

Daniela Zanin Covizi

**ESTUDO SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR DE
DIFERENTES REGIÕES DE TRÊS TENDÕES DE
RATOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Daniela Zanin
Covizi 24
e aprovada pela Comissão Julgadora. 107
95

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de Biologia Celular.

Orientador
Prof.Dr. Edson Rosa Pimentel

Campinas
1995



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C838e Covizi, Daniela Zanin
Estudo sobre a matriz extracelular de diferentes regiões de
três tendões de ratos / Daniela Zanin Covizi. -- Campinas, SP :
[s.n.], 1995.

Orientador: Edson Rosa Pimentel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tendões. 2. Matriz extracelular. 3. Proteoglicanos.
I. Pimentel, Edson Rosa. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

UNIDADE	-BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C838e
V. E.	
NO B.	25787
PROG.	433195
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/09/95
N.º CPD	

CH-00077164-1

Dedico aos meus queridos pais,
Nivaldo e Maria Augusta e
aos meus irmãos,
Ni , Guto e Renata.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, pela orientação, críticas, apoio e carinho, que de forma construtiva contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, pelas valiosas contribuições, pelo incentivo e apoio à realização deste trabalho, assim como na análise prévia da tese, além da amizade, paciência e atenção sempre concedidas.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes, pelas sugestões feitas durante a realização deste trabalho e análise prévia da tese, e pela atenção e carinho.

À Profa. Dra. Satie H. Ogo, pelas discussões e sugestões feitas na análise prévia deste trabalho.

À Profa. Dra. Mary Anne Heide Dolder, pela revisão do "Abstract" e pela simpatia.

Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, pelas boas explicações e sugestões para a aula de qualificação.

Aos secretários do Departamento, Cidinha, Lilian e Sidney, por todo auxílio e carinho sempre dispensados.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular, especialmente a Klélia pela ajuda nas revelações dos filmes.

As amigas Patrícia e Silvy que me acolheram em 92 e pela ajuda logo que cheguei.

Aos companheiros de almoço pelas momentos de boas risadas.

Aos queridos amigos da pós graduação: Paula, Sil, Lu, Zé Ricardo, Pati, Flávia, Chris Begnami, Fernando, Odair, Maurício, Chris Bertachini, Lucianne, Marcelo, Raquel, Maria, Guido, Estela, Arnaldo, Selma, Ana Lúcia, Jeannie, Luís e Tatiana.

As amigas Lu, Silvy e Pati pelo dia-a-dia, pela cooperação e grande carinho.

Ao Prof. Sebastião R. Taboga, pelo incentivo para a realização deste curso.

Ao Marquinho e Pati pelo uso do computador.

Aos queridos Márcio e Adriana pela grande amizade.

Ao Departamento de Química de Proteínas (LaQuiP), na pessoa do Prof. Camilo J. Novello pelo empréstimo do equipamento de eletrotransferência.

Ao Departamento de Morfologia da UFSP, na pessoa da Profa. Dra. Olga M. S. Toledo pelo uso do condutivímetro.

A CAPES pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

BSA - albumina de soro bovino
Col. - colágeno
Cd - região distal do TC
Cp - região proximal do TC
CS - condroitim sulfato
DEAE-celulose - dietilaminoetil-celulose
DS - dermatam sulfato
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
GAG - glicosaminoglicano
GuHCl - cloridrato de guanidina
kDa - quilodalton
M. - músculo
mA - miliampère
MEC - matriz extracelular
2-Me - 2-mercaptoetanol
Mr - massa molecular relativa
PNC - proteínas não colagênicas
Pd - região distal do TFDP
PG - proteoglicano
Pi - região intermediária do TFDP
Pp - região proximal do TFDP
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil
SDS - dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
Sd - região distal do TFDS
Si - região intermediária do TFDS
Sp - região proximal do TFDS
TC - tendão calcâneo
TFDP - tendão do Músculo flexor digital profundo
TFDS - tendão do Músculo flexor digital superficial
TEMED - n,n,n',n' - tetrametiletlenodiamina

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	15
1. Obtenção dos tendões	16
2. Extração com GuHCl	16
3. Dosagem de proteínas dos extratos	19
4. Quantificação de GAGs sulfatados	19
4.1. Digestão com papaína	19
5. Eletroforese em gel de agarose	20
6. Cromatografia de troca aniônica - DEAE-celulose	20
7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	21
7.1. SDS-PAGE em gradiente de 4-16% de poliacrilamida	21
7.2. SDS-PAGE em concentração de 8% de poliacrilamida	22
8. Teste imunológico	23
9. Teste de intumescimento	23
10. Teste de solubilização do colágeno	24
RESULTADOS	25
1. Observações dos aspectos macroscópicos dos tendões	26
2. Conteúdo de proteínas dos extrato	27
3. Conteúdo de GAGs sulfatados	29

4. Análise eletroforética em gel de agarose do material obtido após digestão com papaína	31
5. Cromatografia em DEAE-celulose	33
6. Análise eletroforética em SDS-PAGE 4-16% das frações obtidas após cromatografia em DEAE-celulose.	37
6.1. Resultados comuns obtidos para os três tendões	37
6.2. Tendão do Músculo flexor digital profundo	38
6.3. Tendão do Músculo flexor digital superficial	42
6.4. Tendão calcanear	46
7. Análise eletroforética em SDS-PAGE 8% do material obtido após cromatografia em DEAE-celulose	49
8. Teste imunoquímico	51
9. Teste de intumescimento	53
10. Extração de componentes colagênicos e não colagênicos pelo tratamento com ácido acético	56
DISCUSSÃO	59
1. Considerações Gerais	60
2. Tendão do Músculo flexor digital profundo	62
3. Tendão do Músculo flexor digital superficial	67
4. Tendão calcanear	70
CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

O tendão é um tipo de tecido conjuntivo denso onde há um predomínio de matriz extracelular (MEC) em relação a quantidade de células. Sua principal função é transmitir as forças de tensão geradas pela contração do músculo onde ele se origina ao osso no qual ele se insere. Os principais componentes da MEC de tendões são o colágeno do tipo I, os pequenos proteoglicanos (PGs) e as proteínas não colagênicas (PNC). Existem tendões que passam próximo a um osso em uma articulação antes da inserção, que ocorre numa direção diferente do músculo, e neste caso são denominados "wrap around", e no local em que estão sob a articulação recebem forças de compressão e fricção adicionais às forças de tensão. Neste local geralmente ocorre o desenvolvimento de uma estrutura fibrocartilaginosa com feixes de colágeno espessos, quantidade elevada de PG e células semelhantes a condrócitos. O objetivo deste trabalho foi analisar a composição de PNC e pequenos PGs da MEC de diferentes regiões do tendão do músculo flexor digital profundo (TFDP), do tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS) e do tendão calcâneo (TC), que por apresentarem trajeto não linear provavelmente estão sob a ação de forças de compressão e fricção além das forças de tensão. O TFDP e o TFDS foram divididos em regiões denominadas proximal, intermediária e distal, enquanto o TC foi dividido nas regiões proximal e distal. Todas as regiões dos três tendões foram extraídas com 25 volumes de cloridrato de guanidina (GuHCl) 4M com inibidores de proteases. As dosagens de proteínas realizadas em cada extrato mostraram que no TFDP havia uma maior presença de proteínas não colagênicas/mg de tecido, sendo que nas regiões intermediária e distal esta proporção foi maior. Com relação às dosagens de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados, após digestão com papaína, foi verificado que a região distal do TC apresentou uma maior quantidade de GAG/mg de tecido, comparando com as regiões dos TFDP e TFDS. De um modo geral, a quantidade de GAG/mg de tecido, nos três tendões, foi sempre maior

nas regiões em que os tendões contornam a articulação. O GAG dermatam sulfato foi encontrado em todas as regiões nos três tendões na eletroforese em gel de agarose, enquanto condroitim sulfato foi encontrado apenas nas regiões que estão sob forças de compressão do TFDP e do TC. Amostras de todos os extratos foram fracionadas em coluna de DEAE-celulose. O material ligado à resina foi eluído da coluna em gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M, e as frações analisadas em SDS-PAGE 4 a 16 % com e sem 2-mercaptoetanol (2-Me). Em todas as regiões dos três tendões observou-se a presença de componentes com Mr entre 94 kDa e 232 kDa. O pequeno PG fibromodulim foi encontrado em todas as regiões dos TFDP, TFDS e TC, e pelo resultado do teste imunológico podemos deduzir que possui duas isoformas do PG. Uma característica interessante deste fibromodulim foi seu comportamento em SDS-PAGE migrando mais lentamente quando não era previamente incubado com 2-Me. O componente polidisperso com Mr na faixa de 67 a 115 kDa, provavelmente decorim, também foi encontrado em todas as regiões dos tendões TFDP, TFDS e TC. A presença desses pequenos PGs em tecidos tipicamente fibrosos deve-se à sua provável função de regular a fibrillogênese das moléculas de colágeno. As propriedades de intumescimento apresentadas pelos três tendões foram típicas de uma matriz colagênica fibrosa.

ABSTRACT

Tendon is a typical example of dense connective tissue, with a predominance of extracellular matrix (ECM). Its main function is transmitting tension from the muscle to the bone. The main ECM component of tendons are type I collagen, small proteoglycans and non collagenous proteins. Tendons which pass under bones are called a wrap around tendon, and may receive compression and frictional forces in addition to tensile forces. Normally, this region has a structure similar to a fibrocartilage with collagen fibers and elevated levels of glycosaminoglycans, with cells resembling chondrocytes. The purpose of this work was to analyse the composition of non collagenous proteins and small proteoglycans present in the ECM of different regions of the deep digital flexor tendon (DDFT), superficial digital flexor tendon (SDFT) and calcaneal tendon (CT). These tendons probably experience compressive and frictional forces in addition to tensile forces. The DDFT and SDFT were divided in proximal, intermediate and distal regions, while the CT was divided in proximal and distal regions. Every region was treated with 25 volumes of 4M guanidine hydrochloride (GuHCl) with protease inhibitors. Quantitation of proteins in each extract showed that in DDFT there was a larger presence of non collagenous protein/ g of tissue than in the other two tendons. In the intermediate and distal region of the DDFT, the proportion of this protein was higher. In relation to the presence of sulfated glycosaminoglycans (GAGs), after papain digestion, more GAG/mg of tissue was found in the distal region of CT, compared to the regions of the DDFT and SDFT. In general, the amount of GAG/mg of tissue, was always higher in regions where the tendon passed under the joint. Electrophoresis in agarose gel showed the presence of sulfate dermatan, in all regions of the three tendons, while

chondroitin sulfate was found only in regions passing under bone, in DDFT and CT. Samples of every extract were fractionated on a DEAE-celulose column. The bound material was eluted with a linear gradient of 0-1M NaCl, and fractions analysed in SDS-PAGE in presence and absence of 2-mercaptoethanol. In all regions of the three tendons components with Mr between 94 and 232 kDa were detected. The small proteoglycan fibromodulin was present in every region of the DDFT, SDFT and CT. The immunochemical test inclined that fibromodulin may be present in two isoforms of the proteoglycan. A interesting characteristic of this fibromodulin was its behaviour in SDS-PAGE, migrant more slowly when electrophoresis was in non reducing conditions. The polydisperse component with Mr in the range of 67 to 115 kDa, probably corresponding to decorin, was found in every region of the three tendons. The presence of these two small proteoglycans in fibrous tissues it is probable due to the function of regulating collagen fibrillogenesis. The swelling properties demonstrated for the three tendons were typical of a collagenous fibrous matrix.

INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC) pode ser definida como um conjunto de macromoléculas situadas fora da célula que se integram e formam um complexo que interage com as células através de seus receptores (executando assim várias funções) (VIDAL, 1987). Os principais componentes são as moléculas de adesão (como fibronectina, vitronectina, laminina e tenascina), os componentes fibrilares (como colágeno e elastina), os proteoglicanos (PGs) (um complexo formado por um "core" protéico com pelo menos uma cadeia lateral de glicosaminoglicano (GAG) (LIN & BISSEL, 1993) e as proteínas não colagênicas (PNC) (HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992). A maneira como estes componentes estão organizados é a base de complexas propriedades fisiológicas e biomecânicas de várias expressões fenotípicas para o tecido conjuntivo (VIDAL, 1993).

A MEC está presente em diversos tecidos. Pode estar calcificada, formando estruturas duras como os ossos ou dentes, pode formar a matriz transparente da córnea, ou ainda pode adotar forma de um "bastão", que fornece aos tendões uma enorme resistência às forças de tensão. Entre um epitélio e o tecido conjuntivo subjacente, a matriz forma a lâmina basal, uma estrutura extremamente delgada, porém resistente, que desempenha um papel importante no controle do comportamento celular (ALBERTS *et alii*, 1994).

O colágeno, um dos principais componentes da MEC constitui uma família de proteínas que algumas vezes corresponde a mais da metade do total de proteínas de um organismo adulto (LISENMAYER, 1983). A estrutura e as principais propriedades da molécula nativa de colágeno são determinadas pela sua configuração em tripla hélice, que compõe mais de 95% da molécula (LISENMAYER, 1983). O colágeno apresenta heterogeneidade, ou seja, existem diferentes tipos de colágeno para diferentes tecidos (VIDAL, 1987). Estas diferenças estão relacionadas à composição em aminoácidos e consequentemente nos tipos de cadeias que compõem a tripla hélice, formando assim, uma série de estruturas diferentes.

Foram até agora determinados dezoito tipos de colágenos (VAN DER REST & GARRONE, 1991; MAYNE & BREWTON, 1993). Os colágenos presentes em maior quantidade nos tecidos são os do tipo I, II, III. Estes três tipos de colágeno e os colágenos do tipo V, XI, formam as fibrilas que são encontradas na maioria dos tecidos conjuntivos; os colágenos que formam folhas são o tipo IV, que é encontrado na membrana basal e o tipo VIII que forma a membrana de Descemet. Os outros tipos de colágeno estão presentes em menor quantidade nos tecidos, desempenhando um papel de conexão entre os elementos do tecido conjuntivo. A família FACIT, que é formada por colágenos com triplas hélices interrompidas associadas à fibrilas, compreende os colágenos tipo IX, XII, XIV. Estes conectam as fibrilas a outros elementos da matriz. Outro tipo de colágeno, o tipo VII, associa-se para formar fibrilas de ancoragem que ligam o epitélio e a membrana basal à derme, enquanto o tipo VI forma finos filamentos em contos que podem associar-se com fibrilas e células.

Os PG, que constituem outro importante componente da MEC, são macromoléculas complexas que contém um "core" protéico, onde pelo menos uma cadeia de GAG está covalentemente ligada. Esta simples definição compreende uma ampla variedade de estruturas, envolvendo diferentes "core" protéicos e diferentes classes de GAGs. A enorme variabilidade observada em nível molecular faz com que os PGs desempenhem diversas funções estruturais nos tecidos (HASCALL & HASCALL, 1983). Os PGs são encontrados em quase todos os tecidos de mamíferos, sendo especialmente proeminentes nos tecidos conjuntivos, onde contribuem significativamente para as propriedades biomecânicas. (HASCALL & HASCALL, 1981). PGs de cartilagem foram os mais estudados até hoje e são os mais complexos desta família de macromoléculas, sendo capazes de formar enormes agregados com o ácido hialurônico (HASCALL & HASCALL, 1981). Estes grandes agregados de PGs retém grande quantidade de água, devido a alta densidade de cargas

negativas das cadeias de GAGs, gerando assim uma pressão osmótica e um intumescimento, que resulta numa espécie de um gel hidratado. Este intumescimento é contido pelas fibrilas de colágeno, fazendo com que o tecido resista então às forças de compressão (HASCALL & HASCALL, 1981).

Além dos grandes PGs, existem pequenos PGs, como o decorim, o fibromodulim, o biglicam e o colágeno tipo IX. Decorim e fibromodulim parecem estar associados à molécula de colágeno através de seu "core" protéico (SCOTT & ORFORD, 1981; HEDLUND *et alii*, 1994). Estes PGs podem ter um papel na regulação da fibrilogênese do colágeno, e/ou na determinação das propriedades físicas da fibrila completa (HEDBOM *et alii*, 1992; OLDBERG *et alii*, 1989). O tipo de molécula de GAG que se liga ao decorim varia com relação ao tecido. Em tendão, pele, esclera e cartilagem o GAG ligado ao "core" protéico é o dermatam sulfato. Já fibromodulim possui quatro cadeias de queratam sulfato e é encontrado em tendão e cartilagem (GALLAGHER, 1989).

O colágeno tipo IX é considerado um pequeno PG por possuir uma cadeia de condroitim sulfato ligado covalentemente ao "core" protéico. Foi encontrado em cartilagem, e estudos *in vitro* mostraram que este colágeno pode interagir com o colágeno II para modular a associação das fibrilas, além de estabilizar e de ligar diferentes fibrilas (WOTTON *et alii*, 1988).

Biglicam não é encontrado em associação com as fibrilas de colágeno. Este pequeno PG tem sido encontrado na MEC de cartilagem, menisco e outros tecidos conjuntivos, entretanto sua função não é bem conhecida (OLDBERG *et alii*, 1989). Ao "core" protéico estão ligadas duas cadeias de GAGs, podendo ser dermatam sulfato ou condroitim sulfato (GALLAGHER, 1989)

Além dessas duas famílias de macromoléculas, a MEC possui várias PNC que provavelmente desempenham um papel regulatório na matriz (HEINEGÅRD & OLDBERG,

1989). Diversas PNC têm sido identificadas em cartilagem, como a proteína de 36 kDa, a proteína de matriz de cartilagem (CMP) e a proteína oligomérica de matriz de cartilagem (COMP) (HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992). Outras PNC são as fibras elásticas que dão resistência e deformabilidade à matriz e as proteínas de adesão que ajudam as células a se fixarem na MEC. A fibronectina, por exemplo, promove a fixação dos fibroblastos e permite a interação célula-matriz extracelular. Já a laminina, promove a fixação de células epiteliais à lâmina basal (ALBERTS *et alii*, 1994).

O tendão é um tecido conjuntivo denso onde há um predomínio de MEC em relação a quantidade de células. O principal componente produzido pelos fibroblasto e depositado na MEC de tendões é o colágeno tipo I, que corresponde a 65-75% da sua massa seca (JOZSA *et alii*, 1991). Os pequenos PGs constituem cerca de 90% do total de PGs do tecido (VOGEL *et alii*, 1984), existindo ainda as PNC.

Esses elementos estão organizados num complexo esquema hierárquico para a formação do tendão (JOZSA *et alii*, 1991). As moléculas de colágeno agregam-se formando fibrilas, estas então formam os feixes de fibrilas que constituem os tendões. Externamente o tendão é revestido por uma camada delgada de tecido conjuntivo, o epitendíneo, que se estende por entre os feixes de colágeno constituindo o endotendíneo. Em alguns tendões há um revestimento ao redor do epitendíneo, o paratendíneo (JOZSA *et alii*, 1991). Quando há um aumento na fricção, que pode ocorrer por uma mudança de direção, e o tendão necessita de uma maior lubrificação, o paratendíneo divide-se nas camadas visceral e parietal (ELLIOT, 1965; MERRILEES & FLINT, 1980). Estas camadas delimitam um espaço conhecido por mesotendíneo, que é preenchido por um fluído semelhante ao líquido sinovial (NISBIT, 1960).

Os tendões realizam o papel mecânico de transmitir a força de tensão gerada pela contração do músculo onde ele se origina, ao osso no qual ele se insere (VOGEL & KOOB,

1989). Uma característica dinâmica dos tendões é a capacidade de reparar-se após uma injúria traumática. Quando é danificado, a cicatrização procede-se através de uma fase inflamatória, seguida por uma proliferação e migração celular para o local afetado. Estas células encontrarão uma matriz colagênica desorganizada que é eventualmente remodelada para restaurar os feixes de colágeno lineares funcionais e a resistência à tensão do tecido original (VOGEL & KOOB, 1989).

O diâmetro da fibra de colágeno, o estado de agregação molecular dentro de cada fibra e o espaço ocupado por elas têm influência nas propriedades biomecânicas de tendões e ligamentos (VIDAL & CARVALHO, 1990; CARVALHO, 1993). Como já mencionado, os PGs parecem ter importância na manutenção ou regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno, e também parecem estar envolvidos em outras propriedades dos tendões (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989).

Vários autores têm demonstrado que tendões sujeitos a diferentes forças mecânicas são capazes de serem remodelados dinamicamente pelas células em resposta a estas forças (VOGEL *et alli*, 1986).

ALEXANDER e colaboradores (1985) definem tendões "wrap around" como tendões que passam próximo a um osso em uma articulação antes da inserção, em uma direção que difere da direção do músculo. Um tendão semelhante a estes é o flexor digital de quadrúpedes, onde o músculo flexor, junto com a gravidade, exerce grandes forças no tendão, enquanto a pata ou o pé está no chão durante o repouso, a caminhada ou a corrida. Em resposta, o osso da articulação pelo qual o tendão passa deve exercer uma força de compressão que é basicamente perpendicular à direção em que o tendão é tensionado. O desenvolvimento nesta região de um tecido que é capaz de fornecer resistência às forças de compressão seria mecanicamente vantajoso (VOGEL & KOOB, 1989).

FLINT e colaboradores (1979; 1980) verificaram que o tendão *flexor digitorum profundus* de coelho está sujeito a forças de pressão e de fricção na região que está em contato com calcâneo e talus. Nesta área sujeita a forças de compressão, a MEC desenvolve uma organização fibrocartilaginosa, com maior concentração de GAGs. Características ultraestruturais das células, do colágeno e da matriz dessa área sob pressão e tensão são diferentes. Esses dados suportaram o conceito de que as células nessas regiões são sensíveis e respondem a mudanças as forças físicas (GILLARD *et alii*, 1979; MERRILEES & FLINT, 1980).

O tendão *flexor digitorum profundus* de cães também está sujeito a forças de compressão e desenvolve uma fibrocartilagem. OKUDA e colaboradores (1987a; 1987b) estudaram a composição da matriz de cinco regiões anatômicas do tendão de cão e correlacionaram a atividade metabólica e composição da matriz com forças mecânicas que supostamente atuam em cada região.

VOGEL e KOOB (1989) estudaram a produção e modulação da MEC de acordo com o requerimento mecânico dos tendões de boi e concluíram que forças de compressão podem direcionar a produção de um fenótipo fibrocartilaginoso em tendões "wrap around". Estes experimentos estabeleceram a capacidade do tecido para se remodelar em resposta a mudanças de força mecânica.

Em tendão flexor bovino, sujeito apenas à força de tensão, os PGs perfazem menos que 1% do peso seco e são predominantemente pequenos PGs contendo dermatam sulfato. Entretanto, quando o tendão passa na articulação próxima aos dedos e está sujeito a forças de compressão, bem como forças de tensão, o conteúdo de PGs é 3 a 5 vezes maior, e mais de 50% são grandes PGs que contém cadeias de condroitim sulfato e de queratam sulfato, além de serem capazes de interagirem com o ácido hialurônico (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; EVANKO & VOGEL, 1990).

Estudos em cultura de fibroblastos de regiões de tendão bovino adulto sujeito a diferentes forças biomecânicas, também mostraram diferenças com relação à organização e composição da MEC (VOGEL *et alii*, 1986). O colágeno presente na região de tensão formava feixes alinhados, enquanto aquele encontrado na região de compressão formava uma rede de fibrilas. O conteúdo de PGs nas diferentes regiões também variava. Na região sujeita apenas a forças de tensão, havia predominantemente PGs de baixo peso molecular, contendo dermatam sulfato. Entretanto, onde o tecido estava sujeito a forças de compressão a quantidade de PGs de alto peso era muito maior. A diferença na composição de proteoglicanos existente entre estas duas regiões permite especulações no que concerne ao papel dos PGs no tecido.

KOOB e VOGEL (1987a) analisaram a síntese de PGs em cultura de explante de regiões do tendão bovino sujeito a diferentes forças mecânicas. Um tecido conjuntivo fibroso que sofre forças de compressão *in situ* possui um conteúdo aumentado de grandes PGs (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; KOOB & VOGEL, 1987a; EVANKO & VOGEL, 1990). Segundo esses autores a localização desses PGs nos sítios que recebem forças de compressão sugere que a diferença pode ser estimulada por essas próprias forças. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que forças de compressão estimulam e mantêm a síntese de grandes PGs em regiões especializadas do tendão, e que forças de tensão podem também desempenhar um papel regulatório na determinação do tipo de PG produzido pelo tendão.

Estudos em tendão *plantaris longus* de rã (CARVALHO & VIDAL, 1994) mostraram que as modificações deste tendão assemelham-se àquelas descritas por VOGEL e KOOB (1989) para tendões de mamíferos. Uma estrutura dilatada com aspecto cartilaginoso caracterizando uma fibrocartilagem nos tendões que mudam de direção, reflete a existência

de uma situação biomecânica onde o tendão recebe forças de compressão além de transferir as forças de tensão exercida pelos músculos (CARVALHO & VIDAL, 1994).

As fibrocartilagens são também encontradas nas zonas de fixação de tendões e ligamentos aos ossos, fornecendo uma transição gradual das propriedades mecânicas entre eles (WOO, 1988; apud RUFÁI *et alii*, 1992). Todas as fibrocartilagens têm em comum uma característica, que é o acúmulo de GAGs que ocasiona maior retenção de água na matriz e por isso contribui para elevar a resistência à compressão no tecido pela atração de água para dentro da matriz.

RUFÁI e colaboradores (1992) estudaram fibrocartilagens que ocorrem na fixação do tendão no calcâneo, no próprio tendão, e na superfície óssea do calcâneo. Os estudos mostraram que estas três fibrocartilagens associadas com o tendão de Aquiles (tendão calcanear) são fenotipicamente diferentes.

Alguns tendões apresentam variações em composição ao longo de sua estrutura, algumas vezes sem caracterizar alterações morfológicas evidentes. Essas variações resultam de adaptações a diferentes situações biomecânicas que devem ocorrer ao longo de seu percurso da inserção mio-tendinosa à inserção óssea (JONES & BEE, 1990; CURWIN *et alii*, 1994).

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo:

1. Identificar PNC da MEC de diferentes regiões dos tendões TFDP, TFDS e TC.
2. Estabelecer uma relação entre a composição da MEC de diferentes tendões que por apresentarem trajeto não linear provavelmente estão sob a ação de diferentes combinações de forças de compressão e fricção além das forças de tensão.
3. Avaliar a quantidade de GAGs sulfatados presentes em diferentes regiões de um mesmo tendão.
4. Identificar os tipos de GAGs presentes em cada região dos tendões.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção dos tendões

Ratos Wistar machos, com idade de 3 meses, tiveram as patas traseiras dissecadas de onde foram retirados três tendões, o tendão calcâneo (TC), o tendão do Músculo flexor digital profundo (TFDP) e o tendão do Músculo flexor digital superficial (TFDS) (Figura 1). Os animais foram obtidos no Biotério Central da UNICAMP.

Os tendões foram divididos em regiões do seguinte modo (Figura 2):

- TC: dividido em duas regiões, uma denominada região proximal, que é a região que vai em direção ao *M. soleus*, e a outra, que se dirige ao calcâneo e se insere nele, denominada região distal.

- TFDP: dividido em três regiões, denominadas proximal, que se origina no *M. flexor digitorum profundus* e vai em direção a pata, intermediária, que está entre a região proximal e a distal, que compreende uma região do tendão que ramifica-se em direção aos dígitos.

- TFDS foi também dividido em três regiões, denominadas proximal, intermediária, e distal. Este tendão origina-se no *M. flexor digitorum superficialis* da tíbia e dirige-se aos dedos.

2. Extração com GuHCl

Os tendões foram fragmentados com auxílio de lâmina de aço e colocados em 25 volumes de cloridrato de guanidina (GuHCl) 4M em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,8 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 20mM, fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) 1mM, a 4°C, sob agitação durante 24 horas. Após este período de

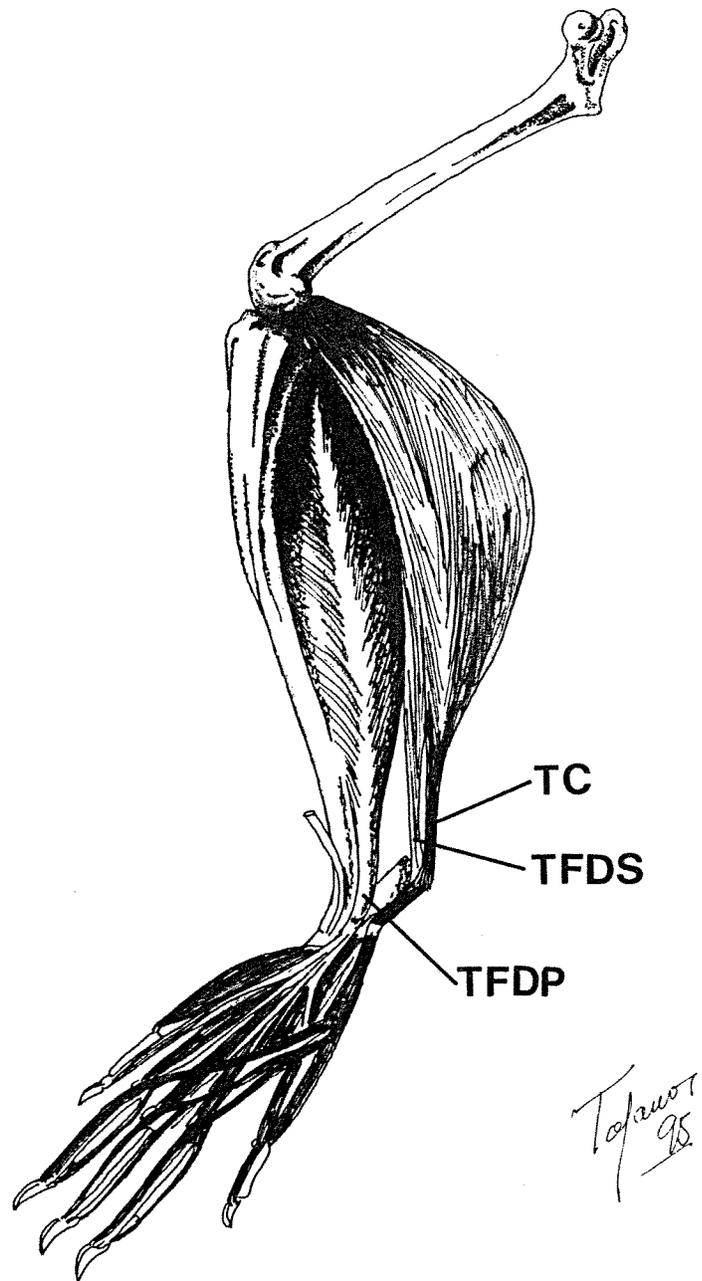


Figura 1: Aspectos anatômicos da pata traseira direita de rato (Segundo HEBER & STROMBERG, 1976).

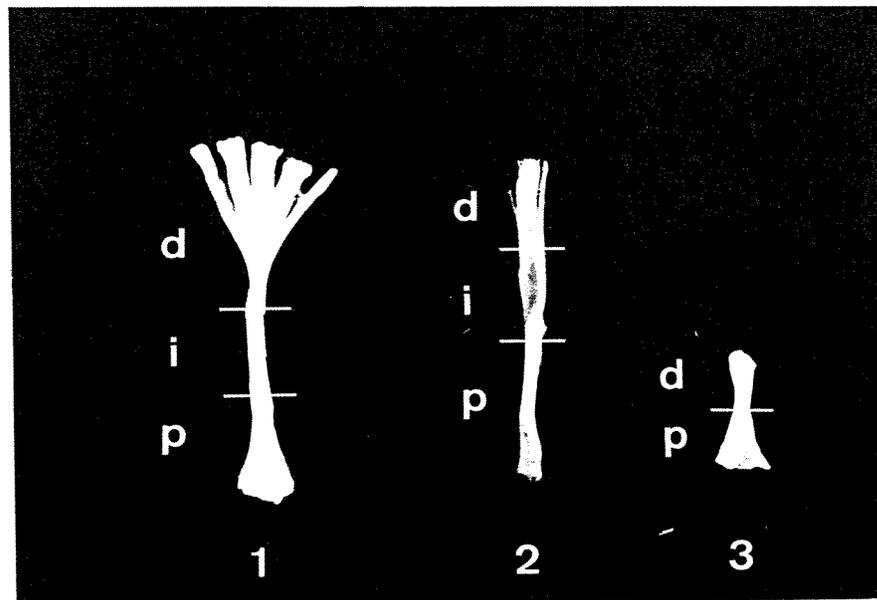


Figura 2: Tendões da pata traseira de ratos Wistar, machos, com 90 dias. **1-** TFDP, regiões proximal (p), intermediária (i) e distal (d). **2-** TFDS, regiões proximal (p), intermediária (i) e distal (d). **3-** TC, regiões proximal (p) e distal (d).

extração, o material foi centrifugado a 18.000 rpm em rotor Beckman JA-20, a 4°C, durante 45 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante estocado a -20°C, sendo então utilizado nas posteriores dosagens, análises cromatográficas e eletroforéticas.

3. Dosagem de proteínas dos extratos

As proteínas foram dosadas em alíquotas de 100µl pelo método de BRADFORD (1976) com base em curvas padrão construídas com as seguintes concentrações de BSA: 25, 20, 15, 10, 5 e 2,5 µg/ml. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da Hewlett Packard.

4. Quantificação de GAGs sulfatados

4.1. Digestão com papaína

Os GAGs sulfatados foram removidos a partir de 34,0mg de tendão para 0,5ml de solução conforme o procedimento de MICHELLACCI & HORTON (1989). A degradação foi realizada com papaína (40mg/g de tecido) em tampão citrato de sódio 30mM pH 3,5 contendo EDTA 40mM e 2-mercaptoetanol (2-Me) 80mM a 50°C por 24horas.

O digesto foi centrifugado em microcentrífuga Fisher Scientific Model 235 V a 8.000 rpm por 3 minutos. O precipitado não digerido foi separado do sobrenadante e pesado. O material digerido contido no sobrenadante foi precipitado com dois volumes de etanol e deixados a 4°C por 24horas. O material digerido foi centrifugado novamente a 8.000 rpm

por 3 minutos. Ao precipitado foram adicionados 0,5ml de acetona e novamente centrifugado. O precipitado foi incubado em estufa a 37°C até a secagem total e então ressuspensionado em 200µl de água destilada. A quantidade de GAGs sulfatados foi determinada pelo método do azul de dimetilmetileno (DMMB), segundo FARNDALÉ *et alii* (1986), com o emprego de curvas padrão construídas com as seguintes concentrações de condroitim sulfato (CS): 5, 10, 15, 20 e 25µg/ml. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da Hewlett Packard.

5. Eletroforese em gel de agarose

Com a finalidade de identificar os tipos de GAGs presentes, os diferentes tendões foram digeridos com papaína e analisados em gel de agarose a 0.5% em tampão 1,3 diamino propano (DIETRICH & DIETRICH, 1976; DIETRICH; 1977). Foram aplicados no gel 5µl da solução contendo GAGs de cada região. As condições de corrida foram: 30mA, 130 volts durante 2 horas. Os géis foram fixados com Cetavlon (cetiltrimetilamonio brometo) 0.1% e corados com azul de toluidina 0.1% em etanol 50% e ácido acético 1%. Após a secagem do gel foi feita a densitometria em equipamento Quick Quant II-Scan Flur Vis-Helena a fim de avaliar mais precisamente a proporção dos diferentes GAGs.

6. Cromatografia de troca aniônica - DEAE-celulose

O emprego de uma resina catiônica como DEAE-celulose foi necessário para fracionar os diferentes componentes da MEC.

Amostras contendo 2,0mg de proteínas dos materiais extraídos com GuHCl 4M das regiões de cada tendão foram dialisados contra uréia 7M em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0 a 4°C sob agitação durante 48 horas. Foram feitas 4 trocas de tampão de 10 vezes o volume da amostra a ser dialisada. O material dialisado foi aplicado em uma coluna de DEAE-celulose de 7,0 x 2,0 cm, previamente equilibrada com o mesmo tampão da diálise. O fluxo da coluna foi de 0,24ml/min. Após a aplicação da amostra a coluna foi lavada com 3 vezes o volume da coluna, usando o mesmo tampão, para a remoção do material não ligado.

O material ligado à resina foi eluído com gradiente de NaCl de 0 a 1M (EVANKO & VOGEL, 1990, modificado) no mesmo tampão. Alíquotas de 2.7ml foram coletadas e analisadas quanto à absorção em 230nm (ligação peptídica) e 280nm (Tyr, Trp e Phe) em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da Hewlett Packard.

A leitura da condutividade das amostras eluídas da coluna foi realizada em condutivímetro Micronal B 330.

7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

7.1. SDS-PAGE em gradiente de 4-16% de poliacrilamida

Os géis em placa vertical foram em gradiente de 4-16% de concentração final de acrilamida em presença de SDS, usando o sistema de tampão segundo LAEMMLI (1970) com gel de empacotamento com 3,5% de acrilamida.

Para preparação das amostras, 200µl dos extratos dos diferentes materiais foram misturados a 100µl de tampão acetato de sódio 0,5M, pH 7,4 e precipitados com nove

volumes de etanol, durante 24 horas, a 4°C. Após centrifugação a 10.000 rpm em rotor Beckman JA-20, a 4°C durante 15 minutos repetiu-se o mesmo procedimento de precipitação.

O precipitado obtido foi dissolvido em tampão de amostra contendo Tris 62,5mM, EDTA 1mM, SDS 2,5%, Glicerol 10% pH 6,8, azul de bromofenol 0.01%, na ausência ou presença de 2-Me a 5%, e fervidas durante 5 minutos. O tampão de corrida usado foi Tris 0,1M, glicina 0,76M, EDTA 0.29%, SDS 0,4%, pH 8,7.

A corrida foi feita com intensidade de corrente de 25mA durante 3 horas. Como padrões de peso molecular foram utilizadas as seguintes proteínas: catalase-tetrâmero (232 kDa), lactato desidrogenase (140 kDa), fosforilase b (94 kDa), albumina de soro bovino (67 kDa), catalase-monômero (60 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor tripsina (20,1 kDa), ferritina (18 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa).

Os géis foram fixados com metanol 50%, ácido acético 12% contendo 0.003% de formaldeído. A coloração foi feita pelo método de impregnação pela prata segundo BLUM *et alii* (1987). As massas moleculares relativas (Mr) foram obtidas a partir do cálculo de Rf (KLAUS & OSBORN, 1969).

7.2. SDS-PAGE em concentração de 8% de poliacrilamida

Para melhor distinguir o componente de 59 kDa, especialmente para ser usado em transferência para papel de nitrocelulose, um "pool" de algumas frações das diferentes regiões dos três tendões foram analisadas em gel com concentração fixa de 8% de acrilamida. O preparo das amostras, as condições de corrida e a coloração seguiram os mesmos procedimentos descritos no ítem 7.1.

8. Teste imunoquímico

O ensaio seguiu o procedimento descrito por LARSSON e colaboradores (1991) com pequenas modificações. Após eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 8%, as proteínas foram eletricamente transferidas para papel de nitrocelulose usando tampão CAPS pH 11,0 em sistema Hoefer. O papel foi embebido e deixado em solução de TST (Tris 10mM, NaCl 0.15M, Tween 0.2%) por 4 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se incubação com soro de coelho anti-fibromodulim de boi (1:250) (gentilmente cedido por Carvalho H. F.) durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação. O anticorpo secundário, soro de porco anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (1:1000), foi incubado durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação. A revelação foi com DAB (diaminobenzidina). Foram empregados padrões pré-corados contendo: α_2 -macroglobulina (191 kDa), β -galactosidase (117 kDa), frutose-6-fosfatase quinase (91,8 kDa), piruvato quinase (72,7 kDa), fumarase (57,8 kDa), lactato desidrogenase (40,8 kDa) e triose-fosfato isomerase (34,1 kDa).

9. Teste de intumescimento

Os testes de intumescimento foram realizados segundo KOOB & VOGEL (1987a). Os tendões foram divididos em regiões, como descrito anteriormente, secos em papel de filtro, pesados e mantidos em solução de NaCl 0.15M, NaH₂PO₄ 0.05M, pH 7,0 por 1 hora. A seguir foram colocados em água por 1 hora e por último deixados por 15 minutos em ácido acético 3%. Entre cada imersão o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e os tendões novamente pesados.

O aumento do peso do tendão após cada tratamento foi expresso em porcentagem.

10. Teste de solubilização do colágeno

Amostras de cada região do TFDP, do TFDS, e do TC (aproximadamente 6,5mg) foram tratadas com 5ml de ácido acético 3% durante 45 minutos a 4°C. Após este período as amostras foram filtradas em gaze. Com o material filtrado foi realizado uma curva espectral na faixa de 210nm a 320nm em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da Hewlett Packard. Para avaliações da quantidade relativa de colágeno nos extratos, foram escolhidas as absorvâncias encontradas em 236nm e 280nm (VIDAL, 1986), e determinada a razão entre estas absorvâncias

RESULTADOS

1. Observações do aspecto macroscópico dos tendões.

Nenhuma diferença foi observada entre as três regiões do TFDP que apresentaram o aspecto típico de um tecido fibroso (Figura 2).

No TFDS a região intermediária mostrou diferenças consideráveis em nível macroscópico, já as regiões proximal e distal apresentaram-se como as diferentes regiões do TFDP. Na região intermediária o TFDS contorna uma articulação e embainha-se, formando uma capa opalescente e mais flexível do que as outras regiões do tendão.

A região distal do tendão calcanear apresentou um aspecto diferenciado no local em que o tendão se insere no osso, e uma típica estrutura fibrosa no local onde foi feita a divisão do tendão nas duas regiões. A partir deste local, temos então a região proximal, que também se apresentou tipicamente fibrosa.

2. Conteúdo de proteínas dos extratos

As dosagens de proteínas mostraram diferenças principalmente entre os diferentes tendões, mas também entre algumas regiões consideradas dentro de um mesmo tendão (Figura 3).

No caso do extrato do TFDP a quantidade de proteínas extraídas por grama de tendão foi maior do que para o TFDS e para o TC.

No TFDP, a região intermediária apresentou a maior quantidade de proteínas (20,93mg/g tendão), seguida pelas regiões distal (19,17mg/g tendão) e proximal (14,69mg/g tendão).

As regiões proximal e intermediária do TFDS tiveram praticamente a mesma quantidade de proteínas extraídas (11,26mg/g tendão e 11,28mg/g tendão), que foi levemente menor do que a encontrada para a região distal (12,51mg/g tendão).

No caso de TC, a região proximal apresentou uma quantidade de proteínas maior (10,63mg/g tendão) do que a da região distal (9,37mg/g tendão).

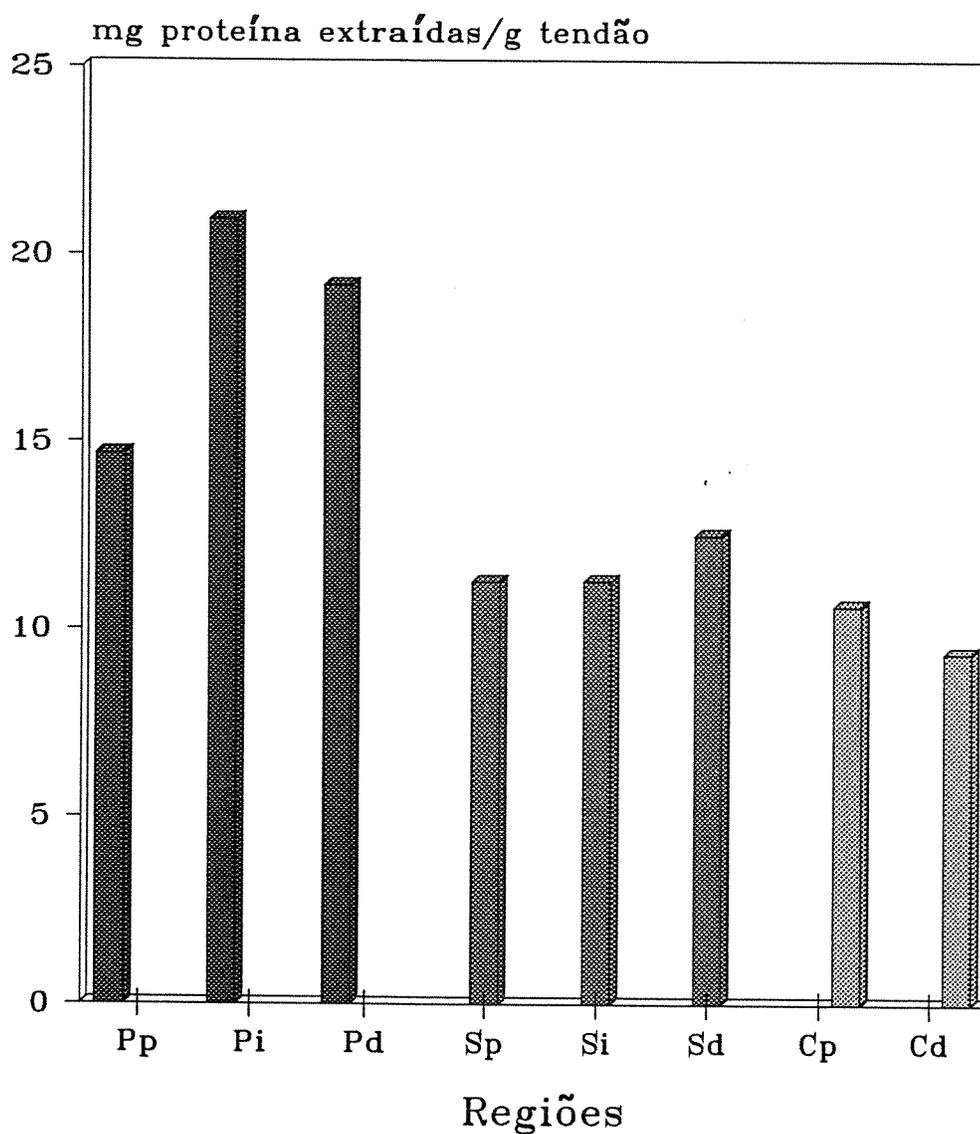


Figura 3: Dosagens de proteínas das amostras obtidas após extração com GuHCl 4M das diferentes regiões do TFDP, do TFDS e do TC. Pp-região proximal do TFDP; Pi-região intermediária do TFDP; Pd-região distal do TFDP. Sp-região proximal do TFDS; Si-região intermediária do TFDS; Sd-região distal do TFDS; Cp-região proximal do TC; Cd-região distal do TC.

3. Conteúdo de GAGs sulfatados

O total de GAGs sulfatados obtidos por mg de tendão através de digestão com papaína, foi semelhante para os TFDP e TFDS, mas bem diferente para o TC (Figura 4).

A região proximal do TFDP possui 0,15 μ g de GAGs sulfatados/mg de tendão enquanto que a região proximal do TFDS possui 0,18 μ g de GAGs sulfatados/mg de tendão. Já a região intermediária do TFDP possui 0,71 μ g de GAGs sulfatados/mg de tendão e a mesma região do TFDS possui 0,68 μ g de GAGs sulfatados/mg de tendão. As regiões distais do TFDP e TFDS apresentaram a mesma quantidade de GAGs sulfatados por miligrama de tendão (0,38 μ g/mg tendão).

No TC, o total de GAGs sulfatados obtidos foi consideravelmente maior na região distal do que na região proximal. A região proximal possui um total de 0,41 μ g de GAGs, enquanto a região distal possui 1,18 μ g de GAGs por miligrama de tecido.

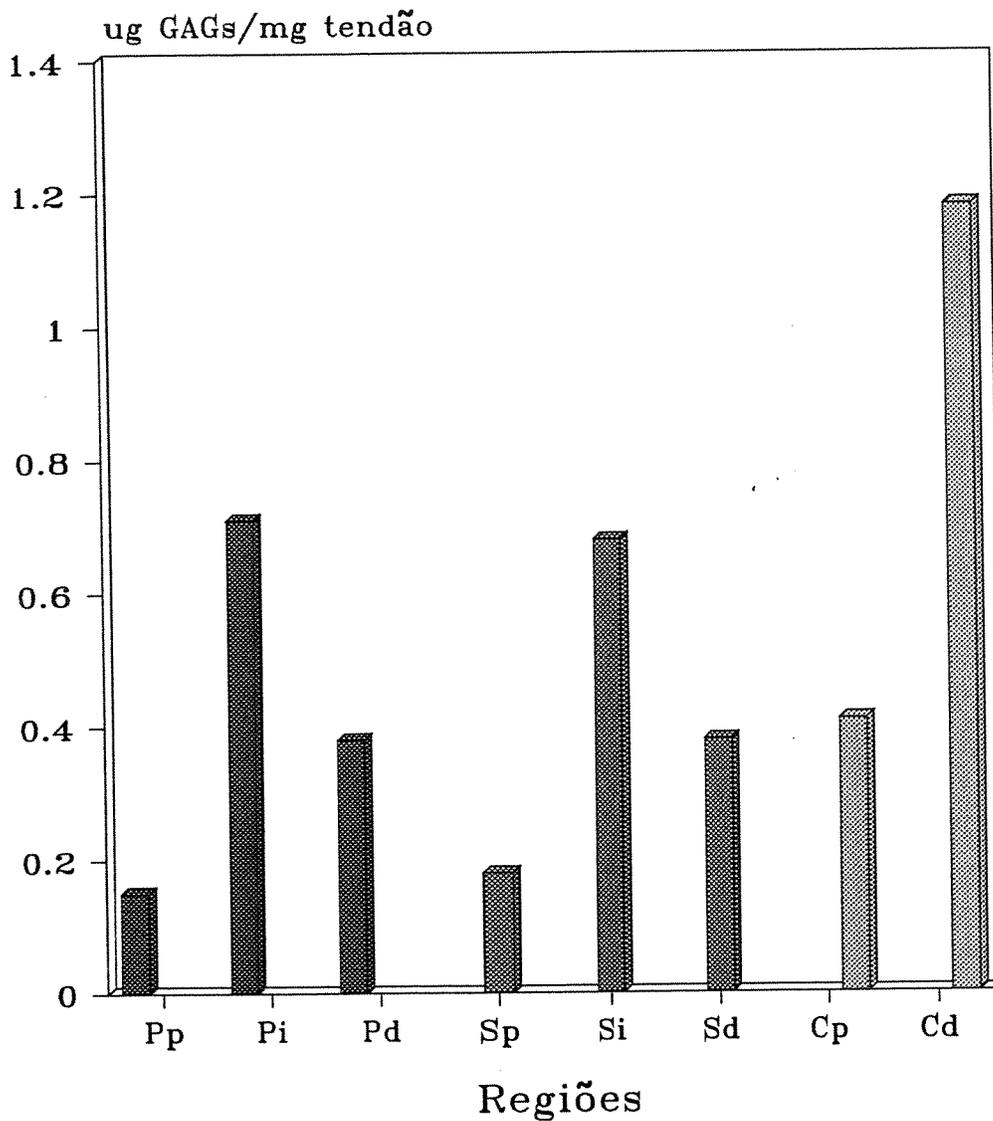


Figura 4: Dosagens de GAGs sulfatados das amostras obtidas após digestão com papaína das diferentes regiões do TFDP, do TFDS e do TC. Pp-região proximal do TFDP; Pi-região intermediária do TFDP; Pd-região distal do TFDP. Sp-região proximal do TFDS; Si-região intermediária do TFDS; Sd-região distal do TFDS; Cp-região proximal do TC; Cd-região distal do TC.

4. Análise eletroforética em gel de agarose do material obtido após digestão com papaína.

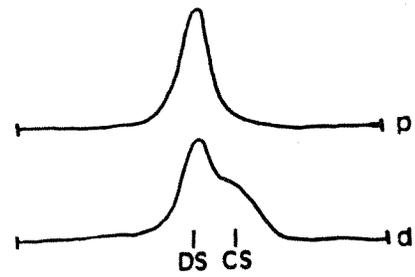
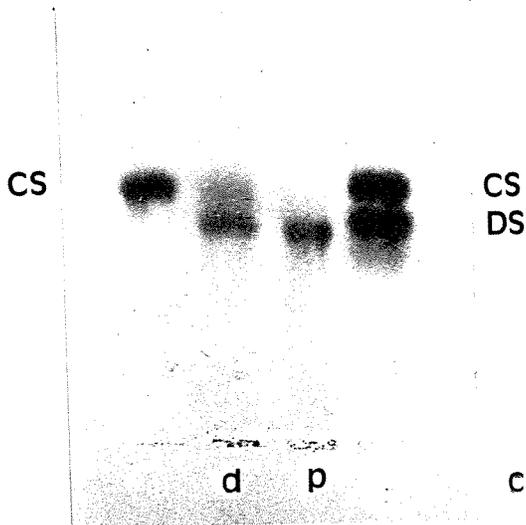
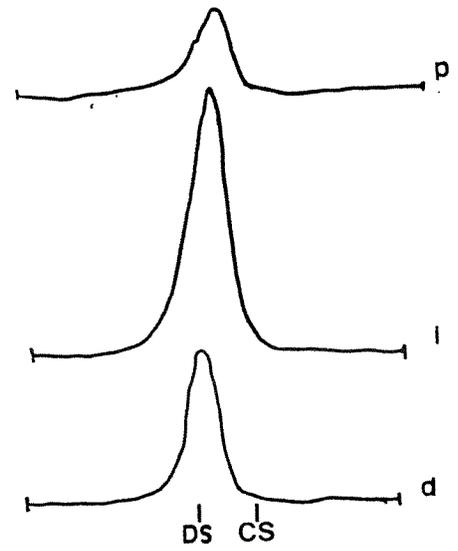
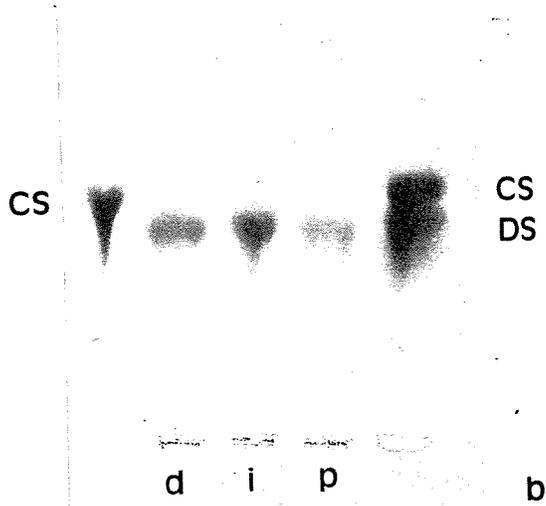
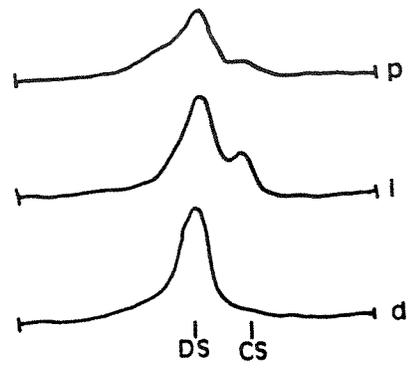
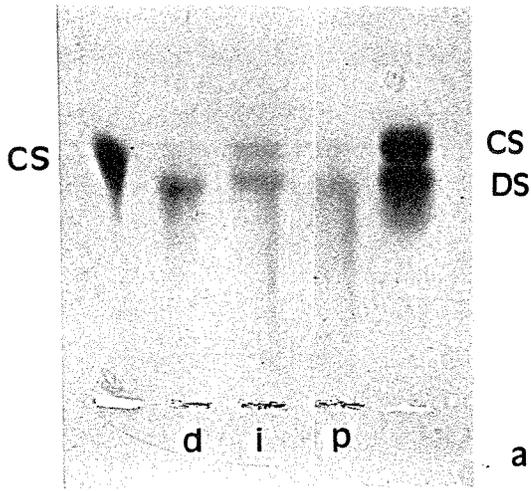
O TFDP apresentou diferenças entre as três regiões (Figura 5a). Eletroforese das regiões proximal e intermediária mostrou que esses GAGs estão dispostos em duas bandas no gel de agarose. É evidente a presença mais marcante de DS em relação a CS nas duas regiões. É notável contudo a presença de CS na região intermediária. Com relação a região distal, a banda na posição de DS é bem evidente não tendo sido notada a presença de CS.

O TFDS apresentou uma banda na posição de DS, não tendo sido notado nenhum vestígio de CS para as regiões proximal, intermediária e distal (Figura 5b).

Com relação ao TC, a região proximal apresentou grande quantidade de GAGs na posição do padrão de DS, enquanto a região distal apresentou a maior quantidade de GAGs expressos em duas bandas que migraram na posição do padrão de DS e CS (Figura 5c).

A densitometria das bandas TFDP mostrou que na região proximal DS está presente em uma porcentagem de 82%, enquanto CS apenas 18%; já na região intermediária, DS e CS estão presentes na proporção de 68% e 32%, respectivamente. No TC, a porcentagem de DS na região distal foi 59% e de CS foi 41%.

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose e densitometria correspondente dos GAGs das diferentes regiões dos tendões. **a-** TFDP: notar a presença marcante de CS e DS na região intermediária e a presença sutil de CS na região proximal, como indicado na densitometria. **b-** TFDS: notar somente a presença de DS nas três regiões. **c-** TC: notar a presença de CS e DS na região distal.



5. Cromatografia em DEAE-Celulose

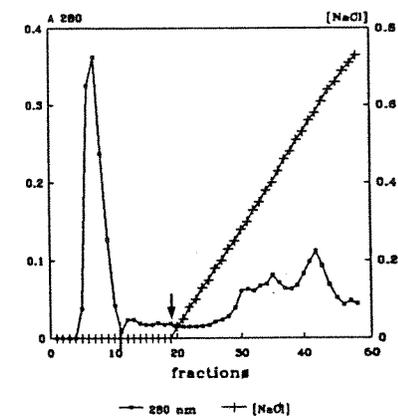
O padrão de eluição dos materiais extraídos com GuHCl de todas as regiões de cada tendão foi semelhante (Figuras 6, 7 e 8).

Tanto em leitura absorciométrica em 230nm (não mostrado) quanto em 280nm há um pico proeminente antes do gradiente, mostrando para todos os tendões estudados a presença de proteínas não ligadas ao DEAE. Após a aplicação do gradiente de 0 a 1M de NaCl apareceram diferentes picos nos três tendões.

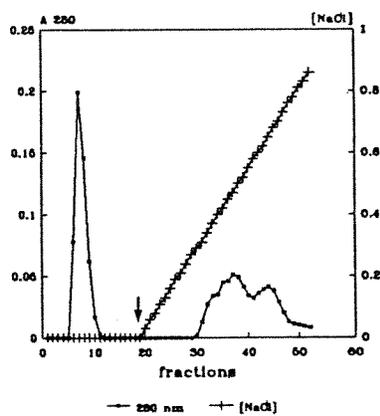
Nas três regiões do TFDP o perfil do material eluído antes do gradiente de NaCl foi semelhante. O material eluído após o gradiente estava entre as frações 25 e 50 para as regiões proximal e distal; para a região intermediária a eluição ocorreu entre as frações 30 e 50.

No TFDS a eluição antes do gradiente foi entre os tubos 4 e 10 nas três regiões. Após o gradiente, o material da região proximal foi eluído entre as frações 25 e 50, para a região intermediária foi entre as frações 25 e 48 e para a região distal, entre as frações 25 e 43.

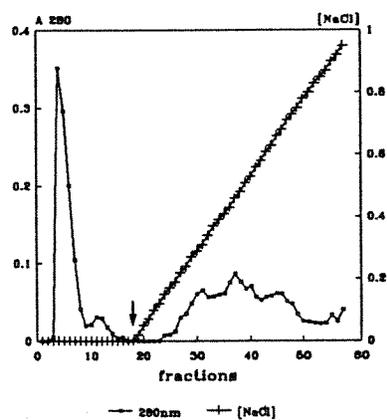
A ocorrência do pico antes do gradiente de NaCl do material de TC foi entre as frações 4 a 10 para as duas regiões. Na região proximal, os picos ocorreram após o gradiente entre as frações 30 e 55. Já na região distal, a eluição ocorreu entre as frações 25 e 50.



a



b



c

Figura 6: Cromatografia em DEAE-celulose do material extraído por GuHCl do TFDP. Proteínas não ligadas ao DEAE foram removidas por lavagem com tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,0, contendo uréia 7M. A eluição do material ligado foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 a 1M no mesmo tampão. —> - início do gradiente.

a: Região proximal

b: Região intermediária

c: Região distal

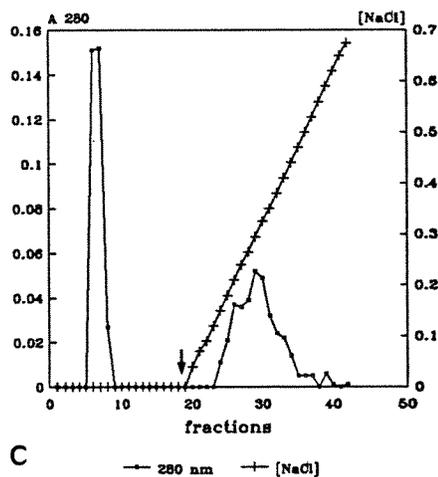
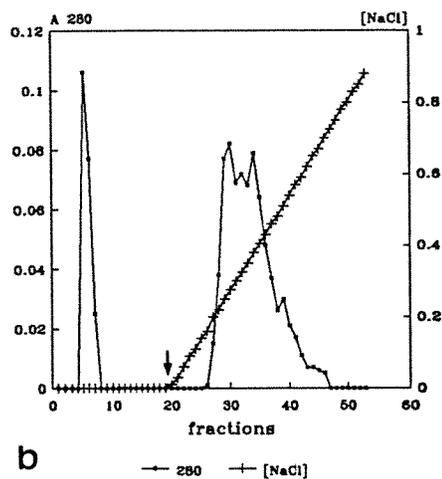
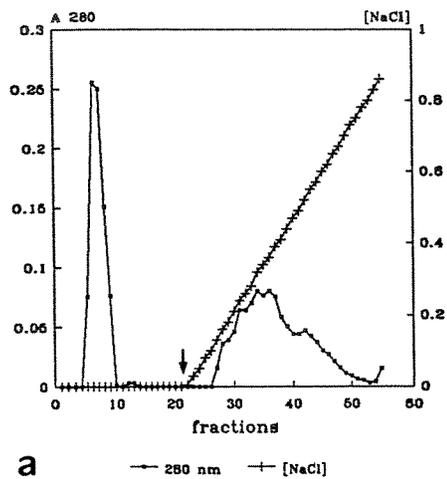


Figura 7: Cromatografia em DEAE-celulose do material extraído por GuHCl do TFDS. Proteínas não ligadas ao DEAE foram removidas por lavagem com tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,0, contendo uréia 7M. A eluição do material ligado foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 a 1M no mesmo tampão. → - início do gradiente.

a: Região proximal

b: Região intermediária

c: Região distal

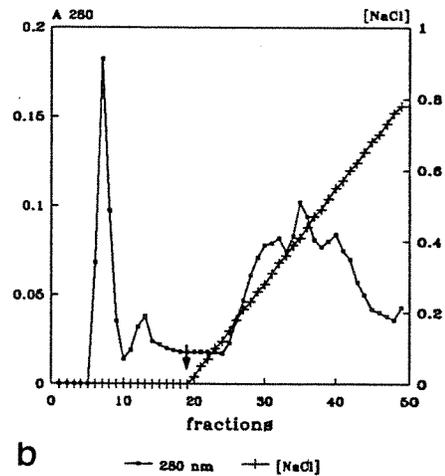
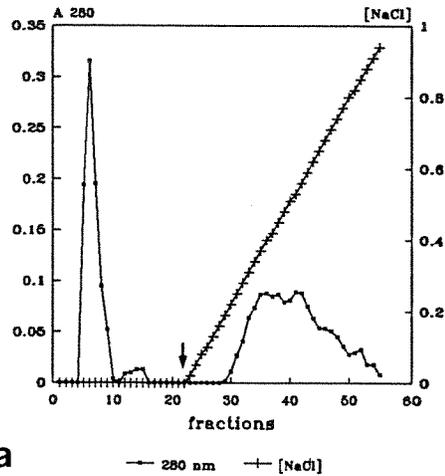


Figura 8: Cromatografia em DEAE-celulose do material extraído por GuHCl do TC. Proteínas não ligadas ao DEAE foram removidas por lavagem com tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,0, contendo uréia 7M. A eluição do material ligado foi efetuada com gradiente linear de NaCl de 0 a 1M no mesmo tampão. → - início do gradiente.

a: Região proximal

b: Região distal

6. Análise eletroforética em SDS-PAGE 4-16% das frações obtidas após cromatografia em DEAE-celulose.

6.1. Resultados comuns obtidos para os três tendões

Nos três tendões observou-se uma uniformidade nas proteínas que foram eluídas da coluna antes do gradiente, predominando sempre quantidades consideráveis de moléculas de colágeno (Figuras 9 a 16), como era esperado. Apesar disto, merece destaque o fato que nas frações eluídas após o gradiente apareceram bandas referentes ao colágeno nas três regiões. No TC, a quantidade de colágeno que eluiu antes do gradiente na coluna de DEAE-celulose foi maior na região proximal do que na região distal.

Proteínas com M_r entre 94 kDa e 232 kDa foram detectadas principalmente nas primeiras frações eluídas do gradiente para os três tendões.

As proteínas com M_r abaixo de 45 kDa foram identificadas em todas as regiões dos três tendões. A eluição destas proteínas ocorreu sempre nas primeiras frações após o gradiente da coluna de DEAE, com concentrações de NaCl entre 0,3 - 0,4M para o TFDP, 0,20 - 0,25M para o TFDS e 0,4M para o TC

6.2. Tendão do Músculo flexor digital profundo

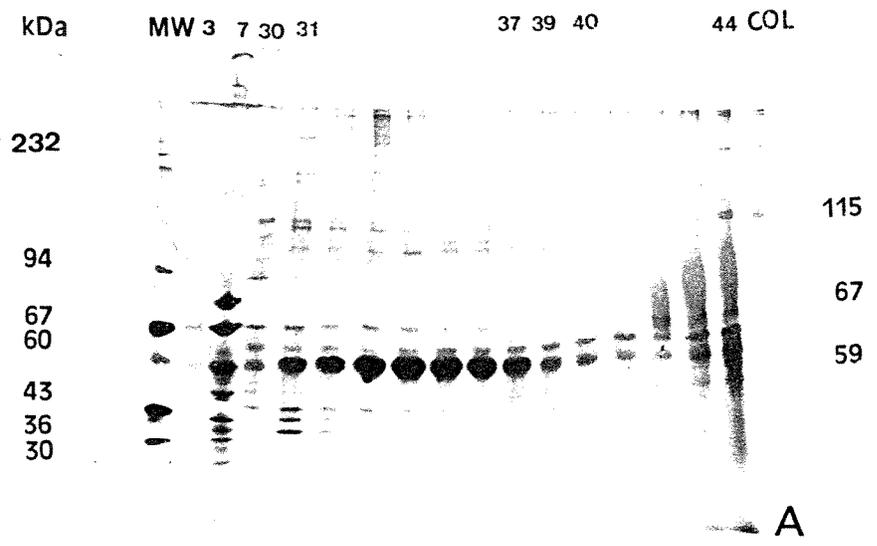
Uma proteína com Mr de 59 kDa apareceu em todas as regiões deste tendão quando SDS-PAGE foi feita em condições redutoras. Sua presença foi mais acentuada nas frações iniciais após o início do gradiente (concentração de NaCl entre 0,3 - 0,5M). Esta proteína com Mr 59 kDa, na ausência de 2-Me, migrou em torno de 67 kDa (Figura 9, 10 e 11).

Nas últimas frações do DEAE (concentração de NaCl entre 0,55 - 0,75M) de todas as regiões apareceu uma banda polidispersa com Mr variando entre 67 kDa e 115 kDa, independente da presença de 2-Me. Ao contrário das regiões intermediária e proximal, para a região distal essa banda foi mais evidente em condições não redutoras.

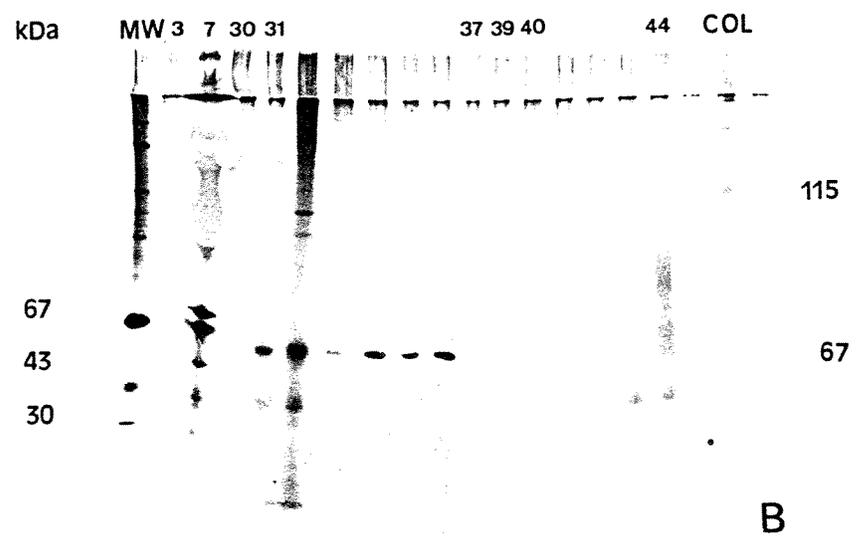
Figura 9: SDS-PAGE de frações de DEAE da região proximal do TFDP. MW : padrão de peso molecular; **-SH:** sem 2-Me; **+SH:** com 2-Me; **col:** colágeno. Condições: 25mA, 200 volts durante 3h e 30 min. Padrões de peso molecular: catalase-tetrâmero (232 kDa), lactato desidrogenase (140 kDa), fosforilase (94 kDa), albumina de soro bovino (67 kDa), catalase-monômero (60 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor tripsina (20 kDa), ferritina (18 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).

A: Frações 3 e 7 eluídas antes do gradiente. Frações 30 a 44 eluídas após o gradiente. Na posição de 115 kDa podemos observar o colágeno, e entre 67 kDa e 115 kDa uma banda polidispersa. Notar uma proteína com 59 kDa especialmente nas frações 31 a 39. Na fração 31 podemos observar diversas proteínas abaixo de 45 kDa.

B: Eletroforese das mesmas frações mas em condições redutoras. A presença da proteína de 59 kDa foi menos marcante. Nessas condições esta proteína migra com Mr de 67 kDa. Observe que uma apreciável quantidade de material não conseguiu entrar no gel de separação.



+SH



-SH

Figura 10: SDS-PAGE de frações de DEAE da região intermediária do TFDP. MW: padrão de peso molecular; -SH: sem 2-Me; +SH: com 2-Me; col: colágeno. Condições: 25mA, 200 volts durante 3h e 30 min.

A: Fração 7 eluída antes do gradiente. Frações 33 a 46 eluídas após o gradiente de NaCl. Entre 115 kDa e 67 kDa observamos uma banda polidispersa. Uma proteína foi observada na altura de 59 kDa. Proteínas com Mr abaixo de 45 kDa são observadas principalmente nas primeiras frações logo após o gradiente.

B : Eletroforese das mesmas frações, mas em condições não redutoras. A proteína que migrou em 59 kDa no gel +SH, aqui apareceu por volta de 67 kDa. A banda polidispersa está menos expressiva nessas condições.

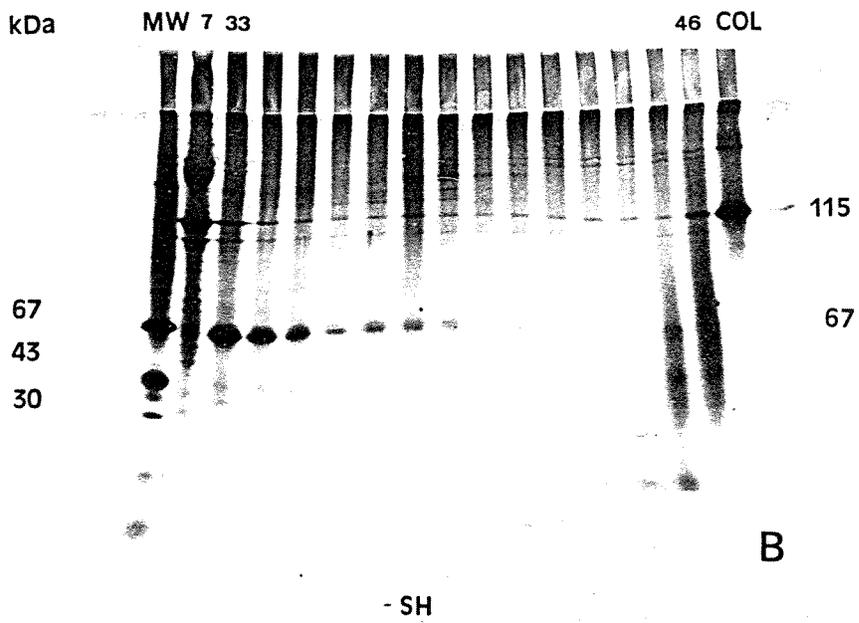
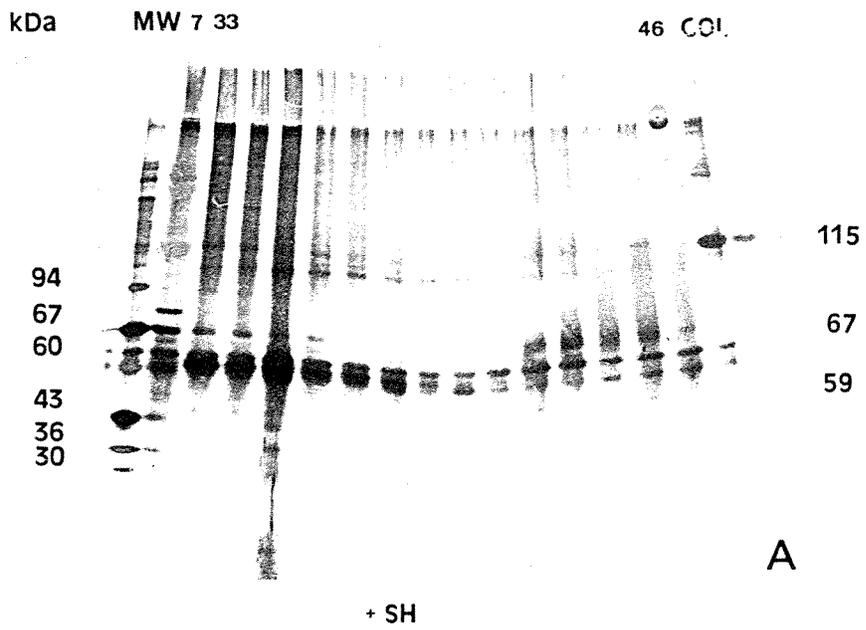
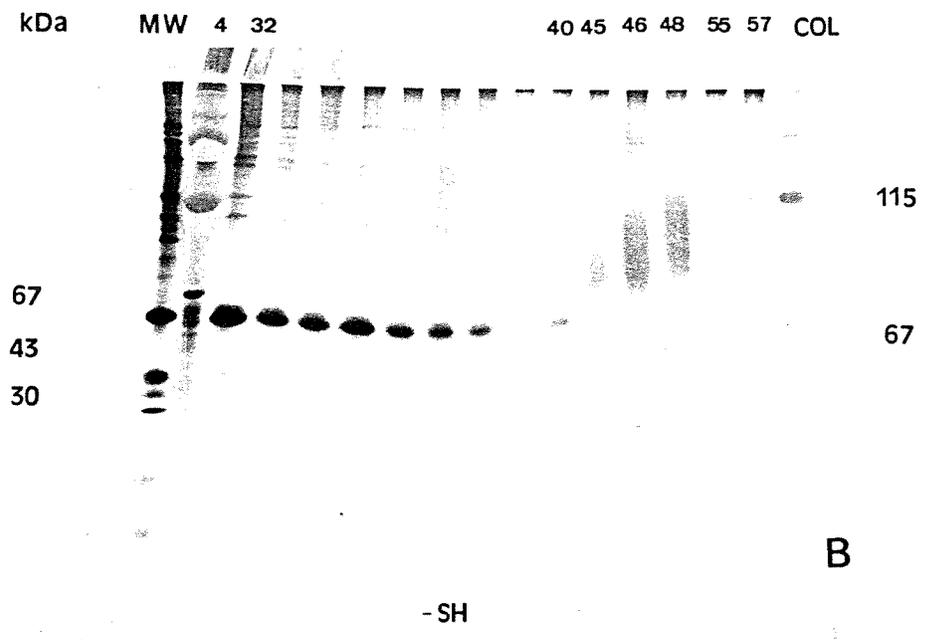
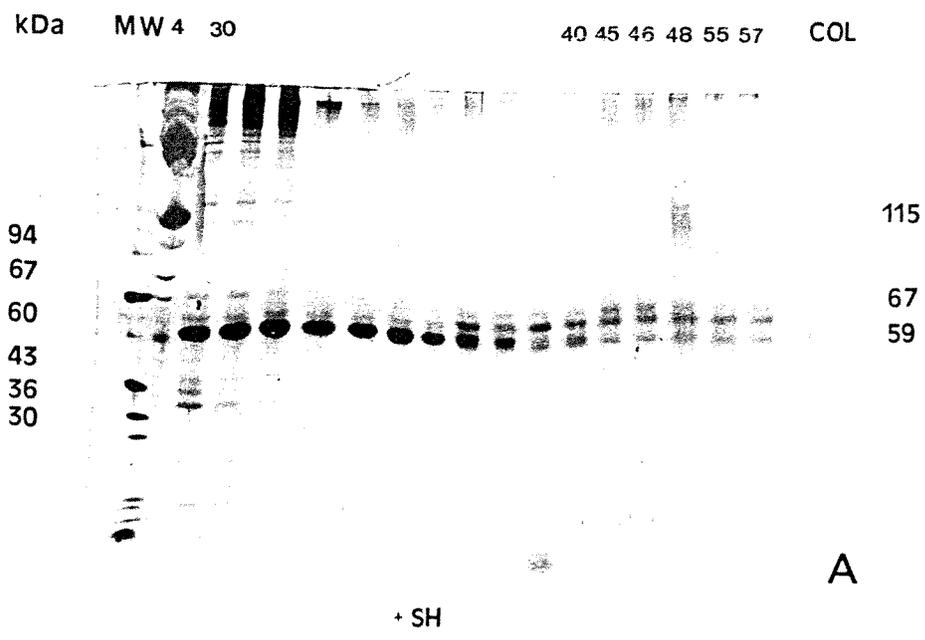


Figura 11: SDS-PAGE de frações de DEAE da região distal do TFD. **MW:** padrão de peso molecular; **-SH:** sem 2-Me; **+SH:** com 2-Me; **col:** colágeno. Condições : 25 mA, 200 volts durante 3 h e 30 mi.

A: Fração 4 eluída antes do gradiente mostrando presença de colágeno. Frações 30 a 57 eluídas após o gradiente. A banda polidispersa aparece sutilmente. A proteína de 59 kDa está presente em todas as frações. Entre 232 kDa e 94 kDa podemos observar diversas proteínas, entre elas o colágeno, que eluiu da coluna de DEAE nas primeiras frações após o gradiente. Nessas frações observamos também a presença de proteínas com Mr abaixo de 45 kDa.

B: Eletroforese das mesmas frações, mas em condições não redutoras. A presença da proteína de 67 kDa (59 kDa em +SH) foi bem expressiva. As proteínas com Mr abaixo de 45 kDa foram pouco evidentes. A banda polidispersa foi mais marcante em -SH.



6.3. Tendão do Músculo flexor digital superficial

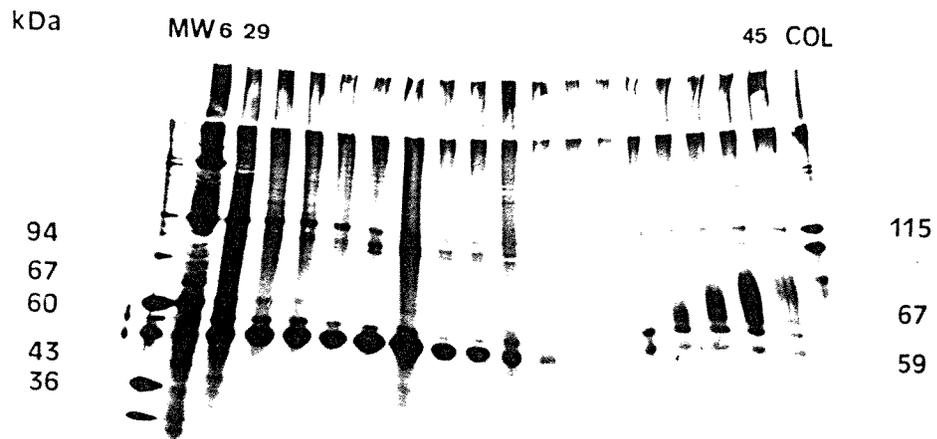
Nos géis em condições redutoras do TFDS migrou uma proteína com Mr em torno de 59 kDa, enquanto em condições não redutoras sua migração foi por volta de 67 kDa (Figura 12, 13 e 14). Esta proteína estava presente em todas as frações, sendo que naquelas eluídas com concentrações de NaCl entre 0,15 a 0,37M havia quantidades mais expressivas.

A proteína representada no gel por uma banda polidispersa de 67 kDa e 115 kDa, estava presente nas frações do DEAE eluídas com concentrações de NaCl acima de 0.35M, em todas as regiões . Na região proximal, a eletroforese mostrou que esta proteína foi bem mais expressiva em presença de 2-Me do que sem 2-Me. Já na região intermediária sua presença foi igualmente expressiva nas duas condições, enquanto na região distal foi pouco evidente nas condições redutoras e não redutoras.

Figura 12: SDS-PAGE de frações de DEAE da região proximal do TFDS. MW: padrão de peso molecular; -SH: sem 2-Me; +SH: com 2-Me; col: colágeno. Condições de corrida: 25 mA, 200 volts durante 3 h e 30 min.

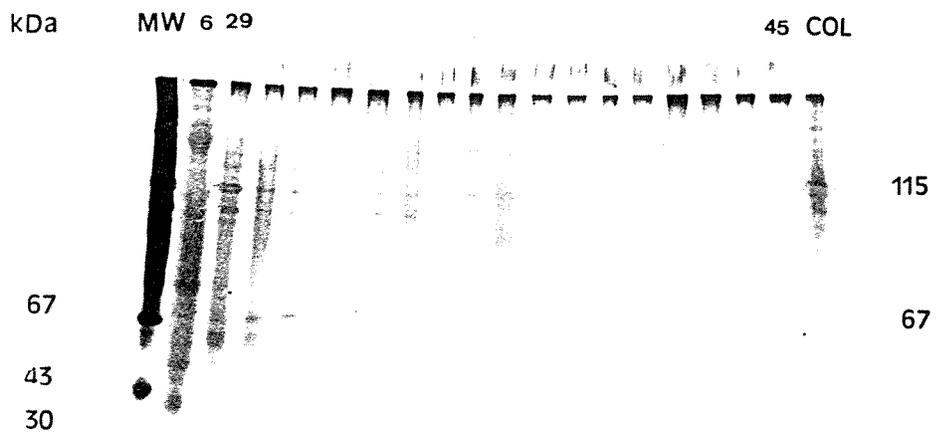
A: Podemos observar proteínas entre 94 kDa e 232 kDa principalmente nas primeiras frações do gradiente de DEAE-celulose. Está presente também uma proteína na altura de 59 kDa em todas as frações. Uma banda polidispersa com peso molecular entre 67 kDa e 115 kDa foi mais evidente nessas condições. As proteínas abaixo de 45 kDa podem ser observadas na fração 30 do gel +SH.

B: Eletroforese das mesmas frações, mas em condições não redutoras. A proteína que migrou com 67 kDa é pouco expressiva nessas condições, o mesmo ocorrendo com a proteína de 67 kDa a 115 kDa. As proteínas com Mr abaixo de 45 kDa foram pouco evidentes. Podemos observar apreciável quantidade de material retido no topo do gel.



A

+ SH

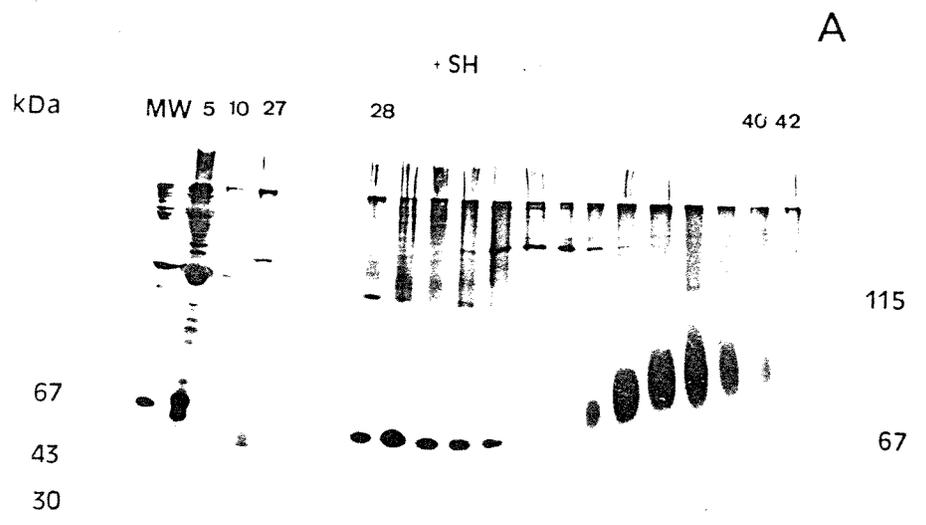
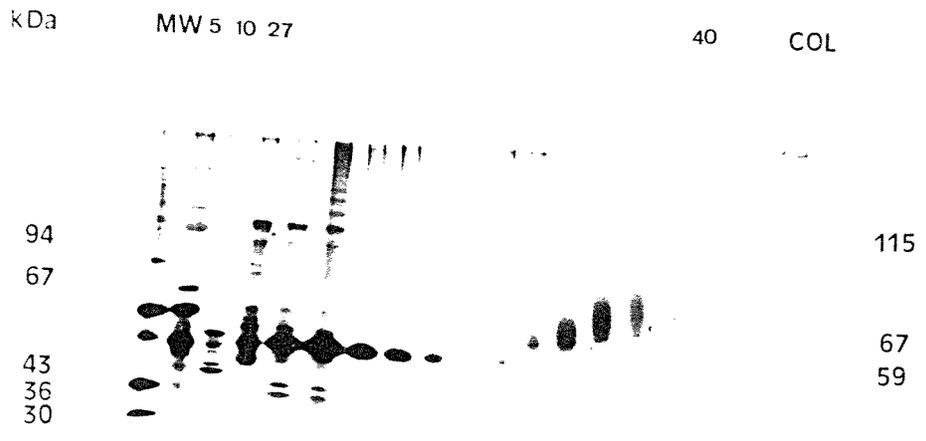


B

- SH

Figura 13: SDS-PAGE de frações de DEAE da região intermediária do TFDS. MW: padrão de peso molecular; -SH: sem 2-Me; +SH: com 2-Me; col: colágeno. Condições de corrida: 25 mA, 200 volts durante 3 h e 30 min.

A e B: Nesta região, a banda polidispersa aparece com a mesma intensidade em +SH e em -SH entre 67 kDa e 115 kDa. O mesmo acontece com a proteína que migrou com 59 kDa em +SH e 67 kDa em -SH. Entre 94 e 232 kDa podemos observar proteínas que eluíram antes e depois do gradiente. As proteínas com Mr abaixo de 45 kDa também estão presentes na mesma proporção nas duas condições.



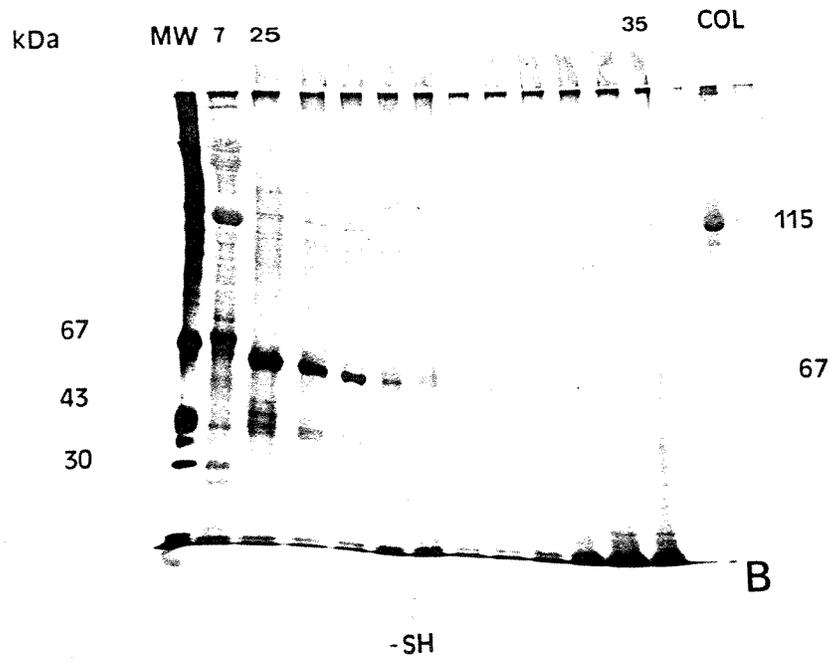
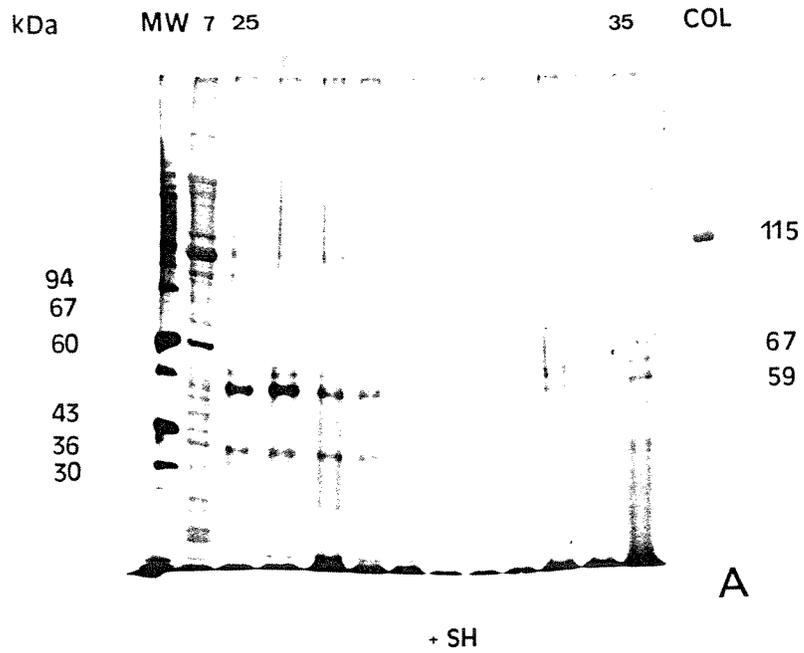
- SH

B

Figura 14: SDS-PAGE de frações de DEAE da região distal do TFDS. MW: padrão de peso molecular; -SH: sem 2-Me; +SH: com 2-Me; col: colágeno. Condições de corrida: 25 mA, 200 volts durante 3h e 30 min.

A: A banda polidispersa aparece discretamente nessas condições. A proteína com Mr de 59 kDa foi mais expressiva nas frações de 25 a 28. As proteínas entre 94 kDa e 232 kDa não aparecem com tanta intensidade como nas regiões proximal e intermediária.

B: Eletroforese das mesmas frações, mas em condições não redutoras. A proteína com Mr 67 kDa foi bem expressiva nas frações de 25 a 28. A presença da banda polidispersa foi bem sutil nessas condições. No topo do gel observamos material que ficou retido.



6.4. Tendão calcâneo

No TC, a proteína com Mr 59 kDa foi visível em todas as frações, sendo mais evidente nas frações de números 31 a 42 da região proximal, que foram eluídas com concentração de NaCl entre 0,3 e 0,58M (Figura 15). Já na região distal, as bandas com Mr 59 kDa foram eluídas em uma faixa mais estreita de concentração de NaCl (0,3 a 0,4M) (Figura 16).

A proteína polidispersa de 67 kDa e 115 kDa estava presente nas duas regiões. Na região distal ela apareceu sutilmente na presença de 2-Me, tendo sido melhor evidenciada na ausência deste redutor. A eluição desta proteína foi em torno de 0,7M de NaCl para a região proximal, e em torno de 0,5 a 0,6M NaCl, para a região distal.

Figura 15: SDS-PAGE de frações de DEAE da região proximal do TC. MW: padrão de peso molecular; -SH: sem 2-Me; +SH: com 2-Me; col: colágeno. Condições de corrida : 25 mA, 200 volts durante 3h e 30 min.

A: Observar uma banda polidispersa com Mr entre 67 kDa e 115 kDa, que eluiu da coluna nas frações 47 e 48. A proteína de 59 kDa apresentou uma eluição mais ampla ao longo do gradiente, mas foi predominante nas frações 34 a 42. Proteínas na altura entre 94 kDa e 115 kDa estão presentes no gel. As proteínas com Mr abaixo de 45 kDa foram mais expressivas na fração 35.

B: Eletroforese das mesmas frações, mas em condições não redutoras. A presença do componente com Mr entre 67 kDa e 115 kDa foi bem sutil. A proteína de 59 kDa migrou nessas condições com Mr 67 kDa. As proteínas com Mr entre 94 kDa e 232 kDa estão presentes como no gel +SH. Na fração 35 foram observadas as proteínas com Mr abaixo de 45 kDa. Tanto em +SH quanto em -SH podemos observar material retido no topo do gel.

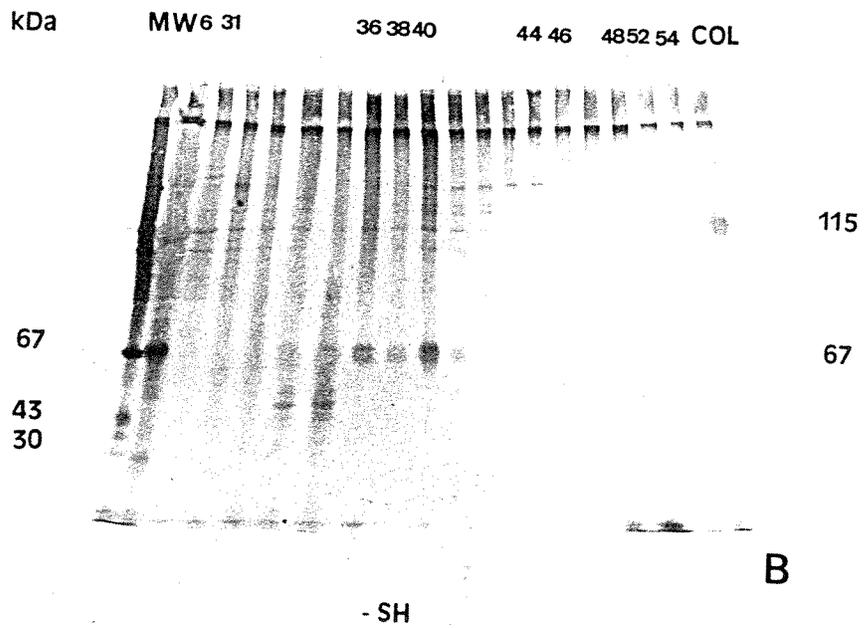
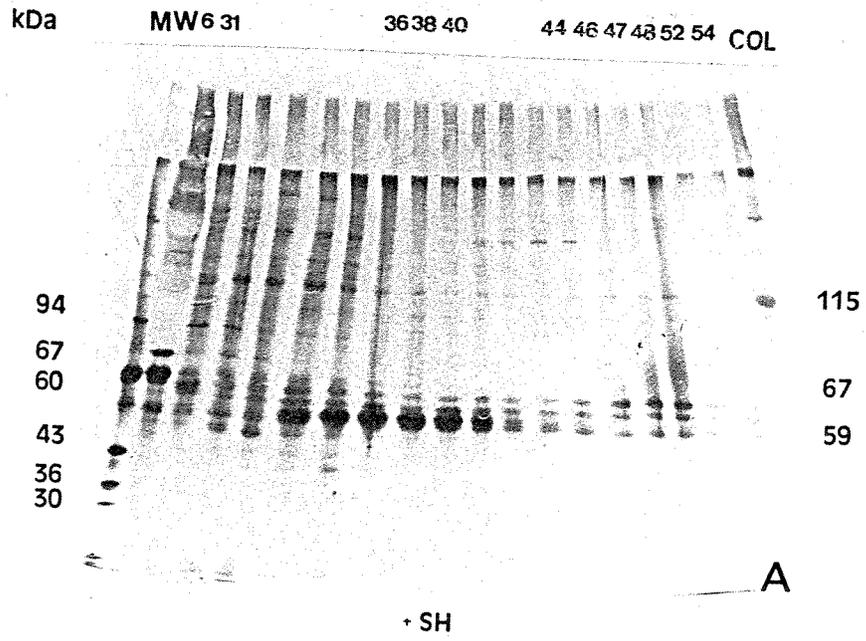
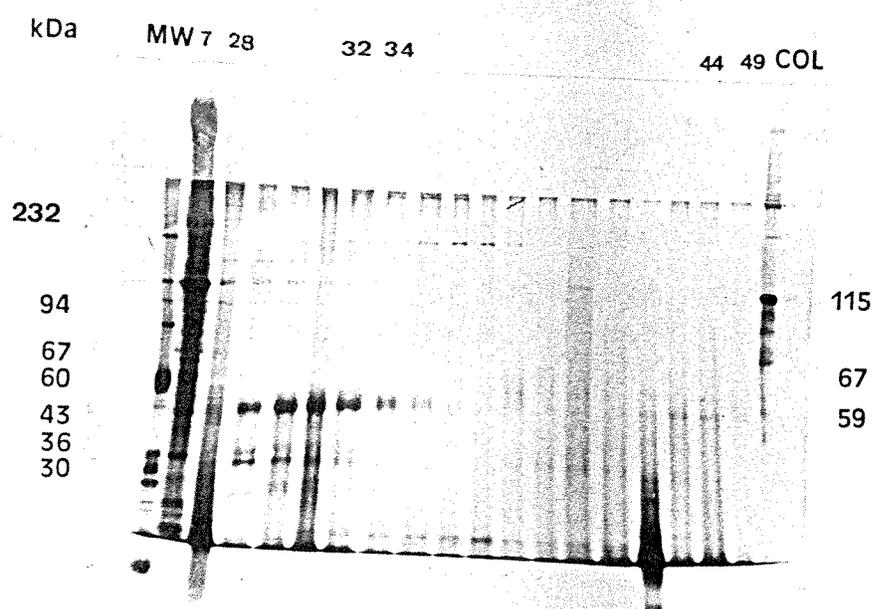


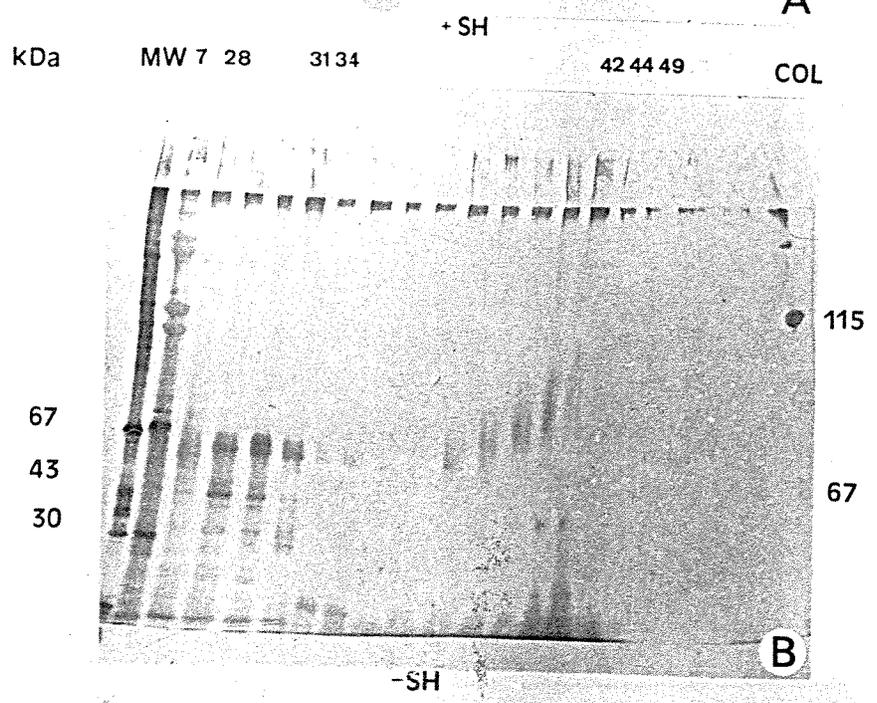
Figura 16: SDS-PAGE de frações de DEAE da região distal do TC. MW: padrão de peso molecular; -SH: sem 2-Me; +SH: com 2-Me; col: colágeno. Condições de corrida; 25 mA, 200 volts durante 3 h e 30 min.

A: Eletroforese em condições redutoras. O componente de Mr entre 67 kDa e 115 kDa foi pouco expressivo em +SH, enquanto a proteína de 59 kDa foi claramente observada. As proteínas entre 94 kDa e 232 kDa foram bem visíveis. As proteínas com Mr abaixo de 45 kDa foram observadas nas primeiras frações após o gradiente.

B: Eletroforese das mesmas frações, mas em condições não redutoras. As proteínas com Mr entre 94 kDa e 232 kDa praticamente não foram visíveis. A proteína polidispersa foi observada claramente. A proteína de 59 kDa migrou com Mr igual a 67 kDa nessas condições. Observar que há material retido no topo do gel.



A



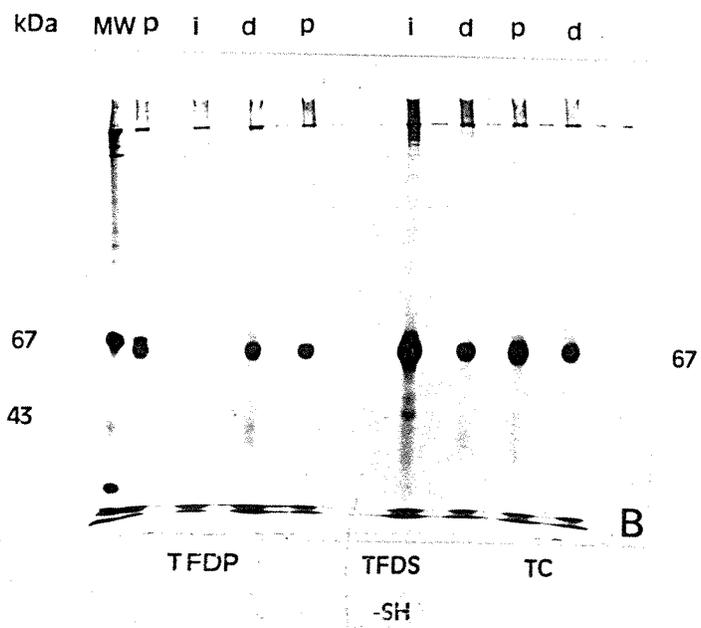
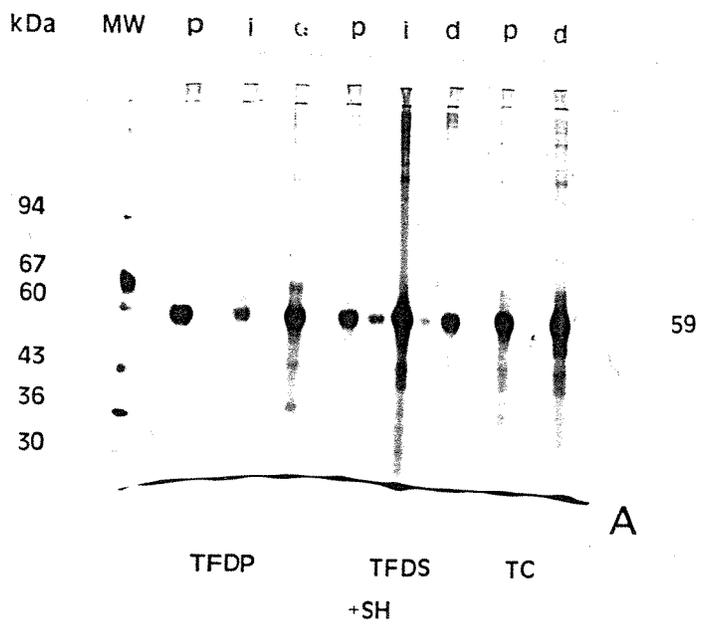
B

-SH

7. Análise eletroforética em SDS-PAGE 8% do material obtido após cromatografia em DEAE-celulose.

Na análise eletroforética, em concentração fixa de 8%, foram escolhidas as frações do DEAE das diferentes regiões de cada tendão em que predominava o componente com 59 kDa. A corrida se deu em presença ou ausência de 2-Me. Confirmando o que já tínhamos observado quando a corrida foi em gradiente de poliacrilamida, também aqui foi notado, com mais clareza, que a proteína que migra em torno de 59 kDa migrava em uma posição correspondente a 67 kDa na presença de 2-Me (Figura 17).

Figura 17: SDS-PAGE 8 % das regiões proximal, intermediária e distal dos TFDP e TFDS e das regiões proximal e distal do TC. Condições de corrida: 25 mA, 200 volts durante 3h e 30 min. **A:** +SH (com 2-Me). **B:** -SH (sem 2-Me). Padrões de peso molecular: catalase-tetrâmero (232 kDa), lactato desidrogenase (140 kDa), fosforilase (94 kDa), albumina de soro bovino (67 kDa), catalase-monômero (60 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor tripsina (20 kDa), ferritina (18 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).



8. Teste imunoquímico

O teste imunoquímico das frações de DEAE-celulose de cada região dos tendões, ricas em componente com Mr de 59 kDa usando o anticorpo anti-fibromodulim, mostrou reação positiva para duas bandas. Uma delas, que migra um pouco acima do padrão de peso molecular de 57.8 kDa (fumarase) e a outra, com maior peso molecular, que migra um pouco abaixo do padrão de peso molecular de 72.7 kDa (piruvato quinase) (Figura 18).

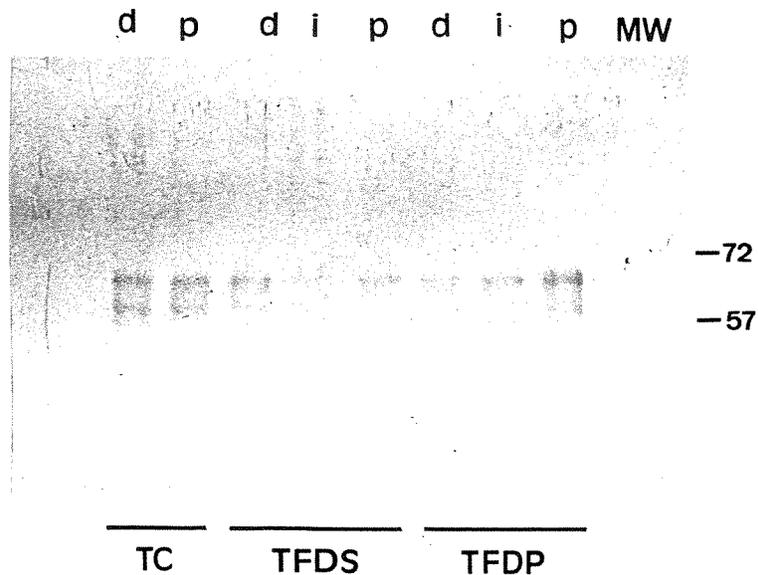


Figura 18: Teste imunológico das frações das regiões distal e proximal do TC, distal, intermediária e proximal dos TFDS e TFDP. Observar que a reação positiva ocorre tanto em uma banda correspondente à proteína de 59 kDa (acima de 57.8 kDa), como para uma banda migrando em posição abaixo de 72.7 kDa. Padrões de peso molecular: α_2 macroglobulina (191 kDa), β -galactosidase (117 kDa), frutose-6-fosfato quinase (91,8 kDa), piruvato quinase (72,7 kDa), fumarase (57,8 kDa), desidrogenase lacta (40,8 kDa), triose-fosfato isomerase (34,1 kDa)

9. Teste de intumescimento

As propriedades de intumescimento do TFDP, do TFDS e do TC são mostradas nas figuras 19 e 20.

Quando as regiões proximal, intermediária e distal do TFDP foram transferidas do PBS para água destilada (Figura 19), o peso úmido decresceu 0,1%, 2,7% e 3,9%, respectivamente. Em seguida, com o tratamento destas mesmas regiões em ácido acético a 3% (Figura 20), o peso úmido aumentou em 617%, 670% e 952% nas regiões proximal, intermediária e distal.

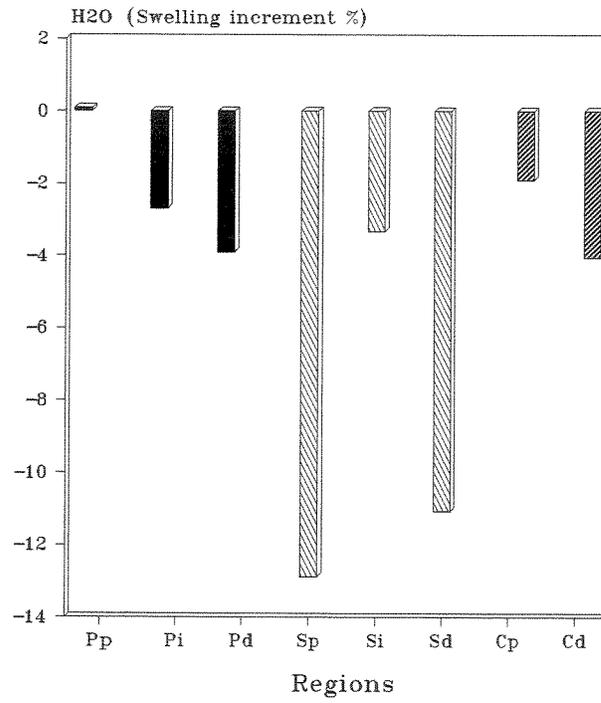
No TFDS o decréscimo de peso ocorrido quando as regiões foram transferidas do tampão para a água destilada (Figura 19) foi de 12,9%, 3,3% e 11,1% para as regiões proximal, intermediária e distal. Com a subsequente mudança da água para o ácido acético a 3% (Figura 20) ocorreu um aumento de 824,6%, 468,3% e 640% nas regiões proximal, intermediária e distal.

As regiões proximal e distal do TC também perderam peso quando foram transferidas de PBS para a água destilada (Figura 19). A região proximal decresceu 1,90%, e a região distal 4,0%. Em ácido acético 3% (Figura 20) houve um aumento de peso igual a 700,25% na região proximal e 388,8% na região distal.

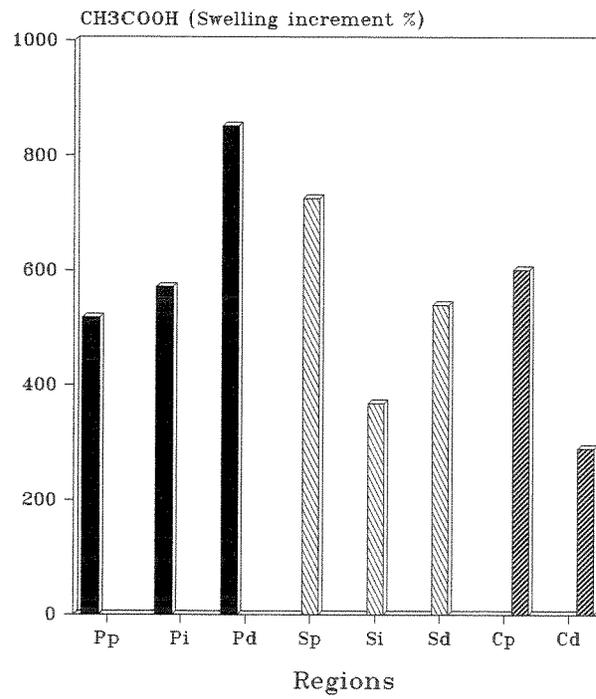
Na figura 21 pode ser observado o aspecto das regiões de cada tendão antes e após embebição em ácido acético 3%.

Figura 19: Teste de intumescimento. Decréscimo do peso úmido de cada região após a transferência do PBS para a água destilada. Pp-região proximal do TFDP; Pi-região intermediária do TFDP; Pd-região distal do TFDP. Sp-região proximal do TFDS; Si-região intermediária do TFDS; Sd-região distal do TFDS; Cp-região proximal do TC; Cd-região distal do TC.

Figura 20: Teste de intumescimento. Aumento do peso úmido de cada região após a transferência das amostras da água destilada para o ácido acético. Pp-região proximal do TFDP; Pi-região intermediária do TFDP; Pd-região distal do TFDP. Sp-região proximal do TFDS; Si-região intermediária do TFDS; Sd-região distal do TFDS; Cp-região proximal do TC; Cd-região distal do TC.



19



20

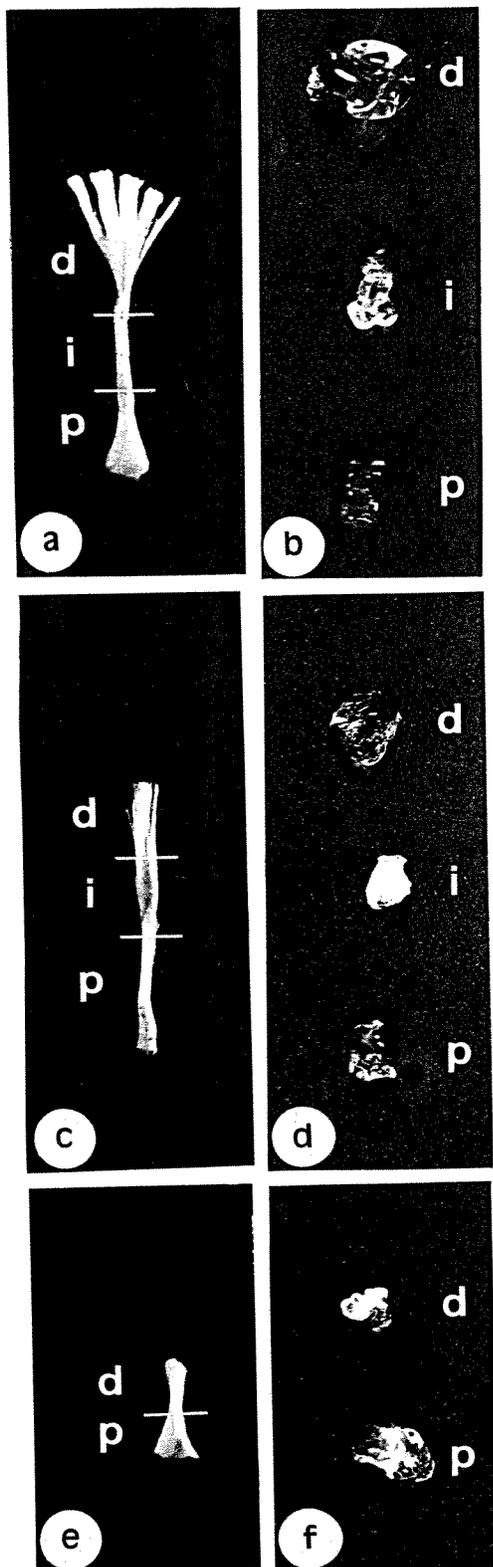


Figura 21: Teste de intumescimento. Modificações apresentadas pelas diferentes regiões após a embebição das amostras em ácido acético 3%. Nas figuras **a**, **c** e **e** podemos observar o aspecto das regiões de cada tendão antes do intumescimento em ácido acético. **a**: Regiões proximal, intermediária e distal do TFDP. **b**: Regiões do TFDP após a retirada do ácido acético. **c**: Regiões proximal, intermediária e distal do TFDS. **d**: Regiões do TFDS após a retirada do ácido acético. **e**: Regiões proximal e distal do TC. **f**: Regiões do TC após a retirada do ácido acético.

10. Extração de componentes colagênicos e não colagênicos pelo tratamento com ácido acético

A proporção de colágeno para cada região dos tendões foi estimada a partir da razão A236/A280.

A figura 22 mostra os valores absorciométricos para os extratos de cada região dos diferentes tendões e a figura 23 apresenta as curvas espectrais para os extratos das diferentes regiões dos tendões com ácido acético 3%.

Podemos notar que na região proximal do TFDP a proporção de colágeno em relação as regiões intermediária e distal é maior.

Com relação ao TFDS, as regiões proximal e distal apresentaram uma proporção maior de colágeno solubilizado em relação a região intermediária.

Por outro lado, no TC as duas regiões apresentaram praticamente a mesma proporção de colágeno.

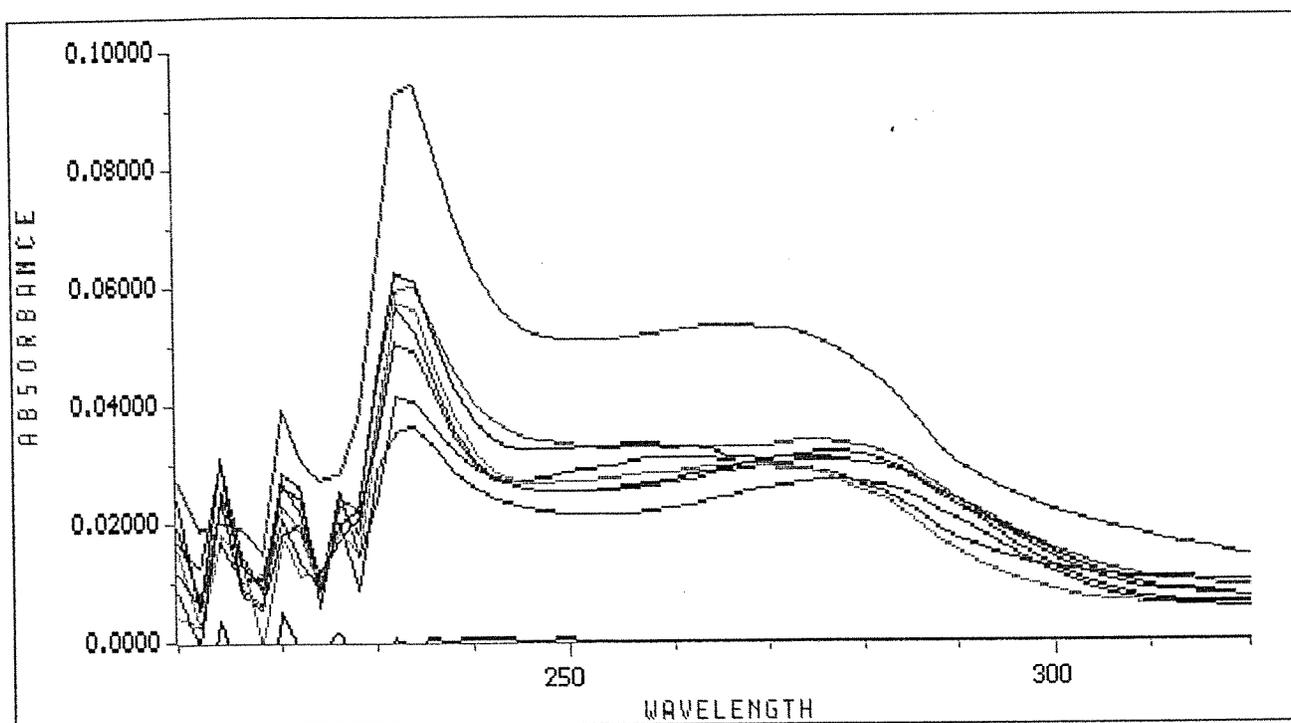


Figura 22 : Curvas de absorção espectral na faixa de 210nm a 320nm das diferentes regiões dos TFDP, TFDS e TC após o tratamento com ácido acético 3%. TFDP, regiões proximal (verde), intermediária (azul claro), e distal (vermelho); TFDS, regiões proximal,(maravilha), intermediária (laranja) e distal (cinza claro); TC, regiões proximal (cinza escuro) e distal, (azul).

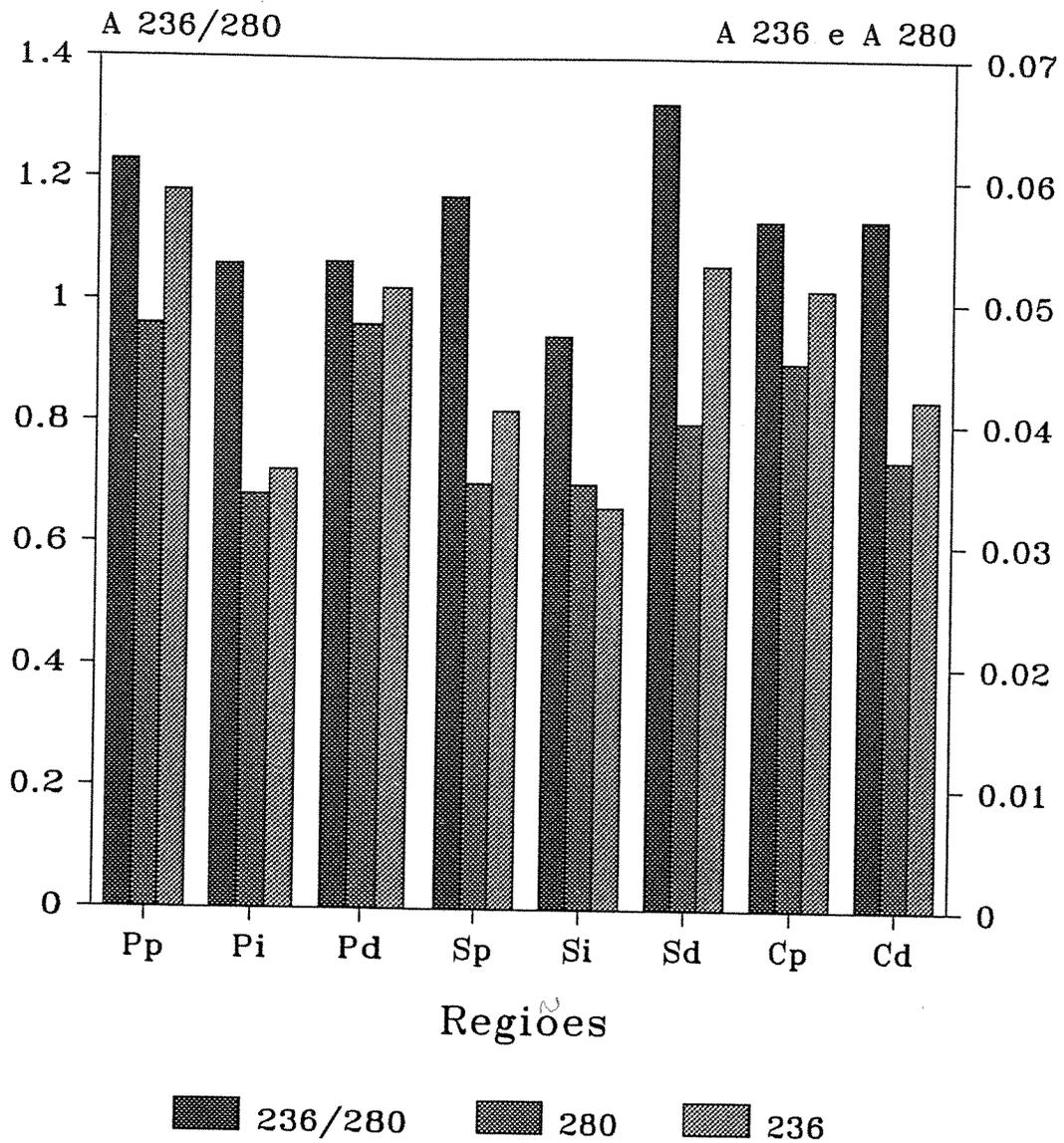


Figura 23: Estimativa da proporção do colágeno das diferentes regiões do TFDP, TFDS e TC. Pp-região proximal do TFDP; Pi-região intermediária do TFDP; Pd-região distal do TFDP. Sp-região proximal do TFDS; Si-região intermediária do TFDS; Sd-região distal do TFDS; Cp-região proximal do TC; Cd-região distal do TC.

DISCUSSÃO

1. Considerações gerais

Diversos trabalhos com tendões que contornam uma articulação antes da inserção que ocorre em uma direção que é diferente à do músculo, caracterizaram essas estruturas como "wrap around" (ALEXANDER & DIMERY, 1985). Na articulação, o tendão recebe forças de compressão adicionais às forças de tensão. Essas forças são exercidas pelo osso próximo ao tendão, e o atingem perpendicularmente, onde ele é pressionado (ALEXANDER & DIMERY, 1985). Para resistir a essas forças de compressão e fricção, estes tendões exibem na superfície de articulação uma estrutura como uma almofada cartilaginosa (CARVALHO, 1995). Neste local, a região assemelha-se a uma fibrocartilagem por apresentar feixes de colágeno espessos, quantidade elevada de PGs e células semelhantes a condrócitos (CARVALHO, 1995).

Estudos com tendões "wrap around" de diversos animais mostraram estruturas semelhantes a fibrocartilagem (VOGEL & KOOB, 1989; OKUDA *et alli*, 1987a, 1987b; GILLARD *et alli*, 1979; MERRILEES & FLINT, 1980; CARVALHO & VIDAL, 1994). A região fibrocartilaginosa desses tendões que sofrem forças de compressão possui uma quantidade elevada de PG (GILLARD *et alii*, 1979; VOGEL & HEINEGÅRD 1985; VOGEL *et alii*, 1986; OKUDA *et alii*, 1987a, 1987b). No caso do tendão de boi 40% desses PG são capazes de agregar-se com o ácido hialurônico (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; EVANKO & VOGEL, 1990). A presença desses grandes PGs foi associada com a capacidade do tendão em resistir à forças de compressão (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; VOGEL *et alii*, 1986; VOGEL & KOOB, 1989) como ocorre em cartilagem hialina.

CARVALHO (1995) sugeriu que a capacidade de resistir à forças de compressão observada em fibrocartilagens não pode ser atribuída somente a existência de grandes PGs agregantes com base em analogia direta com as cartilagens hialinas, mas também devido a

uma interrelação especial entre a arquitetura do colágeno e PGs, trabalhando coordenadamente para fornecer diferentes mecanismos específicos para a resistência à forças de compressão em cada tipo de tecido. Provavelmente as PNC também tenham algum papel na regulação de interações entre moléculas de colágeno e PGs.

Tendões de bois (VOGEL & KOOB, 1989), cães (OKUDA *et alii*, 1987a, 1987b) e rãs (CARVALHO & VIDAL, 1994) apresentam na região sob compressão uma cápsula sinovial rígida, enquanto tendões de coelhos (GILLARD *et alii*, 1979; MERRILEES & FLINT, 1980) apresentam nesta mesma região uma camada adventícia denominada paratendíneo. Estudos em tendões humanos (VOGEL *et alii*, 1993) mostraram características similares àquelas descritas para os tendões de boi (VOGEL & KOOB, 1989) e rã (CARVALHO & VIDAL, 1994).

Enquanto existem tendões que desenvolvem uma estrutura como uma fibrocartilagem em regiões sujeitas a diferentes forças biomecânicas, outros tendões exibem variações em composição ao longo de sua estrutura, algumas vezes sem caracterizar alterações morfológicas evidentes (JONES & BEE, 1990; CURWIN *et alii*, 1994). Essas variações são consequências de adaptações a diferentes situações biomecânicas que devem ocorrer ao longo de seu percurso da inserção mio-tendinosa à inserção óssea.

Estudos com tendões de equinos (JONES & BEE, 1990) e aves (CURWIN, *et alii*, 1994) mostraram que diferentes regiões do tendão podem estar sujeitas a diferentes condições de forças. Essas variações de forças podem ser importantes na análise de diferentes segmentos de um mesmo tendão ou na comparação de amostras obtidas de diferentes partes de um único tendão. Existem evidências sugerindo que, pelo menos mecanicamente ocorrem variações na direção proximal-distal de um tendão (BUTLER *et alii*, 1978 apud CURWIN, 1994; DANIELSEN & ANDREASSEN, 1988).

2. Tendão do Músculo flexor digital profundo

O TFDP de rato estudado neste trabalho apresenta uma região que contorna a articulação e está em contato direto com o osso. Neste local o tendão está envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo que faz com que o mesmo se mantenha junto à articulação. Este tendão foi dividido em três partes considerando as regiões que supostamente sofrem forças de tensão e de tensão e compressão juntas. A região chamada de intermediária pode receber essas forças de compressão por ser a parte do tendão que contorna a articulação. A região proximal, que origina-se no *Músculo flexor digitorum profundus*, e a região distal que estende-se aos dígitos aparentemente recebem apenas forças de tensão.

O TFDP pode ser classificado como um tendão "wrap around", entretanto, não sabemos ainda se o mesmo apresenta a estrutura de uma fibrocartilagem na região intermediária que contorna a articulação e está sob forças de compressão, como encontrado em diversos animais (GILLARD *et alii*, 1979; MERRILEES & FLINT, 1980; OKUDA *et alii*, 1987a, 1987b; VOGEL & KOOB, 1989; CARVALHO & VIDAL, 1994). Nesta região não foram observadas diferenças morfológicas macroscópicas.

As dosagens de proteínas (BRADFORD, 1976) dos extratos de cada região do TFDP mostraram que as quantidades de proteínas extraídas nas três regiões foram diferentes. Os extratos das regiões intermediária e distal apresentaram quantidades equivalentes de proteínas extraídas por miligrama de tendão, enquanto na região proximal aquela proporção foi bem inferior. Como este método não é sensível ao colágeno, podemos concluir que as regiões intermediária e distal estão sendo extraídos mais componentes não colagênicos do que na região proximal. Por outro lado, avaliando os resultados obtidos do tratamento de cada região do tendão, com ácido acético 3%, pode-se inferir que a

proporção de colágeno em relação aos demais componentes é maior na região proximal do que nas regiões intermediária e distal.

Com relação à quantidade de GAGs sulfatados presentes em cada região observamos que a região intermediária possui aproximadamente 4,7 vezes mais GAGs sulfatados do que a região proximal, e 2 vezes mais do que a região distal. Além do aumento no conteúdo de GAG esta região diferencia-se também por apresentar CS (que corresponde a 32% dos GAGs). A exemplo do que ocorre em tendões que contornam a articulação em bovinos (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985), acredita-se que este CS faça parte da constituição de grandes proteoglicanos.

Estudos em cultura de explantes de regiões de tendão bovino sujeitas à forças de compressão e de tensão apresentaram redução na síntese de PG após vários dias de cultivo, em ausência de forças biomecânicas (KOOB & VOGEL, 1987b). Segundo esses autores esta redução na síntese de PG foi resultado da falta de estímulo mecânico durante o período de cultura. Outros estudos também com cultura de explantes de discos de fibrocartilagem de tendão bovino mas com presença de forças de compressão *in vitro* durante o tempo de cultura mostraram que neste caso havia aumento da produção de grandes PG (KOOB *et alii*, 1992). Estes resultados confirmam que em tendão existe uma relação entre grandes PGs e presença de forças de compressão. Nossos dados com TFDP mostraram que apesar da região intermediária deste tendão não apresentar diferenças morfológicas macroscópicas e microscópicas (CARVALHO, 1995-comunicação pessoal), a presença de CS indica que forças de compressão estejam atuando neste local além das forças de tensão.

Precisa ser considerado contudo que, a presença de CS pode também ser devida a imaturidade do tendão (VIDAL & MELLO, 1984), já que a idade de 3 meses dos ratos analisados referem-se a idade adulto jovem. Sendo assim, os tendões poderiam não ter atingido a maturidade. Deste modo, a presença de CS não estaria diretamente relacionada a

presença de forças biomecânicas adicionais, mas ao desenvolvimento do tendão e/ou do animal.

A presença de dermatam sulfato nas três regiões está aparentemente relacionada a presença do pequeno PG decorim. Este pequeno PG possui uma cadeia de dermatam sulfato ligado ao "core" proteico.

A análise eletroforética das frações eluídas da cromatografia em DEAE-celulose não mostrou diferenças marcantes entre as três regiões. Na região intermediária contudo nota-se que há maior quantidade de material retido no topo do gel do que nas regiões proximal e distal. Este resultado aliado com o resultado da eletroforese em gel de agarose onde CS foi evidenciado reforça a idéia da existência de grandes PG na região intermediária. Embora não se tenha notado qualquer aparente modificação na região intermediária em relação as regiões proximal e distal, a presença de CS nesta região sugere que o TFDP deva experimentar forças compressivas na região curva onde contorna a articulação.

Como o tendão é um tecido tipicamente fibroso, grande quantidade de colágeno é encontrado nas frações da cromatografia eluídas antes do gradiente de NaCl. Isto ocorre porque a molécula de colágeno apresenta cargas predominantemente positivas no pH do tampão, o que dificulta a sua ligação a resina de DEAE-celulose. Após a aplicação do gradiente de NaCl no entanto continua ocorrendo eluição do colágeno, mostrando que parte da população destas moléculas é capaz de se ligar ao DEAE. É possível que isto ocorra devido a associação desta molécula com algum outro componente da matriz que se liga à resina de DEAE-celulose.

A eluição de proteínas com Mr entre 94 kDa e 232 kDa logo no início do gradiente de NaCl, indica que aquelas proteínas possuem baixa densidade de cargas negativas em pH 6,0.

Com base no padrão cromatográfico, no Mr e no experimento imunoquímico foi confirmado que a proteína de Mr igual a 59 kDa corresponde ao pequeno proteoglicano fibromodulim. Dois componentes apresentaram-se reativos com o soro anti-fibromodulim, podendo representar isoformas deste pequeno PG que ocorrem igualmente em todas as regiões. Sua migração em SDS-PAGE em condições redutoras é diferente da migração em condições não redutoras, quando migra por volta de 67 kDa. Este comportamento se deve provavelmente a mudanças na conformação da molécula, resultante do rompimento de pontes S-S na presença de 2-Me.

Este pequeno PG foi primeiramente isolado de cartilagem articular (HEINEGÅRD *et alii*, 1986), mas também está presente em muitos outros tecidos conjuntivos. Em sclera e tendões foram encontradas grandes quantidades desta proteína (0.1% do peso úmido do tecido) (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989). Sua provável função como reguladora da fibrilogênese do colágeno (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989) justifica sua presença no TFDP de rato, tanto nas regiões que sofrem forças de tensão quanto naquela que além das forças de tensão, supostamente está sujeita à forças de compressão.

Uma outra proteína, de natureza polidispersa, com Mr entre 67 kDa e 115 kDa está presente nas três regiões. Existe uma grande semelhança no comportamento eletroforético desta proteína com aquele exibido pelo pequeno PG decorim, que também é polidisperso e migra na mesma faixa de peso molecular. O decorim foi detectado em vários tecidos conjuntivos (HEINEGÅRD *et alii*, 1985), e também é capaz de inibir a fibrilogênese do colágeno *in vitro* (VOGEL *et alii*, 1984). Na verdade, foi demonstrado através de experimentos *in vitro*, que o decorim não impede a formação de fibrilas mas sim inibe a associação lateral e o espessamento, mantendo um diâmetro relativamente reduzido (VOGEL & TROTTER, 1987).

Testes de intumescimento tem sido aplicados a diferentes tecidos conjuntivos com o propósito de avaliar as propriedades materiais inerentes, e para comparar tecidos patológicos e tecidos normais (GRODZINSKY, 1983; MYERS *et alii*, 1983; apud KOOB & VOGEL, 1987a). O comportamento das três regiões do TFDP foi semelhante ao ocorrido com a região proximal do tendão de boi (VOGEL & KOOB, 1987), ou seja, em água destilada houve encolhimento das regiões, enquanto em ácido acético ocorreu o intumescimento das mesmas.

Segundo KOOB & VOGEL (1987a) e KOOB (1989), as propriedades de intumescimento em tendão flexor bovino estão diretamente relacionadas ao conteúdo de GAGs. Tendões que estão predominantemente sob forças de tensão apresentam pouca quantidade de PGs. A região distal do tendão flexor bovino, que está sujeita à forças de compressão, contém de 2 a 10 vezes mais GAGs que a região proximal (KOOB & VOGEL, 1987a). Esses PGs da região distal estão concentrados na camada superficial distal que recebe diretamente forças de compressão e fricção (KOOB & VOGEL, 1987a). Esses autores concluíram que a fibrocartilagem de tendão bovino apresenta propriedades de intumescimento semelhante à encontrada para a cartilagem articular, devido ao intumescimento considerável em água destilada resultante das cargas negativas dos GAGs neste tecido.

Como comentado anteriormente, esses tecidos fibrosos que estão sujeitos à forças de compressão parecem adaptar-se a essas forças pelo acúmulo de PGs nos sítios que recebem forças de compressão (KOOB & VOGEL, 1987a; KOOB, 1989).

Em ratos, o TFDP apresentou diferenças consideráveis comparando a região proximal com as regiões intermediária e distal, após o equilíbrio em água. Estas duas últimas tiveram um encolhimento maior em água do que a região proximal, o que não era esperado, especialmente considerando a maior presença de GAG nas regiões intermediária e distal, e

também o resultado da eletroforese em gel de agarose, onde é mostrada a presença marcante de CS e DS na região intermediária. Esta aparente contradição pode resultar da própria organização da MEC das regiões deste tendão, principalmente da região intermediária, fazendo com que esta região assuma um comportamento de um tecido conjuntivo dominado por feixes de fibrilas de colágeno, apesar da presença de GAGs. Com o equilíbrio em ácido acético as diferenças foram menos expressivas, a região proximal intumescceu menos, confirmando o dado obtido com o menor encolhimento em água.

A partir dos diferentes resultados obtidos para cada região do TFDP podemos supor que estas possuem estrutura e composição diferentes. Como a região proximal é a que imediatamente segue ao músculo podemos supor que esta região do tendão pode estar sujeita a forças assimétricas, visto que as fibras musculares são ativadas em tempos diferentes dependendo do movimento requerido. Com relação a região distal, poderíamos supor que esta representa uma região de transição entre regiões que recebem apenas forças de tensão e aquelas que recebem forças de tensão e de compressão juntas, devido a posição anatômica e conteúdo de GAGs. Entretanto, análises morfológicas e análises bioquímicas mais aprofundadas seriam necessárias para esta afirmação. Como comentado anteriormente, provavelmente a região intermediária está sujeita a diferentes forças biomecânicas e seria esperado que desenvolvesse uma estrutura semelhante a uma fibrocartilagem.

3. Tendão do Músculo flexor digital superficial

O TFDS da mesma forma que o TFDP, pode ser considerado um tendão "wrap around", e também foi dividido em partes considerando as regiões que supostamente sofrem forças de tensão e de tensão e compressão.

Enquanto no TFDP a região intermediária não apresenta diferenças com relação as regiões proximal e distal, no TFDS a região intermediária mostra diferenças consideráveis em nível macroscópico. Nesta região, o tendão contorna uma articulação sob o calcâneo e embainha-se, formando uma capa sobre este osso.

Observações desta região intermediária de ratos de 6 meses em corte de 7 μm , corados com azul de toluidina pH 4,0 mostraram que a mesma apresenta regiões com aspectos de uma fibrocartilagem, com células arredondadas e matriz metacromática (CARVALHO, 1995-comunicação pessoal). Em ratos de 3 meses foi observada que esta região exibia uma pequena metacromasia quando corada com azul de toluidina (dados não apresentados). Embora esperássemos detectar CS nesta região, acreditamos que sua expressão foi muito pequena para ser evidenciado em gel de agarose. A presença de DS foi marcante, e pelos resultados obtidos em SDS-PAGE das frações de DEAE, há forte indicações de se tratar de decorim, pela própria característica da banda entre 67 kDa e 115 kDa.

Com relação a quantidade de GAGs, a região intermediária apresentou aproximadamente 3,8 vezes mais GAGs do que a região proximal e 1,8 vezes mais do que a região distal. A maior quantidade de GAGs na região intermediária pode estar relacionada com a capacidade desta região em resistir às forças de compressão e fricção adicionais às forças de tensão.

A partir dos resultados obtidos com a dosagem de proteínas podemos concluir que nas três regiões a quantidade de proteínas não colagênicas é praticamente a mesma. Entretanto, comparando esses resultados com o teste de solubilização do colágeno, podemos deduzir que a proporção deste nas regiões proximal e distal onde ocorrem predominantemente forças de tensão, é maior do que na região intermediária.

Nas análises eletroforéticas poucas diferenças são observadas entre as três regiões. Proteínas com Mr entre 94 kDa e 232 kDa eluem nas primeiras frações logo após o início do gradiente, mostrando que possuem poucas cargas, pois são removidas da resina de DEAE-celulose com baixa força iônica. Nas regiões proximal e intermediária essas proteínas são mais evidentes. O mesmo ocorre com proteínas de baixo peso molecular, com Mr abaixo de 45 kDa.

Através do experimento imunológico pudemos confirmar que o componente de 59 kDa era fibromodulim, como no TFDP. Este pequeno proteoglicano está presente nas três regiões. A função deste pequeno PG em todas as regiões do TFDS deve ser a regulação da fibrilogênese do colágeno (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989), da mesma maneira que ocorre para o TFDP, já que este pequeno PG se expressou de maneira semelhante nos dois tendões.

Proteína polidispersa com Mr entre 67 kDa e 115 kDa, provavelmente decorim, está presente nas três regiões. A presença de decorim pode ser relacionada ao controle do diâmetro das fibrilas de colágeno, uma vez que estas moléculas são capazes de ligar às fibrilas de colágeno e regular a espessura das fibrilas formadas *in vitro* (VOGEL *et alii*, 1984).

O comportamento em água destilada, das regiões proximal e distal do TFDS no teste de intumescimento foi mais expressivo do que aquele apresentado pelo TFDP. Essas duas regiões (proximal e distal do TFDS) encolheram em água destilada bem mais do que a região intermediária. Já em ácido acético, as regiões proximal e distal apresentaram um intumescimento visivelmente maior ao apresentado pela região intermediária. Comparando esses resultados com o resultado obtido com a dosagem de GAGs sulfatados, podemos observar que a região intermediária, que apresentou a maior quantidade de GAGs por miligrama de tendão foi a que menos encolheu em água e menos intumescceu em ácido

acético, o que era esperado. O comportamento deste tendão no teste de intumescimento foi semelhante aquele exibido pelo tendão de boi quando regiões com diferentes propriedades biomecânicas foram estudadas (KOOB & VOGEL, 1987A; KOOB, 1989). Este comportamento é típico de uma matriz colagênica fibrosa.

Com relação aos resultados analisados para as regiões deste tendão podemos supor que as regiões proximal, intermediária e distal diferem entre si quanto a composição e estrutura como no TFDP.

4. Tendão calcanear

O TC ou tendão de Aquiles origina-se no músculo sóleo e insere-se no calcâneo. Neste estudo, o TC foi dividido em duas regiões. A região proximal que está sob forças de tensão e a região distal que se insere no calcâneo e está sob forças de tensão e de compressão.

Como comentado anteriormente, as fibrocartilagens são encontradas nas fixações de tendões e ligamentos aos ossos, fazendo com que as propriedades mecânicas sejam transferidas gradualmente entre eles (WOO *et alii*, 1988, apud RUFAl *et alii*, 1992), e em tendões que passam sob uma extremidade óssea numa articulação, resistindo à compressão e fornecendo uma superfície lisa para o deslizamento (VOGEL & KOOB, 1989).

RUFAl e colaboradores (1992) descreveram distintas regiões que sofrem forças de compressão em TC de rato e que desenvolvem fibrocartilagens. Uma delas localiza-se na zona de inserção do tendão no calcâneo, uma outra que está sob o calcâneo, recebendo diretamente as forças de compressão provenientes desse osso, e a terceira, localizada na superfície óssea do calcâneo. A fibrocartilagem localizada onde o tendão está sob o calcâneo

desenvolve-se após o nascimento. Por volta de 4 semanas a metacromasia da fibrocartilagem aumenta, e em ratos mais velhos foi bem acentuada. A composição da MEC desta região mudou durante o desenvolvimento e a idade (RUFAl *et alii*, 1992).

Cortes histológicos de TC de ratos com 3 meses de idade (dados não apresentados) corados com azul de toluidina pH 4,0 da região distal sujeita à forças de compressão, e que compreende a região de inserção do tendão no calcâneo e a região que está sob o calcâneo, descritas por RUFAl e colaboradores (1992), mostrou intensa metacromasia. Já em ratos mais velhos essa região foi bem mais desenvolvida e metacromática (Carvalho, 1995-comunicação pessoal). Nossos resultados indicaram que realmente nesta região há um aumento na quantidade de GAG, a exemplo do que ocorre em tendão de boi (VOGEL *et alii*, 1994) e tendão de rã (CARVALHO & VIDAL, 1994) que também experimentam forças de compressão. A quantidade de GAGs sulfatados na região distal foi aproximadamente 3 vezes maior que na região proximal, confirmando as observações citadas anteriormente.

Nas eletroforeses em gel de agarose, na região distal além de DS também estava presente CS, já na região proximal apenas DS. A presença de CS na região distal se deve muito provavelmente à presença de grandes PGs. Esta seria uma clara evidência de adaptação do tecido a uma situação em que o mesmo sofre forças de compressão. Os dados bioquímicos vem confirmar resultados já conhecidos para este tendão (RUFAl *et alii*, 1992) e observações que fizemos recentemente no laboratório. A presença de DS provavelmente se deve ao decorim que foi evidenciado em gel de poliacrilamida.

Com relação a quantidade de proteínas, foi observado que a região proximal possui uma quantidade ligeiramente maior de PNC do que a região distal, já com relação à solubilização do colágeno a proporção deste em relação às PNC nas duas regiões foi a mesma, o que indica um predomínio da porção fibrosa nas duas regiões deste tendão

Fibromodulim (como confirmado imunoquimicamente) também estava presente igualmente nas duas regiões, tanto em condições redutoras quanto em não redutoras, como no TFDP e no TFDS. O componente que provavelmente corresponde ao decorim é pouco evidente em condições redutoras na região distal, enquanto na região proximal ele está presente em ambas condições. A presença de fibromodulim e decorim em tecido conjuntivo fibroso faz-se necessária especialmente dada a sua importância na regulação da fibrilogênese do colágeno (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989; OLDBERG *et alii*, 1989).

Com relação aos testes de intumescimento, não tivemos o resultado esperado para a região distal quando esta foi equilibrada em água destilada. Esta região que tem alguns sítios característicos de fibrocartilagem encolheu mais do que a região proximal. O aumento em GAG observado deve ser insuficiente para atribuir a este tecido as propriedades observadas para os tendões de boi (KOOB & VOGEL, 1987; KOOB, 1989). Já em ácido acético o maior intumescimento ocorrendo na região proximal está de acordo com um maior domínio de estruturas colagênicas esperadas para aquela região.

Apesar da região distal possuir alto conteúdo de GAGs sulfatados, apresentar CS e exibir estruturas diferenciadas em fibrocartilagem, o comportamento desta no teste de intumescimento não coincidiu com esperado. Este resultado é devido a uma distribuição não homogênea de GAGs dentro do tendão, já que estes estão localizados em duas áreas específicas, ou seja, no local da inserção do tendão no osso e onde o tendão está sob o calcâneo (RUFAL *et alii*, 1992). Como essas duas áreas compreendem uma pequena porção do tendão, o comportamento da região distal no teste de intumescimento foi aparentemente dominado pelas porção fibrosa. Além do mais, as amostras utilizadas para este teste não foram divididas em sítios específicos, enquanto o tendão de boi (KOOB & VOGEL, 1987; KOOB, 1989) foi separado em pequenas porções dentro de uma região, denominadas superficial, onde havia o domínio de PGs, mediana, onde a quantidade de PGs era menor, e

profunda, que era totalmente fibrosa. Com isto, as propriedades de intumescimento de cada região foram determinadas pela composição da MEC de cada porção dentro de cada região.

Com relação a região proximal, podemos afirmar que esta possui características semelhantes quanto a estrutura e composição das regiões proximais do TFDP e do TFDS.

CONCLUSÕES

1. O GAG DS predominante em todas as regiões dos tendões TFDP, TFDS e TC foi DS, sendo que nas regiões que supostamente estão sob forças de compressão do TFDP e do TC foi também detectado o GAG CS.
2. O pequeno proteoglicano fibromodulim foi encontrado em todas as regiões dos tendões TFDP, TFDS e TC.
3. O pequeno proteoglicano fibromodulim migra mais lentamente em SDS-PAGE, quando era previamente incubado sem 2-Me. Além disto parece apresentar-se como duas isoformas, com diferentes massas moleculares relativas e reconhecidas pelo mesmo soro anti-fibromodulim.
4. O componente polidisperso, provavelmente decorim, com Mr na faixa entre 67 e 115 kDa, foi encontrado em todas as regiões dos TFDP, TFDS e TC.
5. As regiões intermediária dos TFDP e TFDS e a região distal do TC apresentam características semelhantes quanto ao pequeno intumescimento em ácido acético, à pequena solubilidade do colágeno e ao conteúdo aumentado em GAG. Contribui para estas semelhanças a presença de CS no TFDP e TC, o que, surpreendentemente não aconteceu com o TFDS.
6. As regiões proximais, que nos três tendões consistem na região que imediatamente segue ao músculo e que, aparentemente, estão sujeitas apenas a forças de tensão, apresentaram diferenças quanto aos diferentes parâmetros analisados, demonstrando a diversidade estrutural e composicional dos três tendões.
7. As regiões distais dos TFDS e TFDP apresentam características semelhantes quanto ao intumescimento, retração após tratamento com água, grande solubilidade de componentes colagênicos e idêntico conteúdo de GAGs, representados exclusivamente por DS. Aparentemente estas regiões correspondem a um outro tipo de especialização de tendões.

8. As análises cromatográficas e eletroforéticas isoladamente não forneceram parâmetros suficientes para a caracterização das diferentes regiões destes tendões, porém revelaram diferenças muito sutis no conteúdo de pequenos proteoglicanos e proteínas não colagênicas entre eles.

9. a análise dos grandes proteoglicanos e mesmo uma investigação sobre o pequeno proteoglicano biglicam seria de grande auxílio na compreensão da fisiologia destes tendões, assim como também se faz necessário estender a análise histológica.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON J. D. In: **Molecular Biology of the Cell**. Second edition, Garland Publishing, New York & London, 1994.
- ALEXANDER, R. McN. & DIMERY, N. J. The significance of sesamoids and retro-articular processes for the mechanics of joints. **J. ZOOL, (A)** v. 205, p. 357-371, 1985.
- BLUM, B., BEIER, R. & GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, H. F. **Estrutura e composição de um tendão sujeito a forças de compressão**. (Doutorado) - Instituto de Biologia, UNICAMP, 1993.
- CARVALHO, H. F. Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. **J. Theor. Biol.**, v.172, p. 293-297, 1995.
- CARVALHO, H. F. & VIDAL, B. C. Structure and histochemistry of a pressure-bearing tendon of the frog. **Annals of Anatomy**, v. 176, p. 161-170, 1994.
- CURWIN, S. L., ROY, R. R. & VAILAS, A. C. Regional and age variations in growing tendon. **J. of Morphol.**, v. 221, p. 309-320, 1994.
- DIETRICH, C. P. & DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.**, v. 70, p. 645-647, 1976.
- DIETRICH, C. P. MCDUFFIE, N. M. & SAMPAIO, L. O. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **J. Chromat.**, v. 130, 299-304, 1977.

- ELLIOT, D. H. Structure and function of mammalian tendons. **Biol. Rev.**, v. 40, p. 392-421, 1965.
- EVANKO, S. P. & VOGEL, K. G. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. **Matrix**, v. 10, p. 420-436, 1990.
- FARNDALE, R. W., BUTTLE, D. J. & BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 883, p. 173-177, 1986.
- GALLAGHER, J.T. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 1, p. 1201-1218, 1989.
- GILLARD, G. C, REILLY, H.C., BELL-BOOTH, P. G. & FLINT, M. H. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. **Connect. Tissue Res.**, v. 7, p. 37-46, 1979.
- GRODZINSKY, A. J. Electrochemical and physicochemical properties of connective tissue. **CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 133-199, 1983.
- HASCALL, V. C. & HASCALL, G. K. Proteoglycans: Structure and functions. In: GINSBURG, V., ROBINS, P. (eds) **Biology of Carbohydrates**, v. 1, Wiley, N.Y., p. 1-49, 1981.
- HASCALL, V. C. & HASCALL, G. K. Proteoglycans. In: HAY, E. D. (ed) **Cell Biology of Extracellular Matrix**. Plenum Press, N.Y. p.39-60, 1983.
- HEDBOM, E. & HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59 kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 6869-6905, 1989.
- HEDBOM, E., ANTONSSON, P., HJERPE, A., AESCHLIMANN, D., PAULSSON M., PIMENTEL, E.R., SOMMARIN, Y., WENDEL, M., OLDBERG, A. & HEINEGÅRD, D.. Cartilage matrix protein. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 9, p. 6132-6, 1992.

- HEDLUND H., MENGARELLI-WIDHOLM, S., HEINEGÅRD, D., REINHOLT, F. P. & SVENSSON, O. Fibromodulin distribution and association with collagen. **Matrix Biol.**, v. 14, p. 227-232, 1994.
- HEINEGÅRD, D., LARSSON, T., SOMMARIN, Y., FRANZEN, A., PAULSSON, M. & HEDBOM, E. Two novel proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 13866-13872, 1986.
- HEINEGÅRD, D. & OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix non-collagenous macromolecules. **FASEB J.**, v. 3, p. 2042-51, 1989
- HEINEGÅRD, D. & PIMENTEL, E. R. Cartilage matrix proteins. In: KNETTNER, A. **Articular Cartilage and Osteoarthritis**. Knettner. (eds) Raven Press Ltda. New York, 1992.
- HEINEGÅRD, D.; WIESLANDER, J.; SHEEHAN, J.; PAULSSON, M. & SOMMARIN, Y. Separation and characterization of two populations of aggregating proteoglycans from cartilage. **Biochem. J.**, v. 225, p. 95-106, 1985.
- JONES, A. J. & BEE, J. A. Age- and position-related heterogeneity of equine tendon extracellular matrix. **Res. Vet. Sci.**, v. 48, p. 357-364, 1990
- JOZSA, L., KANNUS, P., BALINT, J. B. & REFFY, A.. Three-Dimensional Ultrastructure of Human Tendon. **Acta Anat.**, v. 142, p. 306-312, 1991.
- KLAUS, W. & OSBORN, N. The reability of molecular with determinations by dodecil sulfate-polyacrilamide gel electroforesis **J. Biol. Chem.**, v. 244 n. 16, p. 4406-12, 1969.
- KOOB, T. J. & VOGEL, K. G. Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. **Biochem. J.**, v. 246, p. 589-98, 1987.

- KOOB, T. J. & VOGEL, K. G. Site-related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor bovine. **J. Orthop. Res.**, v. 5 , p. 414-424, 1987a.
- KOOB, T. J. & VOGEL, K.G. Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. **Biochem. J.**, v.246, p.589-598, 1987b.
- KOOB, T. J. Effects of chondroitinase-ABC on proteoglycans and swelling properties of fibrocartilage in bovine flexor tendon. **J. Orthop. Res.**, v. 7 , p. 219-227, 1989.
- KOOB, T. J., CLARK, P. G., HERNANDEZ, D.J., THURMOND, F.A. & VOGEL K. G. Compression loading in vitro regulates proteoglycan synthesis by tendon fibrocartilage. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 289, n. 1, p. 303-12, 1992.
- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage Ty. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.
- LARSSON, T., SOMMARIN, Y., PAULSSON, M., ANTONSSON, P. HEDBOM, E. WENDEL, M., & HEINEGARD, D. Cartilage matrix proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 20428-20433, 1991.
- LIN, C. Q. & BISSEL, M. J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **FASEB J.**, v. 7, p. 737-743, 1993.
- LISENMAYER, T. F. Collagen. In: HAY, E. D. (ed) **Cell biology of Extracellular Matrix**. Plenum Press, N.Y.,1983.
- MAYNE, R. & BREWTON, R. G. New members of the collagen superfamily. **Curr Opin Cell Biol**, v. 5, p. 883-890, 1993.
- MERRILEES, M. J. & FLINT, M. H. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. **Am. J Anat.**, v. 157, p. 87-106, 1980.
- MICHELACCI, M. J. & HORTON, D. S. P. Q. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 92 B, n. 4, p. 651-58, 1989.

- MYERS, E. R., ARMSTRONG, C. G., MOW, V. C. Swelling pressure and collagen tension. In: HUKINS, DWL (eds) **The Connective Tissue Matrix**, MacMillan, London, p. 161-186, 1983.
- NISBIT, N. W. Anatomy of the calcaneal tendon of the rabbit. **J. Bone Jt. Surg.**, v. 42 B, p. 360-366, 1960.
- OKUDA, Y., GORSKI, K. N. & AMADIO, P. C. Biomechanical, histological and biomechanical analyses of canine tendon. **J. Orthop. Res.**, v. 5, p. 60-68, 1987a.
- OKUDA, Y., GORSKI, J. P. & AMADIO, P. C. Effect of postnatal age on the ultrastructure of six anatomical areas of canine flexor digitorum profundus tendon. **J. Orthop. Res.**, v. 5, p. 231-241, 1987b.
- OLDBERG, A., ANTONSSON, P., LINDBLOM, K. & HEINEGÅRD, D. A collagen-binding 59 kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). **EMBO J.**, v. 8, n. 9, p. 2601-2604, 1989.
- RUDOLF, H. & STROMBERG, M. W. Myology. In — (eds) **Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat**. The Willians & Wilkins, Baltimore, 1976
- RUFAL, A., BENJAMIN, M. & RALPHS, J. R. Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. **Anat. Embryol.**, v. 186, p. 611-618, 1992.
- SCOTT, J. E. & ORFORD, C. R. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. **Biochem. J.**, v. 197, p. 213-216, 1981.
- VAN DER REST, M., & GARRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEB J.**, v. 5, p. 2814-2823, 1991.

- VIDAL, B. C. Análise e quantificação básica para produtos colagênicos. **Aerosol & Cosméticos**, v. 45, p. 11-14, 1976.
- VIDAL, B. C. & MELLO, M. L. S. Proteoglycans arrangement in tendon collagen bundles. **Cell Molec., Biol.**, v. 30, p. 195-204, 1984.
- VIDAL, B.C. A matriz extracelular. In: VIDAL, B. C. & MELLO, M. L. S. (eds) **Biologia Celular**. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro. São Paulo, p. 273-303, 1987.
- VIDAL, B. C. & CARVALHO, H. F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**, v. 10, p.48-57, 1990.
- VIDAL, B. C., Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition- adhesion events. **Revista UNICAMP**, v. IV, n. 1, p. 11-14, 1993.
- VOGEL, K. G., PAULSSON, M. & HEINEGÅRD, D. Specific inhibition of type I and II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. **Biochem. J.**, v. 223, p. 587-597, 1984.
- VOGEL, K. G. & HEINEGÅRD, D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 16, p. 9298-9306, 1985.
- VOGEL, K. G., KELLER, E. J., LENHOFF, R. J., CAMPBELL, k.. & KOOB, T. J. Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. **Eur J. Cell Biol.**, v. 41, p. 102-112, 1986.
- VOGEL, K. G. & TROTTER, J. A. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed *in vitro*. **Collagen Rel. Res.**, v. 7, p. 105-114, 1987.
- VOGEL, K. G. & KOOB, T. J. Structural Specialization in Tendons under Compression. **Int. Rev. Cytol.**, v. 115, p. 267-293, 1989

- VOGEL, K. G., ÖRDÖG, A., POGÁNY, G. & OLÁH, J. Proteoglycans in the compressed region of human tibials posterior tendon and ligaments. **J. Orthop. Res.**, v. 11, p. 68-77, 1993.
- WOO, S. MAYNARD, J. BUTLER, D. LYON, R. TORZILLI, P. AKESON, W., COOPER, R. OAKES, B. Ligament, tendon and joint capsule insertions to bone. In: WOO SL-Y, Buckwalter JA (eds) **Injury and Repairs of the Musculoskeletal Soft Tissues**. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Illinois, p.133-166, 1988.
- WOTTON, S. F., DUANCE, V.C. and FRYER, P.R. Type IX collagen: a possible function in articular cartilage. **FEBS LETTERS**, v. 234, n. 1, p. 79-82, 1988.