1. Introdução

Os tendões são responsáveis pela transmissão da força mecânica resultante da contração muscular ao osso, originando os movimentos articulares. Além de influenciar a performance mecânica dos músculos, os tendões agem como molas biológicas que se alongam elasticamente, armazenando e liberando energia durante a locomoção (Zajac, 1989).

Alguns músculos se encontram longe do segmento ósseo ou articulação que poderão ser movimentados sem requerer um comprimento excessivo de suas fibras musculares graças aos seus tendões (Nordin et al., 2001). Um exemplo é a localização anatômica dos músculos flexores digitais de frangos na extremidade proximal do tibiotarso. A contração destes músculos é capaz, principalmente, de flexionar os dedos e, secundariamente, estender o tarsometatarso por intermédio dos tendões flexores superficiais digitais (SDFT). Estes tendões são poliarticulares, têm forma cilíndrica e se inserem nas falanges distais II, III e IV (Ghetie et al., 1981; Vanden Berge, 1981).

As forças mecânicas sobre os tendões durante a locomoção normal são afetadas normalmente por vários fatores como diferentes níveis de cargas mecânicas para diferentes tendões (Maganaris & Paul, 2002), assim como diferentes atividades induzem diferentes níveis de força até em um mesmo tendão (Malaviya et al., 1998).

Dependendo da localização anatômica pode ocorrer uma variação regional na morfologia e composição da matriz extracelular quando o tendão está sujeito a forças compressivas e friccionais além da tensão normal exercida pelos músculos. As forças de compressão levam ao desenvolvimento de fibrocartilagem, estimulando a síntese de colágeno tipo II e de proteoglicanos (Benjamin and Ralphs, 2004). Este tipo de estímulo mecânico tem feito com que

pesquisadores analisassem de forma distinta as regiões de tensão e as regiões de tensão/compressão de um mesmo tendão (Feitosa et al., 2002; Benevides et al., 2004).

Os tendões são constituídos por proteoglicanos, elastina e principalmente por colágeno tipo I que representa cerca de 65-80% da massa seca (Kannus, 2000). A resistência tendínea não é determinada somente pelas ligações inter e intramoleculares nas fibras de colágeno, mas também pela organização supramolecular e macroscópica das fibras de colágeno na matriz extracelular (Parry et al., 1978). As fibras de colágeno apresentam arranjos regulares e sinuosos denominados *crimp* (Gathercole and Keller, 1991) que é uma característica morfológica, visualizada pela microscopia de polarização (Vidal, 1995), e que pode variar o padrão morfológico, periodicidade e amplitude dependendo da região do tendão (O'Brien, 1997). Os pequenos proteoglicanos também estão presentes nos tendões e exercem importante papel na fibrilogênese do colágeno. Estudos mostram que os pequenos proteoglicanos decorim, lumican e fibromodulin regulam a formação, a organização e a maturação das fibrilas de colágeno, a hidratação do tecido e também facilitam o deslizamento intra e interfibrilar durante o carregamento (Provenzano and Vanderby Jr., 2006).

Estudos com animais têm mostrado que diferentes mudanças bioquímicas na matriz extracelular e alterações no comportamento biomecânico de tendões podem ser induzidas pela presença de estímulos mecânicos resultantes de diferentes níveis de atividade física, tanto de exercícios forçados em porcos (Woo et al., 1980; Woo et al., 1981), frangos (Curwin et al., 1988) e galinhas de Angola (Buchanan and Marsh, 2001) quanto de não-forçados em frangos (Benevides et al., 2004; Nakagaki et al., em submissão – artigo I) e em potros (Cherdchuthan et al., 2001). Outros pesquisadores têm demonstrado que estas alterações bioquímicas e

biomecânicas também sofrem influência do desenvolvimento e maturação (Lin et al., 2005a) e envelhecimento (Nielsen et al., 1998).

Durante sua maturação e envelhecimento os tendões sofrem um processo adaptativo em resposta às demandas mecânicas e aos diferentes estados metabólicos (Landis and Silver, 2002). Muitos trabalhos têm demonstrado a mineralização, principalmente de cálcio, em tendão de aves domésticas, principalmente em perus (Landis et al., 2002; Landis and Silver, 2002) e em frangos (Abdalla, 1979). Análises histológicas têm mostrado mineralização no terço distal da região de tensão do tendão flexor digital superficial em frangos com 8 meses de idade (Biancalana, comunicação pessoal). A calcificação em tendões humanos está associada às condições patológicas enquanto que em aves é parte do desenvolvimento fisiológico dos tendões (Józsa and Kannus, 1997). A mineralização parece envolver a nucleação e depósito de mineral em associação com as superfícies da molécula de colágeno (Landis and Silver, 2002). Observações morfológicas indicam que a mineralização ocorre nas proximidades do centro do tendão (Siperko and Landis, 2001), onde se observa a presença de vesículas contendo hidroxiapatita (Landis and Silver, 2002).

Poucos trabalhos mostram estudos com tendões de frangos. Este trabalho investigou as alterações biomecânicas e bioquímicas no SDFT de frangos com 1, 5 e 8 meses *caged* com restrição de movimentos de deambulação e *penned* sob a prática de exercício ativo não forçado, ou seja, em atividades voluntárias como andar, correr, ciscar e levantar/abaixar.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Frangos da linhagem Pedrês, *Gallus Domesticus*, com 1 dia de idade foram divididos em dois grupos, um grupo *caged* criados em 0,5 m² (3 animais), no Biotério do Departamento de Biologia Celular – IB/UNICAMP, e o *penned* criados em 60 m² (3 animais), portanto com área livre para deambular. Após 1 mês (1M), 5 meses (5M) e 8 meses (8M) de idade representantes de cada grupo foram sacrificados e seus tendões analisados.

2.2. Material Biológico

Os animais dos 2 grupos foram anestesiados com 2mL hidrato de cloral iv (10%) e sacrificados com 1mL de KCl 4M e pesados. O SDFT foi submetido a análises bioquímicas e biomecânicas. Para a análise bioquímica o SDFT foi dividido em 2 regiões: uma que sofre forças compressivas além da força de tensão inerente a toda extensão do tendão (região proximal – Sp) e outra que sofre principalmente forças tensionais (região distal – Sd) (Benevides et al., 2004). A região Sp contorna a tróclea da tíbia e a Sd está sobre os dois terços da porção distal posterior do osso tarsometatarsal (Ghetie et al., 1981; Vanden Berge, 1981). Para o teste biomecânico os tendões foram retirados em peça única. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNICAMP.

2.3. Teste Biomecânico

Para os ensaios mecânicos sob tração uniaxial foram utilizados 10 tendões. Antes do início do teste foi determinado com paquímetro o comprimento inicial do SDFT e no ponto médio da região distal foram mensuradas a largura e a espessura. Com estas medidas foi obtida a área de secção transversa (CSA). A construção das curvas força-deslocamento e tensão-deformação e os cálculos de módulo elástico e de energia absorvida até o ponto de força máxima foram feitos de acordo com Nakagaki e colaboradores (em submissão – artigo I). Esses testes foram realizados no Laboratório de Propriedades Mecânicas na Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP.

2.4. Quantificação de Hidroxiprolina

A determinação do conteúdo de hidroxiprolina, que é proporcional à concentração de colágeno, foi baseada em Stegemann and Stalder (1967). Amostras das regiões de tensão e de compressão foram hidrolisadas em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 16h a 107°C. Do material hidrolisado, foram utilizados 5µL para cada leitura, sendo acrescentado posteriormente 1mL de solução de cloramina-T. Após 20min foi adicionado 1mL de solução de ácido perclórico/aldeído e o material foi mantido em incubação por 15min a 60°C, resfriado até 20°C e lido em espectrofotômetro, $\lambda = 550\text{nm}$.

2.5. Obtenção e quantificação dos glicosaminoglicanos

Amostras de cada região do tendão foram desidratados com acetona e os GAGs foram obtidos após tratamento com papaína (40mg/g de tecido) em tampão citrato de sódio 30mM pH 6.5 contendo EDTA 40mM e 2-mercaptoetanol 80mM e incubados a 50° C por 24h. O material foi centrifugado a 5.900 g por 5min. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol e mantidos a 4° C por 24h, e posteriormente centrifugado novamente. O precipitado foi lavado com etanol 80% e mantido em estufa a 37° C até a secagem total e ressuspendido em água destilada (Michelacci and Horton, 1989). O conteúdo de GAGs foi determinado pelo método de azul de dimetilmetileno (Farndale et al., 1986), e lido em espectrofotômetro, $\lambda = 526\text{nm}$.

2.6. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) One-Way seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância (Callegari-Jacques, 2003).

3. Resultados

Durante o experimento os animais foram pesados, e ocorreu diferença significativa entre as idades, mas não entre os ambientes como demonstrado por Nakagaki e colaboradores (em submissão – artigo I).

A medida da CSA foi significativamente diferente entre os animais *penned* de todas as idades enquanto que os animais *caged* apresentaram diferença significativa entre as idades de 1 e 5 e de 1 e 8 meses (Tabelas 1 e 2).

Os dados obtidos com os teste de tração mostram que para animais de ambientes diferentes ocorreu diferença significativa o valor da força máxima para as idades de 1 e 5 meses (Figs. 1.a e 1.b e Tabela 2). Comparando os animais criados em mesmo ambiente o valor da força máxima aumentou até o quinto mês com diferenças significativas entre animais com 1 mês vs 5 meses e 1 mês vs 8 meses (Figs. 2.a e 2.b e Tabela 2), e o deslocamento máximo foi diferente entre 1 mês vs 5 meses e 1 mês vs 8 meses (Figs. 2.a e 2.b e Tabela 2). Comparando os animais dos dois ambientes a diferença para o deslocamento máximo foi observada somente nos grupos com 1 mês (Fig. 1.a e Tabela 2). Para animais de mesmo ambiente a absorção de energia até a ruptura aumentou com a idade, enquanto que a diferença entre os dois ambientes ocorreu entre os animais com 1 e 8 meses (Tabelas 1 e 2).

Comparando os ambientes as médias dos valores de tensão máxima apresentaram diferença significativa somente entre os animais com 5 meses (Fig. 3.b e Tabela 2). Entre os animais *caged* ocorreu diferença entre 1 e 5 meses e 5 e 8 meses (Fig. 4.a e Tabela 2). Comparando os ambientes houve diferença na deformação máxima entre os animais com 1 mês (Fig. 3.a e Tabela 2). Os dados do módulo elástico mostraram que entre os animais *caged* houve diferença entre 1 e 5 meses e 5 e 8 meses, enquanto a comparação entre os ambientes mostrou diferença entre os tendões com 5 meses (Tabelas 1 e 2).

Analisando os dados bioquímicos, foi observado que na região de compressão (Sp) a concentração de hidroxiprolina aumentou nos animais *caged* e *penned* até o quinto mês. Comparando os ambientes houve diferença significativa no conteúdo de hidroxiprolina entre

animais de 5 e 8 meses (Tabelas 3 e 4). Para a região de tensão (Sd) não houve diferenças ao comparar os ambientes, porém houve diferença entre os animais *penned* com 1 e 8 meses (Tabelas 3 e 4). Comparando as duas regiões entre si (dados estatísticos não apresentados em tabela), as regiões Sp com 5 meses *caged* ($p<0.05$) e *penned* ($p<0.01$) e com 8 meses *penned* ($p<0.05$) apresentaram maior conteúdo de hidroxiprolina do que suas respectivas regiões Sd.

Com relação ao conteúdo de glicosaminoglicanos ocorreu diferença entre 1 mês vs 5 meses *caged* e entre 1 mês vs 5 meses e 1 mês vs 8 meses *penned* para a região Sp. Comparando os ambientes somente houve diferença entre animais com 1 mês (Tabelas 3 e 4). Para a região Sd, ocorreu diferença entre todas as idades dos animais *caged*, enquanto para os *penned* foram obtidas diferenças entre 1 mês vs 8 meses e entre 5 meses vs 8 meses. Entre os ambientes foram encontradas diferenças entre animais com 1 e com 5 meses. Comparando as duas regiões entre si (dados estatísticos não apresentados em tabela), as regiões Sp dos animais com 1 mês *caged* e *penned* ($p<0.05$), com 5 meses *caged* ($p<0.01$) e com 8 meses *caged* e *penned* ($p<0.01$) apresentaram maior concentração de glicosaminoglicanos do que suas respectivas regiões Sd.

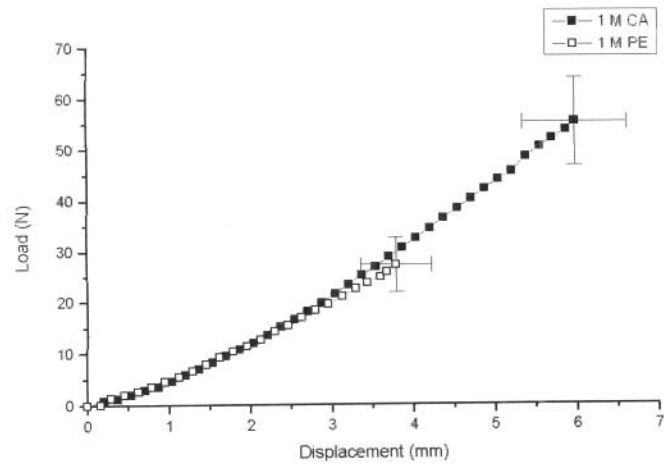
Tabela 1. Propriedades biomecânicas e anatômicas do tendão de frangos de diferentes idades criados em ambientes diferentes. Cross Sectional Area (CSA), 1 mês (1M), 5 meses (5M) e oito meses (8M).

Age	Animals	Energy at Failure (N·mm)	Elastic Modulus (MPa)	CSA (mm ²)
1M	<i>Caged</i>	150.20 ± 32.21	264.78 ± 45.31	2.39 ± 0.68
	<i>Penned</i>	51.20 ± 14.70	266.62 ± 71.52	1.60 ± 0.61
5M	<i>Caged</i>	916.08 ± 93.75	210.39 ± 27.04	14.20 ± 1.75
	<i>Penned</i>	1,141.48 ± 218.06	324.66 ± 80.12	10.40 ± 1.51
8M	<i>Caged</i>	1,207.41 ± 242.64	304.13 ± 78.62	13.79 ± 5.18
	<i>Penned</i>	1,886.76 ± 274.93	287.22 ± 84.47	15.55 ± 4.31

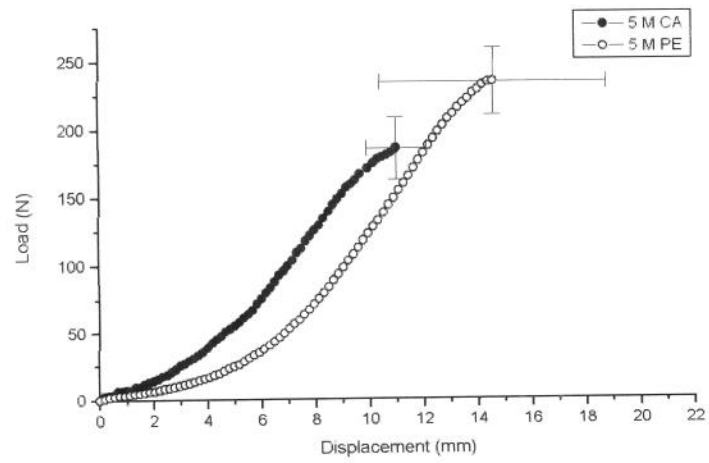
Tabela 2. Comparações estatísticas das propriedades mecânicas e anatômicas do tendão indicando diferenças entre os grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e ns = não significativos). CA e PE são, respectivamente, *caged* e *penned*, enquanto 1M, 5M e 8M são, respectivamente, 1, 5 e 8 meses.

	Maximum Load	Maximum Displacement	Energy at Failure	Maximum Stress	Maximum Strain	Elastic Modulus	CSA
1MCA vs 1MPE	**	**	**	ns	**	ns	*
5MCA vs 5MPE	*	ns	ns	*	ns	*	**
8MCA vs 8MPE	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
1MCA vs 5MCA	**	**	**	*	ns	*	**
1MCA vs 8MCA	**	**	**	ns	ns	ns	**
5MCA vs 8MCA	ns	ns	*	*	ns	*	ns
1MPE vs 5MPE	**	**	**	ns	ns	ns	**
1MPE vs 8MPE	**	**	**	ns	ns	ns	**
5MPE vs 8MPE	ns	ns	**	ns	ns	ns	*

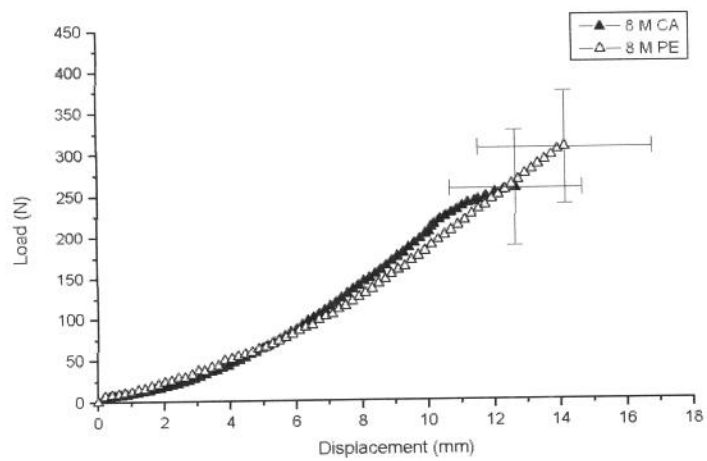
Fig. 1. Curva load-displacement para o tendão flexor digital superficial comparando animais de mesma idade porém criados *caged* (CA) ou *penned* (PE). Em (a) animais com 1 mês de idade onde os valores de força máxima e de deslocamento máximo são, respectivamente, $55.60 \pm 8.62\text{N}$ e $5.97 \pm 0.64\text{mm}$ para o grupo *caged* (CA -■-) e $27.23 \pm 5.44\text{N}$ e $3.79 \pm 0.43\text{mm}$ para o grupo *penned* (PE -□-). (b) animais com 5 meses de idade com valores de força máxima e de deslocamento máximo, respectivamente, de $185.26 \pm 23.01\text{N}$ e $11.01 \pm 1.11\text{mm}$ para o grupo *caged* (CA -●-) e de $234.42 \pm 24.59\text{N}$ e $14.57 \pm 4.18\text{mm}$ para o grupo *penned* (PE -○-). (c) animais com 8 meses de idade onde os valores de força máxima e de deslocamento máximo são, respectivamente, $254.92 \pm 70.44\text{N}$ e $12.63 \pm 1.99\text{mm}$ para o grupo *caged* (CA -▲-) e $305.67 \pm 68.11\text{N}$ e $14.13 \pm 2.63\text{mm}$ para o grupo *penned* (PE -△-). Vide valor de *p* na tabela 2.



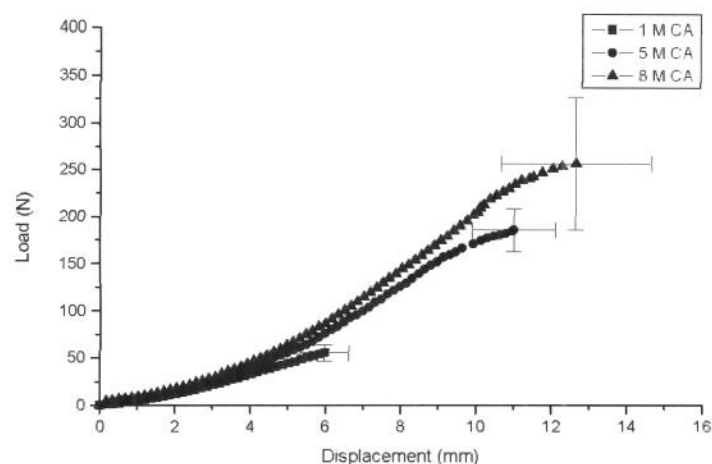
(a)



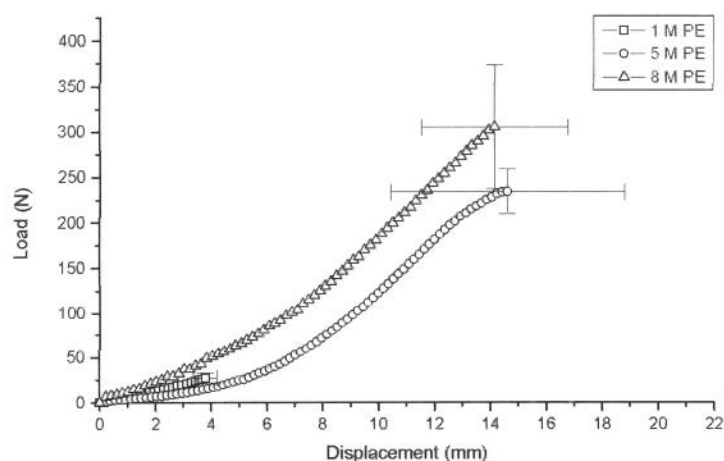
(b)



(c)



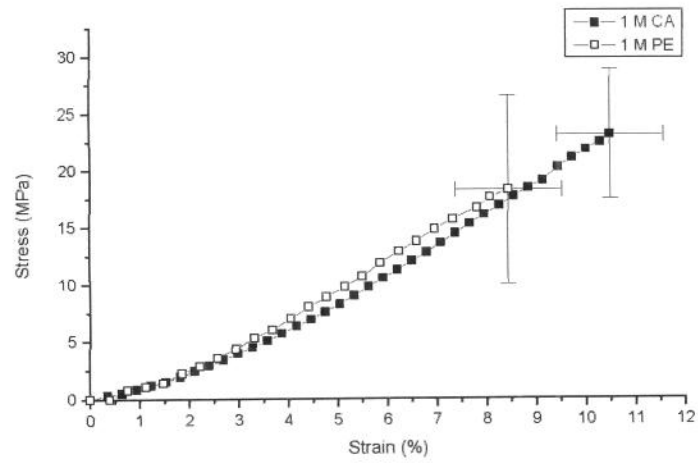
(a)



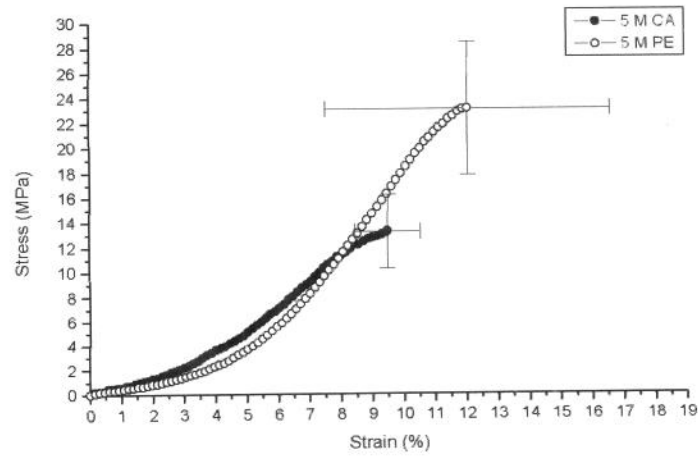
(b)

Fig. 2. Curva load-displacement para o tendão flexor digital superficial comparando animais de idades diferentes criados em mesmo ambiente. Em (a) animais *caged* (CA), onde os valores de força máxima e de deslocamento máximo, com 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, $55.60 \pm 8.62\text{N}$ e $5.97 \pm 0.64\text{mm}$ (-■-), $185.26 \pm 23.01\text{N}$ e $11.01 \pm 1.11\text{mm}$ (-●-) e $254.92 \pm 70.44\text{N}$ e $12.63 \pm 1.99\text{mm}$ (-▲-). (b) animais *penned* (PE) com valores de força máxima e de deslocamento máximo para 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, $27.23 \pm 5.44\text{N}$ e $3.79 \pm 0.43\text{mm}$ (-□-), $234.42 \pm 24.59\text{N}$ e $14.57 \pm 4.18\text{mm}$ (-○-) e $305.67 \pm 68.11\text{N}$ e $14.13 \pm 2.63\text{mm}$ (-△-). Vide valor de p na tabela 2.

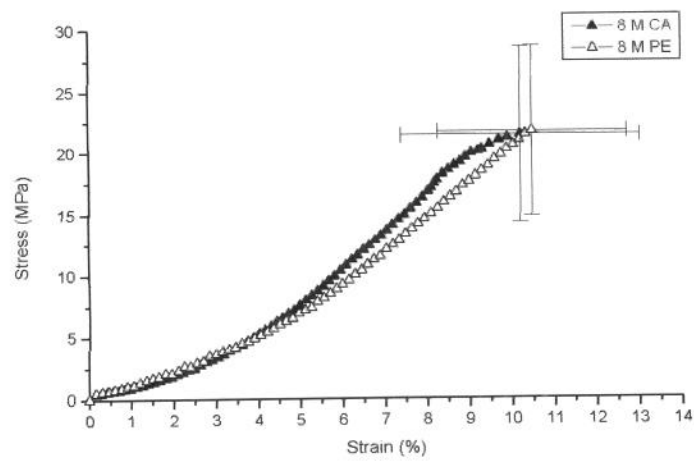
Fig. 3. Curva Stress-Strain para o tendão flexor digital superficial de animais de mesma idade porém criados em ambiente diferente. (a) animais com 1 mês de idade apresentando valores de tensão máxima e de deformação máxima, respectivamente, de $23.18 \pm 6.34\text{MPa}$ e $10.4 \pm 1.00\%$ para o grupo *caged* (CA -■-) e de $19.51 \pm 8.32\text{MPa}$ e $8.30 \pm 1.00\%$ para o grupo *penned* (PE -□-). (b) animais com 5 meses de idade com valores de tensão máxima e de deformação máxima, respectivamente, de $13.20 \pm 2.49\text{MPa}$ e $9.50 \pm 1.00\%$ para o grupo *caged* (CA -●-) e de $23.10 \pm 5.34\text{MPa}$ e $12.00 \pm 4.50\%$ para o grupo *penned* (PE -○-). (c) animais com 8 meses de idade onde os valores de tensão máxima e de deformação máxima são, respectivamente, $21.45 \pm 7.73\text{MPa}$ e $10.50 \pm 2.80\%$ para o grupo *caged* (CA -▲-) e $21.43 \pm 9.11\text{MPa}$ e $10.70 \pm 2.20\%$ para o grupo *penned* (PE -△-). Vide valor de *p* na tabela 2.



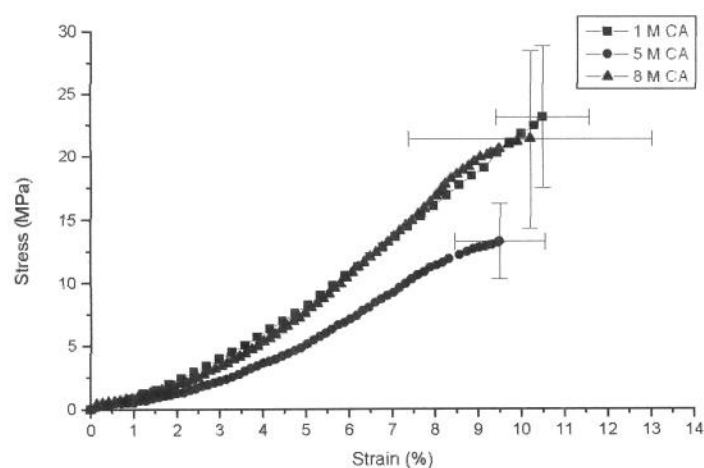
(a)



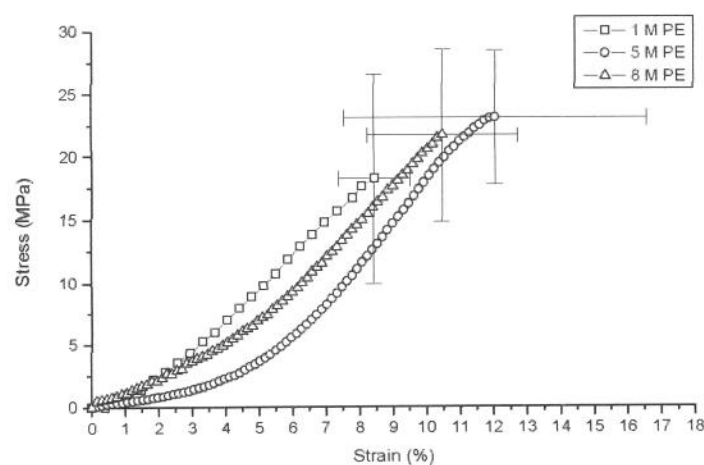
(b)



(c)



(a)



(b)

Fig. 4. Curva Stress-Strain para o tendão flexor digital superficial de animais de idades diferentes porém criados em mesmo ambiente. (a) animais *caged* (CA) com valores de tensão máxima e de deformação máxima para 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, $23.18 \pm 6.34 \text{ MPa}$ e $10.4 \pm 1.00\%$ (-■-), $13.20 \pm 2.49 \text{ MPa}$ e $9.50 \pm 1.00\%$ (-●-) e $21.45 \pm 7.73 \text{ MPa}$ e $10.50 \pm 2.80\%$ (-▲-). (b) animais *penned* (PE) com valores de tensão máxima e de deformação máxima para 1, 5 e 8 meses de idade são, respectivamente, $19.51 \pm 8.32 \text{ MPa}$ e $8.30 \pm 1.00\%$ (-□-), $23.10 \pm 5.34 \text{ MPa}$ e $12.00 \pm 4.50\%$ (-○-) e $21.43 \pm 9.11 \text{ MPa}$ e $10.70 \pm 2.20\%$ (-△-). Vide valor de p na tabela 2.

Tabela 3. Concentração de hidroxiprolina (Ho-Pro) (mg/g de tecido úmido) e glicosaminoglicanos (GAGs) (mg/g – de tecido seco seco) em cada região do tendão. Sp – região proximal e Sd – região distal, sendo 1M, 5M e 8M são, respectivamente, 1, 5 e 8 meses.

		1MCA	1MPE	5MCA	5MPE	8MCA	8MPE
Ho-Pro	Sp	23.07 ± 4.28	27.38 ± 4.14	30.93 ± 3.07	42.17 ± 7.12	33.38 ± 4.10	44.54 ± 7.94
	Sd	25.30 ± 2.50	24.30 ± 5.78	26.42 ± 3.06	28.31 ± 4.58	28.91 ± 6.46	32.99 ± 5.43
GAGs	Sp	4.91 ± 1.41	19.05 ± 5.65	8.32 ± 1.87	7.18 ± 1.89	7.15 ± 2.81	6.51 ± 1.71
	Sd	3.32 ± 0.64	12.62 ± 3.82	4.15 ± 0.55	8.69 ± 3.56	1.98 ± 0.20	1.54 ± 0.59

Tabela 4. Comparações estatísticas das concentrações hidroxiprolina (Ho-Pro) e glicosaminoglicanos (GAGs) indicando diferenças entre os grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e ns = não significativo).

	Ho-Pro		GAGs	
	Sp	Sd	Sp	Sd
1MCA vs 1MPE	ns	ns	**	**
5MCA vs 5MPE	**	ns	ns	*
8MCA vs 8MPE	*	ns	ns	ns
1MCA vs 5MCA	**	ns	**	*
1MCA vs 8MCA	**	ns	ns	**
5MCA vs 8MCA	ns	ns	ns	**
1MPE vs 5MPE	**	ns	**	ns
1MPE vs 8MPE	**	*	**	**
5MPE vs 8MPE	ns	ns	ns	**

4. Discussão

A principal função dos tendões é unir o músculo ao osso e transmitir as forças de tração entre eles, permitindo que o músculo se encontre longe do segmento ósseo ou articulação que poderá ser movimentada (Nordin et al., 2001). Este é o caso do tendão flexor digital superficial de frangos que pode flexionar os dedos durante o movimento de ciscar, por exemplo, ao transferir a força da contração do músculo flexor digital superficial que se encontra predominantemente nos dois terços superiores do osso tibiotarso.

O peso corporal neste estudo não apresentou diferença entre os animais *caged* e os animais *penned* em todas as idades analisadas. Deste modo, a tensão no tendão não foi influenciada pelo peso do animal enquanto que uma tensão adicional pode ser oriunda apenas do exercício ativo não forçado praticado pelo grupo *penned*. Estes resultados são semelhantes ao que foram obtidos com o tendão calcâneo de frangos na mesma idade, 1, 5 e 8 meses (Nakagaki et al., em submissão – artigo I) e com o tendão flexor digital superficial (Benevides et al., 2004) de frangos com 2 meses de idade também submetidos ao exercício ativo não forçado.

Neste estudo a CSA dos tendões *caged* aumentou até o quinto mês, enquanto que nos grupos *penned* aumentou até o fim do experimento, sendo possível observar que as áreas dos tendões *caged* foram maiores do que os *penned* em animais com 1 e com 5 meses. Estes dados são semelhantes com os descritos na literatura para este mesmo tendão e animal (Benevides et al., 2004). Como os tendões dos animais *caged* de 1 mês apresentaram maior CSA e maior força máxima do que os tendões dos animais *penned* de mesma idade não foi possível verificar diferença significativa para a tensão máxima, pois uma área maior é capaz de minimizar a tensão no tendão (Rosanger et al., 2002). Nos grupos com 8 meses deste experimento também não

houve diferença na tensão máxima, pois apresentaram a mesma dimensão e resistência à força máxima de tração, enquanto que os tendões *penned* com 5 meses apresentaram maior tensão máxima do que seu par. Na literatura não foi encontrada diferença no valor da tensão máxima para SDFT de potros que se exercitaram somente com movimentos voluntários até o desmame (5 meses) quando comparados aos tendões não-exercitados dos animais criados no estábulo (Cherdchuthan et al., 2001). No entanto deve se levar em consideração que potros são quadrúpedes e que podem ocorrer diferenças na resposta mecânica deste tecido entre as espécies consideradas.

Com o progresso da idade os SDFT do grupo *penned* resistiram a mesma tensão durante todo o experimento, apesar do aumento da força, pois a CSA aumentou com o crescimento. Esta similaridade do valor da tensão máxima entre as idades neste estudo é resultado do crescimento do animal e, conseqüentemente, do crescimento do tendão, fazendo que a normalização dos parâmetros força e área sejam semelhantes. Nossos resultados se assemelham àquele descrito na literatura quando foi estudado o tendão calcâneo (extensor da articulação intertarsiana) de frangos, submetidos ao mesmo tipo de exercício (Nakagaki et al., em submissão – artigo I). O SDFT (flexor) manteve a mesma resistência à tensão do início ao fim do experimento semelhante ao tendão calcâneo (extensor), apesar de exercerem funções distintas. O grupo *caged*, por sua vez, demonstrou uma abrupta redução da resistência à tensão no quinto mês. Esta redução provavelmente está relacionada com a quantidade diminuída e organização dos componentes colagênicos e não-colagênicos da matriz extracelular (Dowling and Dart, 2005) quando comparada com o *penned* de mesma idade.

Com a idade, a média da força máxima aumentou até o quinto mês como resultado do crescimento do animal, e conseqüentemente das dimensões do tendão, assemelhando-se com o

estudo de Nakagaki e colaboradores (em submissão – artigo I). Por outro lado o exercício ativo não forçado no quinto mês determinou maior pico de força, como foi visto no estudo com ratos (Barfred, 1971), com potros (Cherdchuthan et al., 2001) e com frangos (Benevides et al., 2004) submetidos ao exercício voluntário. No entanto, no primeiro mês o grupo *caged* apresentou o dobro da força máxima da do *penned*, pois tinha a maior área de secção transversa.

O trabalho de Benevides e colaboradores (2004) com SDFT de frangos com 2 meses demonstrou maior deformação máxima para o grupo *penned*, mas nenhuma diferença para o deslocamento máximo médio. Entretanto, nossos dados apresentaram maior deformação e deslocamento para o grupo *caged* com 1 mês quando comparado com o *penned* de mesma idade e nenhuma diferença para estes dois parâmetros dos grupos *caged* e *penned* de 5 e de 8 meses.

Muitos estudos têm demonstrado que tendões de algumas aves normalmente se mineralizam durante a maturação e envelhecimento do animal, como por exemplo, o tendão gastrocnêmio de perus (Siperko and Landis, 2001; Landis and Silver, 2002) e flexores digitais de frangos (Abdalla, 1979). No presente estudo foi observado sinal de mineralização do SDFT a partir dos 5 meses de idade quando a região de tensão macroscopicamente apresentou consistência mais dura e com descontinuidade na coloração do tecido indicando possível processo de mineralização, mas esta característica não foi observada nas porções do tendão que se estendem para os dedos (Biancalana, comunicação pessoal). Este dado apresenta similaridade anatômica da mineralização com o dado radiográfico demonstrado no estudo de Abdalla (1979). Em estudos anteriores foi verificado um aumento no módulo elástico (Landis et al., 1995; Bennett and Stafford, 1988) e da tensão máxima com diminuição da deformação (Landis et al., 1995) durante testes de tração das porções mineralizadas do tendão quando comparadas com as porções não mineralizadas. Entretanto, em nosso experimento não houve um aumento no módulo

elástico, na tensão máxima e na deformação máxima com a idade, provavelmente porque foi testado o tendão inteiro e não somente a região mineralizada. Além disto, o grupo com 5 meses *caged* foi o que apresentou menor valor tanto para módulo elástico quanto para tensão máxima. É importante ressaltar também que todos nossos espécimes se romperam em regiões sem aparente mineralização, com predomínio na região intermediária entre as regiões de tensão e de compressão do tendão, podendo supor que uma porção mineralizada no tendão não interfere no módulo elástico do tendão como um todo.

Alguns estudos têm proposto que a mineralização do tendão é um meio eficiente de conservação da energia de deformação que é armazenada no tendão ao suportar as cargas requeridas para a locomoção da ave adulta (Silver et al., 2000; Freeman and Silver, 2004), e que a quantidade de energia armazenada aumenta com a quantidade e o tempo de mineralização (Freeman and Silver, 2004). A ligação de íons cálcio e fosfato ao colágeno enrijecem suas regiões flexíveis aumentando a quantidade de energia estocada em cada unidade de deformação. Através deste mecanismo, a mineralização transfere mais eficientemente a energia do músculo ao osso (Freeman and Silver, 2004). De acordo com Shadwick (1990) o tendão flexor digital de porcos consegue absorver mais energia a partir do nascimento até atingir sua maturidade. Nossos resultados estão de acordo com estes estudos, pois com o crescimento e maturação dos SDFT na presença da mineralização foi possível observar que os grupos mais velhos foram capazes de absorver maior quantidade de energia durante o teste de tração do que os mais novos, tanto para os *caged* quanto para os *penned*. Comparando os ambientes foi observado que os animais *penned* com 8 meses absorveram mais energia do que os *caged*, apesar de não terem apresentado diferenças tanto na força máxima quanto no deslocamento máximo. Deste modo, podemos supor que os tendões *penned* nesta idade apresentavam mineralização mais acentuada do que os *caged*.

Estudos têm demonstrado que a região de tensão apresenta maior conteúdo de colágeno do que a região de compressão do SDFT com 2 meses (Benevides et al., 2004) e tendão calcâneo com 5 e 8 meses (Nakagaki et al., em submissão – artigo I), ambos de frango, e esta diferenciação regional da síntese de colágeno ocorre porque as fibras de colágeno são responsáveis pela resistência às forças de tração (Scott, 1997). Nossos resultados apresentaram diferença significativa entre as regiões de tensão (Sd) e de compressão (Sp) para os grupos *caged* e *penned* com 5 meses e para *penned* 8 meses, mas o maior conteúdo de colágeno foi encontrado nas regiões Sp, contrariando a literatura. É possível que isto tenha ocorrido por causa da mineralização na região Sd, pois na região pré-calcificada do tendão de peru foi constatada uma diminuição percentual do conteúdo de hidroxiprolina em relação ao aumento da área de secção transversa entre a nona e a décima segunda semana de idade (Leonard et al., 1980), podendo indicar que a taxa de colágeno permaneceu inalterada com o crescimento do tendão durante o processo de mineralização. Deste modo, podemos supor que a mineralização silencia a síntese de colágeno.

A similaridade no conteúdo de colágeno nas regiões de tensão entre os grupos *caged* e *penned* em todas as idades é um indicativo de que uma carga de intensidade similar foi aplicada a estas regiões. No entanto, com a idade houve um aumento do conteúdo de colágeno até o quinto mês na região de compressão para tendões dos dois ambientes provavelmente por causa do crescimento do tendão em um local aparentemente desprovido de mineralização, semelhantemente ao que ocorreu com o tendão calcâneo durante o processo de envelhecimento (Nakagaki et al., em submissão – artigo I).

A análise quantitativa de glicosaminoglicanos deste estudo revelou que o exercício ativo não forçado proporcionou uma expressão de glicosaminoglicanos muito maior nos tendões

penned com 1 mês nas duas regiões (Sp e Sd) do que nos tendões *caged* de mesma idade. Esta grande diferença pode ter ocorrido porque a atividade metabólica do tendão é substancialmente maior na fase inicial do que em animais maduros (Cherdchuthan et al., 2001). A resposta do SDFT para a expressão de glicosaminoglicanos nesta idade frente ao estímulo mecânico do exercício ativo não forçado está de acordo com os resultados para tendão calcâneo de frangos com mesma idade (Nakagaki et al., em submissão – artigo I). Na literatura foi observado que a síntese de GAGs é sensível ao ambiente mecânico no qual o tendão flexor digital profundo de coelhos é exposto (Gillard, 1979).

Do primeiro ao quinto mês foi observada uma diminuição do conteúdo de GAGs na região Sp dos grupos *penned*, mas não para a região Sd. Este conteúdo de GAGs inalterado nas regiões Sd até o quinto mês significa que o exercício ativo não forçado influenciou o comportamento mecânico do tendão e também da composição da matriz extracelular, pois a região correspondente do grupo *caged* apresentou menor concentração de GAGs. Isto é um indicativo para supor que houve aumento no conteúdo de pequenos proteoglicanos, como o decorim e o fibromodulim, os quais interferem no arranjo colagênico do tendão. O decorim é um regulador do diâmetro enquanto o fibromodulim é um estabilizador das fibrilas de colágeno (Iozzo, 1997; Provenzano and Vanderby Jr., 2006). É interessante lembrar que os tendões *penned* com 5 meses apresentaram maior força, tensão, módulo elástico do que os tendões *caged* de mesma idade.

Têm sido descrito que há uma concentração maior de GAGs na região de compressão do que na região de tensão (Feitosa et al., 2002; Benevides et al., 2004; Feitosa et al., 2005; Lin et al., 2005b; Nakagaki et al., em submissão – artigo I). Esse mesmo resultado foi obtido neste

trabalho, pois a maioria das regiões de compressão aqui estudadas apresentaram maior conteúdo de GAGs, tanto em *caged* quanto em *penned*.

A matriz extracelular é capaz de detectar alterações físicas produzidas pela grande área para locomoção e de transmitir esta informação para as células que são responsáveis pela expressão e síntese de macromoléculas da matriz. Em nosso experimento foi observado que a expressão de GAGs é substancialmente maior em SDFT de frangos jovens do que em maturos, indicando intenso processo de organização da matriz extracelular. Além disto, demonstrou que algumas variações biomecânicas e bioquímicas no SDFT são dependentes do próprio processo de crescimento e de maturação, como por exemplo, a mineralização e o aumento da resistência à tração até o quinto mês, mas que também é influenciado pelo estímulo mecânico, de intensidade variada, do exercício ativo não forçado.

Agradecimentos

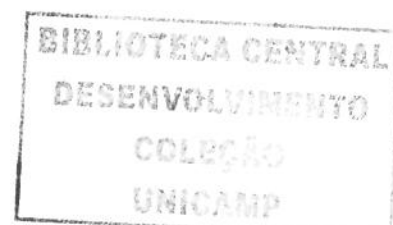
Ao aviário “Fazenda Aves do Paraíso” (Itatiba, SP) por terem nos cedido os animais deste estudo. Wilson Romero Nakagaki recebeu bolsa do CNPq.

Referências

- Abdalla, O., 1979. Ossification and mineralization in the tendons of the chicken (*Gallus Domesticus*). *J. Anat.* 129, 351-359.
- Barfred, T., 1971. Experimental rupture of the Achilles tendon. Comparison of experimental ruptures in rats of different ages and living under different conditions. *Acta Orthop. Scand.* 42, 406-422.
- Benevides, G.P., Pimentel, E.R., Toyama, M.H., Novello, J.C., Marangoni, S., Gomes, L., 2004. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect. Tissue Res.* 45, 206-15.
- Benjamin, M., Ralphs, J. R., 2004. Biology of fibrocartilage cells. *Int. Rev. Cytol.* 233, 1-45.
- Bennett, M.B., Stafford, J.A., 1988. Tensile properties of calcified and uncalcified avian tendons. *J. Zool. Lon.* 214, 343-351.
- Buchanan, C.I., Marsh, R.L., 2001. Effects of long-term exercise on the biomechanical properties of the Achilles tendon of guinea fowl. *J. Appl. Physiol.* 90, 164-171.
- Callegari-Jacques, S.M., 2003. Bioestatística: princípios e aplicações, 1st ed. Artmed, Porto Alegre.
- Cherdchutham, W., Meershoek, L.S., van Weeren, P.R., Barneveld, A., 2001. Effects of exercise on biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon in foals. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1859-1864.
- Curwin, S.L., Vailas, A.C., Wood, J., 1988. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* 65, 2297-2301.
- Dowling, B.A., Dart, A.J., 2005. Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *Vet. J.* 170, 184-192.

- Farndale, R. W., Buttle, D. J., Barret, A. J., 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta* 883, 173-177.
- Feitosa, V.L.C., Esquisatto, M.A.M., Joazeiro, P.P., Gomes, L., Felisbino, S.L., Pimentel, E.R., 2002. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. *Cell. Mol. Biol.* 48, OL359-OL367.
- Feitosa, V.L.C., Esquisatto, M.A.M., Joazeiro, P.P., Gomes, L., Felisbino, S.L., Pimentel, E.R., 2005. Physicochemical and structural analysis of three regions of the deep digital flexor tendon of pigs. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22, 113-119.
- Freeman, W.F., Silver, F.H., 2004. Analysis of mineral deposition in turkey tendons and self-assembled collagen fibers using mechanical techniques. *Connect. Tissue Res.* 45, 131-141.
- Gathercole, L.J., Keller, A., 1991. Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix* 11, 214-234.
- Gillard, G.C., Reilly, H.C., Bell-Booth, P.G., Flint, M.H., 1979. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect. Tissue Res.* 7, 37-46.
- Ghetie, V., Chitescu, S.T., Cotofan, V., Hillebrand, A., 1981. Atlas de anatomia de las aves domésticas. Acribia-Paraninfo, Zaragoza and Madrid.
- Iozzo, R.V., 1997. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32, 141-174.
- Józsa, L.G., Kannus, P., 1997. Human tendons. *Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaign, IL. Human Kinetics.
- Kannus, P., 2000. Structure of tendon connective tissue. *Scand. J Med. Sci. Sports* 10, 312-320.
- Landis, W.J., Librizzi, J.J., Dunn, M.G., Silver, F.H., 1995. A study of the relationship between mineral content and mechanical properties of turkey gastrocnemius tendon. *J. Bone Miner. Res.* 10, 859-867.

- Landis, W.J., Kraus, B.L.H., Kirker-Head, C.A., 2002. Vascular-mineral spatial correlation in the calcifying turkey leg tendon. *Connect. Tissue Res.* 43, 595-605.
- Landis, W.J., Silver, F.H., 2002. The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133, 1135-1157.
- Leonard, F., Parsons, D.B., Adams, J.P., 1980. Tensile strength of precalcified turkey tendon. *J. Biomech.* 13, 731-732.
- Lin, Y.L., Brama, P.A.J., Kiers, G.H., DeGroot, J., van Weeren, R., 2005a. Functional adaption through changes in regional biochemical characteristics during maturation of equine superficial digital flexor tendons. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1623-1629.
- Lin, Y.L., Brama, P.A., Kiers G.H., van Weeren, P.R., DeGroot, J., 2005b. Extracellular matrix composition of the equine superficial digital flexor tendon: relationship with age and anatomical site. *J. Vet. Med. A*, 52, 333-338.
- Maganaris, C.N., Paul, J.P., 2002. Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon. *J. Biomech.* 35, 1639-1646.
- Malaviya, P., Butler, D.L., Korvick, D.L., Proch, F.S., 1998. In vivo tendon forces correlate with activity level and remain bounded: evidence in a rabbit flexor tendon model. *J. Biomech.* 31, 1043-1049.
- Michelacci, Y.M., Horton, D.S.P.O., 1989. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 92, 651-658.
- Nakagaki, W.R., Benevides, G.P., Gomes, L., Em submissão. Efeito da idade e do ambiente de criação em tendão de frangos I - Tendão calcâneo. *Mech. Ageing Dev.*
- Nielsen, H.M., Skalicky, M., Viidik, A., 1998. Influence of physical exercise on aging rats III. Life-long exercises modifies the aging changes of the mechanical properties of limb muscle tendons. *Mech. Ageing Dev.* 100, 243-260.



- Nordin, M., Lorenz, T., Campello, M., 2001. Biomechanics of tendons and ligaments. In: Nordin, M., Frankel, V.H., *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 102-125.
- O'Brien, M., 1997. Structure and metabolism of tendons. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 7, 55-61.
- Parry, D.A.D., Flint, M.H., Gillard, G.C., Craig, A.S., 1978. A comparison of the size distribution of collagen fibrils on connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 203, 305-321.
- Provenzano, P.P., Vanderby Jr., R., 2006. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.* 25, 71-84.
- Rosanger, S., Aagaard, P., Dyhre-Poulsen, P., Neergaard, K., Kjaer, M., Magnusson, S.P., 2002. Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 12, 90-98.
- Scott, P.G., Nakano, T., Dodd, C.M., 1997. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Bioch. Biophys. Acta* 1336, 254-262.
- Shadwick, R.E., 1990. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J. Appl. Physiol.* 68, 1033-1040.
- Silver, F.H., Christiansen, D., Snowhill, P.B., Chen, Y., Landis, W.J., 2000. The role of mineral in the storage of elastic energy in turkey tendons. *Biomacromolecules* 1, 180-185.
- Siperko, L.M., Landis, W.J., 2001. Aspects of mineral structure in normally avian tendon. *J. Struct. Biol.* 135, 313-320.
- Stegemann, H., Stalder, K., 1967. Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta* 18, 267-273.
- Tohyama, H., Yasuda, K., 2000. The effects of stress enhancement on the extracellular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J. Biomech.* 33, 559-565.

- Vanden Berge, J.C., 1981. Miologia das aves. In: Sisson, S., Grossman, D., Anatomia dos Animais Domésticos. 5 ed. Interamericana. pp.1691-1728.
- Vidal, B.C., 1995. Crimp as part of a helical structure. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie. Life Sciences 318, 173-178.
- Woo, S.L-Y., Ritter, M.A., Amiel, D., Sanders, M., Gomez, M.A., Kuei, S.C., Garfin, S.R., Akeson, W.H., 1980. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons – long term effects of exercise on the digital extensors. Connect. Tissue Res. 7, 177-183.
- Woo, S.L-Y., Gomez, M.A., Amiel, D., Ritter, M.A., Gelberman, R.H., Akeson, W.H., 1981. The effects of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. J. Biomech. Eng. 103, 51-56.
- Zajac, E. F., 1989. Muscle and tendon: properties, models, scaling and application to biomechanics and motor control. Crit. Rev. Biomed. Eng. 17, 359-411.

Conclusões

Durante o processo de maturação, o exercício não forçado aumenta a resistência à tração do tendão calcâneo e do tendão flexor digital superficial, e permite que estes dois tipos de tendões absorvam maior quantidade de energia. Este tipo de exercício estimula a síntese de colágeno durante todo o processo de maturação, considerando aves com idades de 1, 5 e 8 meses.