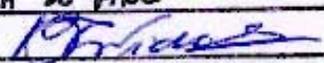


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



FLÁVIA DE PAOLI

**ANÁLISE ESTRUTURAL, MORFOLÓGICA E
FUNCIONAL DO TENDÃO FLEXOR DIGITAL
SUPERFICIAL DE FRANGOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FLÁVIA DE PAOLI

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Co-Orientador: Prof. Dr. Sergio Rocha Piedade

Campinas, 2007

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

P196a	<p>Paoli, Flávia de Análise estrutural, morfológica e funcional de tendão flexor digital superficial de frangos / Flávia de Paoli. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadores: Benedicto de Campos Vidal, Sergio Rocha Piedade. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Colágeno. 2. Glicosaminoglicanos. 3. Proteoglicanos. 4. Biomecânica. I. Vidal, Benedicto de Campos. II. Piedade, Sergio Rocha. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Structural, morphological and functional analysis of superficial digital flexor chicken tendons.

Palavras-chave em inglês: Collagen; Glycosaminoglycans; Proteoglycans; Biomechanics.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Benedicto de Campos Vidal, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Stella Márcia Mattiello Gonçalves Rosa, Tania de Fatima Salvini.

Data da defesa: 23/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

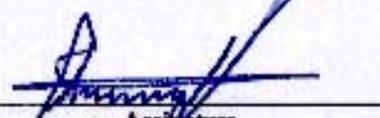
Campinas, 23 de março de 2007.

BANCA EXAMINADORA

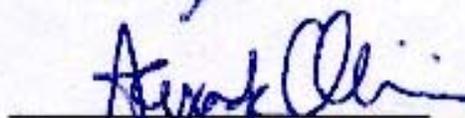
Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal (Orientador)


Assinatura

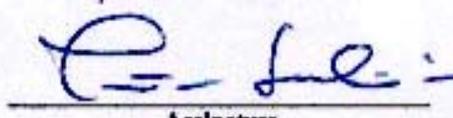
Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel


Assinatura

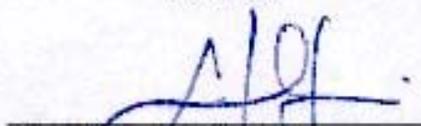
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira


Assinatura

Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini


Assinatura

Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa


Assinatura

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

Assinatura

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Assinatura

**“Pedras no caminho? Guardo todas!
Um dia vou construir um castelo!”**

Fernando Pessoa

**Dedico este trabalho aos meus pais, Severo e Margareth,
e aos meus irmãos, Fabiana e João Marcelo.
De vocês partiu a maior e mais valiosa contribuição para este trabalho: a
compreensão, a paciência e o apoio incondicional.**

**Jair, Maria Helena e em especial, Juliano
que foram minha família durante esses anos.**

Ao meu orientador Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Pelos valiosos ensinamentos da vida.

Esses jamais esquecerei!

*"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha porque cada pessoa é
única e nenhuma substitui a outra.*

*Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só,
porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.*

*Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova
de que as pessoas não se encontram por acaso".*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luíza Silveira Mello pelos valiosos ensinamentos e exemplos de disciplina e dedicação à pesquisa e ensino.

Ao Prof. Dr. Sérgio Rocha Piedade pela amizade, confiança em meu trabalho e pelo auxílio nos testes mecânicos.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pela amizade e maravilhosa convivência, e pela análise prévia deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Oliveira e Profa. Dra. Stela Rosa pelas valiosas sugestões e críticas feitas durante a pré-banca.

Aos Profs. Drs. Ângelo Cortelazzo, Maria Alice Höfling, Nivaldo Parizotto e Tânia Salvini por aceitarem a colaborar com este trabalho e a participar da minha defesa de tese.

À secretária do Programa de Biologia Celular e Estrutural, Líliam, pelo grande auxílio prestado ao longo desses quatro anos, minha gratidão pela imensa paciência.

Aos meus eternos amigos de laboratório, Antonella, Alberto e Marcela pela infinita paciência em me ensinar, muitas vezes por escutar minhas lamentações e pelos grandes

momentos que passamos juntos; Flávia, Leticia (e os gafanhotos!), James e Martha pela maravilhosa convivência e os momentos de descontração.

Aos amigos do Departamento de Biologia Celular, Tati, Gisele, Manuel, Wilson, Taíze, Sheila, Fernanda, Eliane, Silvia, Alexandre e todos aqueles que fizeram destes quatro anos inesquecíveis. Viagens, cinema, almoços... me lembrarei sempre de todos esses momentos!

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio de Paoli, docente do Instituto de Química da UNICAMP, pela permissão para utilização da máquina universal de testes e, em especial, a técnica Simone Staub pela preciosa ajuda durante os ensaios de tensão.

Ao Sr. Marco Antônio Ferreira pela indicação da Granja Aves do Paraíso e pela doação dos tendões utilizados neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e principalmente para o meu crescimento profissional.

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{par}	absorção obtida com o material paralelo ao plano de luz polarizada
A_{per}	absorção obtida com o material perpendicular ao plano de luz polarizada
AT	azul de toluidina
ANOVA	análise da variância
DM	deformação máxima
GAGs	glicosaminoglicanos
M	molaridade
MEC	matriz extracelular
mm	milímetro
MPa	megapascal
N	Newton
NaCl	cloreto de sódio
PGs	proteoglicanos
S	desvio padrão
TM	tensão máxima

CONTEÚDO

RESUMO	12
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO GERAL	18
<i>Composição e Estrutura dos Tendões</i>	19
<i>Propriedades Mecânicas dos Tendões</i>	24
<i>Propriedades Anisotrópicas Ópticas</i>	27
OBJETIVOS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO I	38
<i>Resumo</i>	40
<i>Introdução</i>	41
<i>Material e Métodos</i>	42
<i>Resultados</i>	45
<i>Discussão e Conclusão</i>	46
<i>Referências Bibliográficas</i>	51
<i>Tabelas e Figuras</i>	57
CAPÍTULO II	61
<i>Resumo</i>	63
<i>Introdução</i>	64
<i>Material e Métodos</i>	65
<i>Resultados</i>	68

<i>Discussão e Conclusão</i>	69
<i>Referências Bibliográficas</i>	73
<i>Tabelas e Figuras</i>	78
CONCLUSÕES GERAIS	82

RESUMO

A relação estrutura-função tem sido abordada em diversos estudos de tecidos colagenosos, como o tendão. É conhecido, que dependendo do tipo de força aplicada, uma composição e organização molecular específica, com características morfológicas peculiares podem ser observadas. Tendões comportam-se viscoelasticamente, sendo esta propriedade estudada através de análise biomecânica, na qual está diretamente relacionada com a organização dos componentes teciduais. Com isso, os objetivos do presente trabalho foram descrever a importância dos componentes não-colagênicos na propriedade viscoelástica de tendões e verificar possíveis alterações na organização e no arranjo dos componentes da matriz extracelular nos tendões após os ensaios de tensão. Tendões de frangos foram escolhidos como modelo experimental já que apresentam um comprimento viável para ensaios de tensão, além de possuírem peculiaridades em sua composição e organização molecular. Tendões flexores digitais superficiais foram dissecados e distribuídos em: grupo I (não-tratados), grupo II (tendões tratados com hialuronidase testicular) e grupo III (tendões tratados com papaína). Parâmetros dimensionais como peso, espessura, largura e área seccional transversa foram mensurados. Os tendões foram preservados em solução fisiológica até sua utilização nos ensaios. Após os ensaios, eles foram fixados, incluídos em parafina e encaminhados para análises morfológicas, histoquímicas e microespectrofotométricas. Os ensaios do grupo I mostraram maiores valores de tensão, energia elástica e módulo de elasticidade do que os dos grupos II e III. Ao contrário, valores de deformação foram maiores para o grupo II, indicando que, após o tratamento enzimático, os tendões perderam sua capacidade de resistir a forças tensionais e sugere a participação de componentes não-colagênicos nesta função. Análises histoquímicas confirmaram a remoção dos componentes não-colagênicos nos grupos II e III. Ainda, curvas de absorção espectral foram obtidas em cortes de tendões não submetidos a ensaios

e do grupo I (não-tratado com enzimas, porém estirado) corados com azul de toluidina e ponceau SS. Em cortes de tendões do grupo I corados com azul de toluidina, dois picos de absorção foram observados, enquanto em cortes de tendões não submetidos a ensaios foi observado apenas um pico. Com isso, pode-se considerar que o grupo negativo dos glicosaminoglicanos disponíveis quando o tendão encontrava-se não-tensionado tornaram-se menos disponíveis quando o tendão foi estirado. Cortes de tendões corados com ponceau SS demonstraram um pico de absorção e cortes do grupo I apresentaram altos valores de absorbâncias. A deformação de materiais envolve diversos mecanismos, como o desaparecimento de crimps. Essa alteração morfológica explicaria tanto a não disponibilidade dos grupos negativos de glicosaminoglicanos quanto o alto valor de absorbância detectado em cortes do grupo I corados com ponceau SS. Em conclusão, os componentes dos tendões são estruturas dinâmicas, altamente organizadas e orientadas, que são capazes de se rearranjarem quando tensionados. Mais ainda, esses componentes não-colagênicos são fundamentais para a integridade funcional dos tendões.

ABSTRACT

The structure-function relationship has been shown in several works regarding collagenous tissues, such as tendon. It is known that different loads can alter composition, molecular organization and morphological characteristics. Tendons present viscoelastic behavior and this characteristic is studied by biomechanical analyses and is directly related to tissue component organization. The aim of this work was to describe the importance of noncollagenous components on tendon viscoelasticity by analyzing changes in the organization and arrangement of extracellular matrix constituents and, consequently, changes in tendon morphology after mechanical tests. Chicken tendons were chosen due to their organization and composition; besides presenting a good length for mechanical tests. Superficial digital flexor chicken tendons were dissected and distributed into 3 groups: group I, non-treated; group II, tendons treated with testicular hyaluronidase; and group III, tendons treated with papain. Then, dimensional parameters, such as weight, width, thickness and cross-sectional area, were measured. The tendons were preserved in physiological solution until use in the mechanical tests. During the mechanical tests, they were tensioned and immediately afterwards were fixed and processed for morphological and histochemical analyses. The mechanical test results of groups II and III showed decreased ultimate tensile strength, elastic energy and elasticity modulus values, when compared with group I. In contrast, the ultimate strain values were highest for group II, indicating that after enzymatic treatment the tendons lost their capacity to resist tensile forces. Groups II and III presented different deformations in comparison with group I. Histochemical analysis confirmed the removal of the noncollagenous components in groups II and III. Spectral absorption curves were obtained for the non-stretched and group I tendon sections (non-treated to enzyme, but stretched) stained with toluidine blue and

Ponceau SS. In group I sections stained with toluidine blue, two absorption peaks was observed, while in the non-stretched sections only one absorption peak was observed. Negative groups of GAGs available in non-stretched tendon sections most likely became unavailable in stretched tendons sections. Sections stained with Ponceau SS showed one absorption peak and group I sections showed the highest absorbancy values. Deformation of tendinous materials could involve a number of mechanisms, like collagen uncrimping. Collagen uncrimping could be involved in the unavailable of negative GAG groups and the highest absorbancy values in group I sections stained with Ponceau SS. In conclusion, tendon component constituents are dynamic, highly organized and oriented structures capable of rearranging during stretching. Moreover, the noncollagenous components are fundamental to tendon functions.

INTRODUÇÃO GERAL

Composição e Estrutura dos Tendões

Tendões são estruturas anatomicamente interpostas entre músculos e ossos, que transmitem a força gerada através da contração muscular para o osso, possibilitando a movimentação articular. Eles respondem a diferentes forças mecânicas através de mudanças em seu metabolismo e conseqüentemente em suas propriedades estruturais e morfológicas (Vogel e Koob, 1989; Benjamin e Ralphs, 1998; Kjaer, 2004; Wang, 2006).

Externamente, os tendões são envolvidos por uma camada delgada de tecido conjuntivo denominada epitendão. Além desse, existe uma outra bainha que se aprofunda entre os feixes de fibrilas, o endotendão. Algumas vezes o epitendão, pode ser envolvido pelo paratendão, onde esse é dividido em duas camadas: a visceral e a parietal. Entre elas existe um espaço conhecido como mesotendão o qual é preenchido por um líquido semelhante ao sinovial, que lubrifica e auxilia no deslizamento do tendão sobre o osso (Merrilees e Flint, 1980; Hayem, 2001; Kjaer, 2004).

Quando saudáveis, os tendões são branco em cor e viscoelástico em textura, apresentando uma extensa matriz extracelular (MEC). A MEC de tendões é complexa, sendo constituída por componentes fibrilares, como as fibras colágenas e elásticas; e não fibrilares, representados pelos proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas não colagênicas. Essas moléculas interagem entre si através de ligações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, permitindo uma organização estrutural e funcional da matriz (Silver et al, 2002; Kjaer, 2004). As interações entre os componentes da MEC estão de acordo com as leis da química supramolecular, permitindo assim considerar os tendões como superestruturas supramoleculares (Lehn, 2002).

Componente fibrilar mais abundante da MEC, o colágeno é encontrado em várias estruturas como, tendão, pele, ligamentos e ossos (Ottani et al, 2002). Diversos tipos de colágeno já foram descritos e apresentam diferentes arranjos, permitindo agrupá-los de acordo com os aspectos estruturais. Uma molécula de colágeno é formada por três cadeias polipeptídicas denominadas cadeias α , ricas em prolina e glicina, que formam uma tripla hélice. Cada cadeia helicoidal é composta por uma seqüência repetitiva de Gly – X-Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido, mas freqüentemente X é prolina e Y é hidroxiprolina. A hidroxilação dos resíduos de prolina e de lisina é um evento fundamental para a formação das moléculas de colágeno e para o desempenho de suas funções. A hidroxilação da prolina, por exemplo, é necessária para estabilidade da estrutura helicoidal da molécula. Já a hidroxilação da lisina é fundamental no processo de glicosilação e conseqüentemente na formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares. Essas ligações contribuem para aumentar a capacidade das fibrilas de colágeno de resistirem às forças de tensão (Van Der Rest e Garrone, 1991; Alberts et al, 2002 - revisão). Em tendões, o colágeno tipo I é o componente mais abundante da MEC, mas outros tipos de colágenos também já foram descritos, como os tipos III e V (Nimni e Harkness, 1988; Kjaer, 2004).

Em seu estado de repouso, as fibras e fibrilas de colágeno encontradas em tendões mostram um padrão ondulado, que observadas em microscopia de polarização, demonstram bandas claras e escuras denominadas crimps (ou “wave like structures – WLS”). Os crimps foram primeiramente identificados por Diamant e co-autores (1972) através de microscopia de polarização em tendões da cauda do rato. Esses achados foram confirmados por Gathercole e colaboradores (1975) e Evans e Barbanel (1975, 1978), que descreveram as mesmas ondulações observadas anteriormente, porém analisadas em microscopia eletrônica. Este aspecto morfológico, diversas vezes descrito previamente, pode ser

observado em uma variedade de tecidos conjuntivos e reflete a organização das fibrilas, fibras e feixes de colágeno no interior do tecido. No caso dos tendões, possui a função de absorver a força de tensão inicial que é aplicada, permitindo um pequeno alongamento longitudinal de fibrilas de colágeno e desaparecendo quando o tendão é estirado por 2% do seu comprimento inicial (Gathercole e Keller, 1974; Järvinen et al, 2004). Porém, quando esta força de estiramento é cessada, o tendão retorna ao seu comprimento inicial (Fratzl et al, 1997; Józsa e Kannus, 1997; Maganaris et al, 2004). Além de exercer uma função mecânica do tecido, as fibrilas e fibras de colágeno também estão envolvidas direta ou indiretamente em processos de adesão e diferenciação celular e como antígeno nos processos imunológicos (Linsenmayer, 1985).

A MEC do tendão também é formada por um sistema elástico. A elastina é o principal componente de uma fibra elástica madura e sua composição é rica em glicina, prolina, lisina e aminoácidos hidrofóbicos. A presença de um sistema elástico permite ao tendão sofrer uma grande distensão antes que as fibrilas de colágeno possam exercer qualquer efeito útil de resistência à tensão (Józsa e Kannus, 1997; Alberts et al, 2002 - revisão).

Os PGs são constituídos basicamente por uma proteína central na qual estão ligados covalentemente uma ou mais cadeias de GAGs. Dois grupos de PGs são encontrados na MEC dos tendões: os pequenos PGs, os quais são membros dos PGs ricos em leucina, representados pelo decorim, biglicam e fibromodulim; e os grandes PGs, onde se destacam o agrecam e versicam (Yoon e Halper, 2005). Os GAGs são cadeias polissacarídeas não ramificadas, compostas de unidades repetidas de dissacarídeos, que geralmente são sulfatadas e/ou carboxiladas. As diferenças observadas tanto na proteína central quanto nas classes de GAGs ligados permitem que os PGs desempenhem importantes funções no

organismo, como por exemplo a participação no processo de fibrilogênese do colágeno (Scott et al. 1981; Scott, 1982; Yoon e Halper, 2005).

A composição e a organização de PGs em tendões podem variar com os diferentes tipos de cargas exercidas, resultando em alterações na estrutura e organização das fibrilas de colágeno, desenvolvimento de fibrocartilagem e adaptação a novas condições biomecânicas. Dentre outras funções dos PGs podemos citar um importante papel na modulação do crescimento e maturação de tecidos especializados, influência na transparência corneal, modulação nas atividades de fatores de crescimento, além de influenciar o crescimento neuronal (Scott et al. 1981; Yoon e Halper, 2005).

Além das moléculas de colágeno e PGs, existem ainda na MEC as proteínas não colagênicas. Essas proteínas são multifuncionais devido à presença de domínios estruturais dentro da mesma molécula e estão envolvidas em fenômenos que contribuem para a interação célula-matriz permitindo uma sinalização bidirecional. Um exemplo de molécula que realiza essa interação é a tenascina. A família das tenascinas contribui na estruturação da MEC e exerce uma grande influência sobre as células. Em diversos casos, as células produzem apenas um tipo de tenascina, como nos tendões, onde a produção dessa glicoproteína (tenascina C) é regulada não apenas por fatores intrínsecos, mas também através de estresses biomecânicos (Chiquet-Ehrismann e Tucker, 2004). A tenascina C liga-se com as integrinas localizadas na membrana dos tenócitos transmitindo as modificações que ocorrem na MEC para as células, num processo denominado de mecanotransdução. Este é um importante mecanismo no qual o estresse mecânico age sobre as células, iniciando processos de sinalizações intracelulares, promovendo, em alguns casos o crescimento celular, alterando a arquitetura e a morfologia de diversos tipos celulares, além de influenciar em respostas metabólicas (Kjaer, 2004; Chiquet-Ehrismann e Tucker, 2004).

Além da tenascina, ainda podemos citar os feixes de colágeno que transformam a energia mecânica em sinais que estimulam os tenócitos a realizarem uma reorganização molecular na MEC (Vilarta e Vidal, 1989).

O componente celular dos tendões, representado pelos tenoblastos e tenócitos, compreendem 90% a 95% dos elementos celulares do tendão. Os outros 5%-10% são representados por condrócitos localizados em regiões de compressão e inserção dos tendões em ossos e células que formam o epitendão e o endotendão. Em condições patológicas, muitos outros tipos celulares podem ser observados em tendões, como por exemplo macrófagos e linfócitos (Hayem, 2001; Kjaer, 2004; Wang, 2006).

Em tendões de animais recém-natos, a quantidade de células é maior do que a quantidade de MEC. Elas possuem diferentes formas e tamanhos, algumas são alongadas, outras arredondadas e outras são até mesmo poligonais (Józsa e Kannus, 1997; Wang, 2006). Em tendões adultos, elas estão organizadas em fileiras longitudinais entre os feixes de colágeno e são responsáveis pela produção inicial de MEC e posteriormente sua manutenção, de acordo com o tipo de carga exercida sobre a estrutura. Eles estão em íntima associação com células vizinhas e com fibras de colágeno, além de outros componentes da MEC como a tenascina (Ralphs et al, 2002; Kjaer, 2004).

Diversos trabalhos têm utilizado tendões de frangos como modelo animal experimental, já que os mesmos apresentam peculiaridades na organização de seus componentes, refletindo em sua estrutura e funcionalidade. Estudos prévios em nosso laboratório (dados não publicados) demonstraram que estes tendões são estruturas altamente organizadas capazes de resistir a processos de extração ácida. Além disso, tendões de aves são excelentes modelos para estudos de processos de mineralizações e suas conseqüências para a biomecânica do animal (Landis e Silver, 2002; Silver et al., 2003).

Além destes fatos, para este trabalho, tendões de frangos foram escolhidos como modelo experimental por apresentarem um comprimento viável para ensaios de tensão *in vitro*.

O tendão *flexor digitorum superficialis* de frangos se origina no músculo *flexor digitorum superficialis*, passa sobre a articulação *tibiotarsus* (tibiotársica), desce sobre o metatarso e se insere nas falanges distais (Tankred, 1973; Ghetie et al, 1981). Este tendão é submetido a duas forças: (a) compressão em sua porção proximal, através do osso sesamóide do tendão *calcaneus communis* (calcanear) e, (b) tensão, que é proveniente do movimento de flexão realizado nas falanges do animal.

Diversas características já foram descritas sobre os tendões que trafegam sobre uma articulação. Dentre elas estão a morfologia celular (Benjamin e Ralphs, 1998), tipos e organização das fibras de colágenos (Vogel e Koob, 1989), características biomecânicas e bioquímicas (Vogel e Koob, 1989; Benevides et al, 2004) e até mesmo o nível de ploidia dos núcleos dos tenócitos (Paoli e Vidal, 2004). Porém, uma direta relação entre suas propriedades mecânicas e sua organização molecular ainda não foi descrita.

Propriedades Mecânicas dos Tendões

Em 1847, Wertheim foi o primeiro a reportar a força de tensão em tendões, utilizando modelos humanos e caninos (Jozsa e Kannus, 1997). Hoje encontramos numerosos modelos, os quais foram desenvolvidos ao longo do tempo, para caracterizar o comportamento mecânico de tecidos colagenosos e prover uma base uniforme para um exame de funções e respostas mecânicas de tendões. Dentre outras metodologias, a mais utilizada é o ensaio uniaxial de tensão *in vitro*, no qual o tendão é alongado até a ruptura total de suas fibras. Este tendão é preso por forças externas, através de um sistema de garras, enquanto uma força é aplicada. Os testes de ruptura resultam numa curva de força

(N)-deslocamento (mm). Nesta curva, quatro regiões são diferenciadas (Woo et al., 1980; Józsa e Kannus, 1997; Fratzl et al., 1997):

1. Região I ou “toe” – é caracterizada por uma baixa resistência do tendão, isto é, ocorre um grande aumento da deformação, utilizando uma pequena força. No final desta região o deslocamento do tecido chega 1,5% a 2% de seu comprimento inicial e seus padrões de crimp começam a desaparecer;
2. Região II ou “heel” – nesta região as fibrilas e fibras de colágeno tornam-se mais paralelas e perdem a aparência do crimp. A inclinação da curva desta região é freqüentemente referida como a porção elástica do tendão.
3. Região III ou “linear” – o comprimento do tendão nesta região corresponde a uma deformação de até 8% e são encontradas algumas fibrilas e fibras rompidas. Porém, este diagnóstico é apenas confirmado através de análises microscópicas.
4. Região IV ou “plateau” – nesta região observa-se macroscopicamente a ruptura das fibras de colágeno. A ruptura ocorre já que a capacidade do tendão de suportar cargas é perdida. Uma vez que a carga máxima é alcançada, a ruptura ocorre rapidamente.

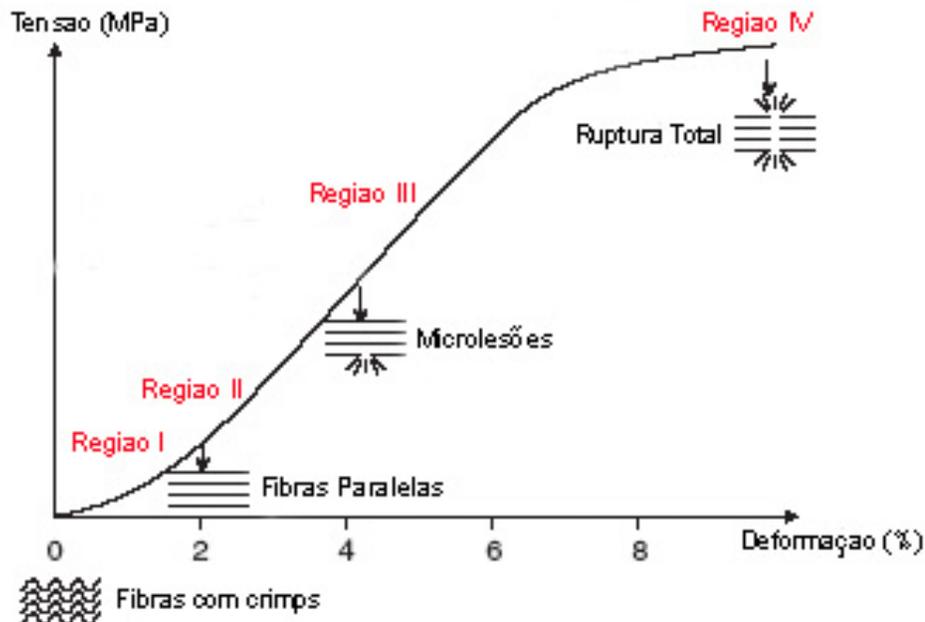


Figura 1: Desenho esquemático da curva de tensão (MPa)-deformação(%), demonstrando as quatro regiões anteriormente citadas. (Adaptado de

Devido às diferenças dimensionais entre os tendões, alguns parâmetros devem ser considerados, já que estão diretamente relacionados com o comportamento da curva. Para isso, devem ser obtidos os valores de área de secção transversal e comprimento inicial do material analisado. Estes parâmetros permitem a conversão da curva inicialmente obtida em uma curva de tensão (MPa)-deformação (%). Esta curva obtida possui um formato similar à curva de força (N)-deslocamento (mm), mas reflete especialmente as propriedades estruturais do tendão (Józsa e Kannus, 1997; Maganaris et al., 2004).

A capacidade de resistir a forças tensionais é atribuída à energia elástica estocada nos tendões. A energia elástica é uma característica mecânica extremamente importante de tecidos colagenosos; cartilagem articular e tendões são exemplos de tecidos que estocam e

transmitem energia durante a deformação mecânica (Freeman e Silver, 2004). Quando o tendão inicia o processo de estiramento esta energia é utilizada, sendo convertida em força e cessa quando o tendão retorna a sua posição inicial (retração). Essa energia é proveniente da orientação, estrutura e quantidade de ligações cruzadas das fibrilas e fibras de colágeno encontradas nos tecidos (Józsa e Kannus, 1997). Porém, processos de mineralizações, envelhecimento e esforço repetitivo são fatores que influenciam diretamente nesta propriedade (Landis e Silver, 2002).

Propriedades Anisotrópicas Ópticas

Com a mensuração das propriedades anisotrópicas ópticas de um tecido podemos avaliar tanto a ordem molecular, como o estado agregacional das moléculas que o compõe. Chamam-se propriedades anisotrópicas a birrefringência e o dicroísmo linear (Vidal, 1987; Vidal e Carvalho, 1990).

A birrefringência é devida à diferença de índices de refração do objeto e é determinada pela geometria, organização espacial e pela oscilação de todas as transições eletrônicas das moléculas que compõem as fibrilas colagênicas. O corpo birrefringente colocado entre polarizadores deverá exibir um máximo de brilho quando um dos seus eixos de propagação for colocado a 45° dos dois polarizadores (Vidal, 1987; 2003a).

O dicroísmo linear é uma anisotropia de absorção que se manifesta em corpos que absorvem luz polarizada. Quando a luz polarizada incide sobre a região cromofórica de uma molécula, cujos elétrons estejam vibrando no mesmo plano que o azimute do vetor elétrico, ocorre um máximo de absorção. Assim o dicroísmo revela a orientação de vibrações e, portanto é um meio extremamente acurado para determinação de ordem molecular. O dicroísmo linear é calculado como a diferença entre as absorbâncias do

espécime localizado em duas posições com respeito aos polarizadores ($A_{\text{par}} - A_{\text{per}}$, onde A_{par} = é a absorbância obtida com o azimute localizado paralelo ao polarizador e A_{per} = é a absorbância obtida com o azimute localizado perpendicular ao polarizador) (Vidal, 2003b; Vidal e Mello, 2005).

Patologias relacionadas com tendões, principalmente injúrias causadas por exercícios físicos, eram relativamente raras antes da década de 50. Porém, nas últimas décadas, freqüentemente são observados atletas com comprometimentos tendinosos, seja por excesso de treinamento e/ou uma grande quantidade de exercícios repetitivos durante toda a sua carreira. Essas desordens representam de 30-50% de todas as lesões relacionadas ao esporte (Kannus e Natri, 1997; Järvinen et al, 2001). Devido a este fato, o entendimento das alterações morfológicas, estruturais e na organização molecular ocorrida em tendões quando o mesmo é tensionado durante o processo de contração muscular pode contribuir na compreensão desses mecanismos patológicos, auxiliando em futuros trabalhos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Descrever o papel dos componentes não-colagênicos na propriedade viscoelástica de tendões flexores digitais superficiais de frangos;

Objetivos Específicos:

- Verificar possíveis alterações nas propriedades viscoelásticas de tendões submetidos a dois diferentes tratamentos enzimáticos;

- Avaliar a organização e o arranjo dos componentes da MEC dos tendões após os ensaios uniaxiais de tensão, através de análises histoquímicas e microespectrofotométricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B. Johnson A. Lewis, M. Roberts, K. Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell. 4ª edição. Garle Science, London, UK.

Benevides, G.P. Pimentel, E.R. Toyama, M.H. Novello, J.C. Marangoni, S. Gomes, L. 2004. Biochemical e biomechanical analysis of tendons of caged e penned chickens. *Connective Tissue Researches* 45, 206-215.

Benjamin, M. Ralphs, J.R. 1998. Fibrocartilage in tendons e ligaments – an adaptation to compressive load. *Journal of Anatomy* 193, 481-494.

Chiquet-Ehrismann, R. Tucker, R. 2004. Connective tissue: signaling by tenascins. *International Journal of Biochemical e Cell Biology* 36, 1085-1089.

Diamant, J. Keller, A. Baer, E. Litt, M. Arridge, R.G.C. 1972. Collagen ultra structure e its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proceedings of the Royal Society of Biology* 180, 293-315.

Evans, J.H. Barbanel, J.C. 1975. Structural e mechanical properties of tendons related to function. *Equine Veterinary Journal* 7, 1-8.

Evans, J. H. Barbanel, J. C. 1978. The functional significance of the mechanical properties of soft connective tissues. In: V. Wright. *Biol. Eng. Soc (Eds.), Symposium on Tendons e Ligaments*. Leeds, U.K.

Fratzal, P. Misof, K. Zizak, I. 1997. Fibrilar structure e mechanical properties of collagen. *Journal of Structural Biology* 122, 119-122.

Freeman, W J, Silver, H F. 2004. Analysis of mineral deposition in turkey tendons e self-assembled collagen fibers using mechanical techniques. *Connective Tissue Researches* 45, 131-141.

Gathercole, L.J. Keller, A. 1975. Light microscopic waveform in collagenous tissue their structural implications. In: Aikins E.D.T., Keller A. (Eds.), *Structure of Fibrous Biopolymers*. Butterwordths, London, pp.153-188.

Ghetie, V. Chitescu, St. Cotofan, V. Hillebre, A. 1981. *Atlas de anatomía de las aves domésticas*. Acribia-Paraninfo; Zaragoza e Madrid, 294 pp.

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

Järvinen, T.H.A. Kannus, P. Paavola, M. Jarvinen, T.L.N. Józsa, L. Jarvinen, M. 2001. Achilles tendon injuries. *Current Opinion in Rheumatology* 13, 150-155.

Järvinen, T.A.H. Järvinen, T.L.N. Kannus, P. Józsa, L. Järvinen, M. 2004. Collagen fibers of the spontaneous ruptured human tendons display decreased thickness e crimp angle. *Journal of Orthopaedic Research* 22, 1303-1309.

Józsa, L. Kannus, P. 1997. Function e mechanical behaviour of tendons In: Human Kinetics (Ed.), Human tendons: anatomy, physiology e pathology. pp. 98-113.

Kjaer, M. 2004. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon e skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews* 84, 649-698.

Kannus, P. Natri, A. 1997. Etiology e pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 7, 107-112.

Landis, W.J. Silver, F.H. 2002. The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comparative Biochemistry e Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133(4), 1135-1157.

Lehn, J.M., 2002. Toward self-organization and complex matter. *Science* 295, 2400-2403.

Linsenmayer, T.F. 1985. Collagen. In: Hay, E.D. *Cell biology of extracellular matrix*. New York. Plenum Press. Pp. 5-37.

Maganaris, C.N. Narici, M.V. Almekinders, L.C. Maffulli, N. 2004. Biomechanics e Pathophysiology of overuse tendon injuries. *Sports Medicine* 34 (14), 1005-1017.

Merrilees, J.M. Flint, M.H. 1980. Ultrastructural study of tension e pressure zones in a rabbit flexor tendon. *American Journal of Anatomy* 157, 87-106.

Nimni, M.E. Harkness, R.D. 1988. Molecular structures e functions of collagen. In: Nimni, M.E. Collagen. Vol I, Biochemistry Boca raton CRC Press.

Ottani, V. Martini, D. Franchi, M. Ruggeri, A. Raspei, M. 2002. Hierarchical structures in fibrilar collagens. *Micron* 33 (7-8), 587-596.

Paoli, F. Vidal, B.C. 2004. Increased DNA content e nuclear phenotypic alterations associated with mechanical load in wrap-around joint chicken tendons. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* 21(4), 211-216.

Ralphs, J.R. Wagget, A.D. Benjamin, M. 2002. Actin stress fibers e cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo e response to mechanical loading of tendon cells in vitro. *Matrix Biology* 21, 67-74.

Scott, J.E. Orford, C.R. Hughes, E.W. 1981. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. *Biochemistry Journal* 195, 573-581.

Silver, F.H. Ebrahimi, A. Snewhill, P.B. 2002. Viscoelastic properties of self assembles type I collagen fibers: molecular basis of elastic e viscous behaviors. *Connective Tissue Research* 43, 569-580.

Silver, H. Freeman, J.W. Seehra, G., 2003. Collagen self-assembly e the development of tendon mechanical properties. *Journal Biomechanics* 36, 1529-1553.

Tankred, K. 1973. Anatomy of the chicken e domestic birds. The Iowa State University Press; Ames, Iowa.

Van der Rest, M. Garrone, R. 1991. Collagen family of proteins. FASEB Journal 5, 2814-2823.

Vidal, B.C. 1987. Matriz Extracelular. In: Vidal & Mello Biologia Celular. Atheneu; Rio de Janeiro, pp. 273-303.

Vidal, B.C. 2003a. Image analysis of linear dichroism in collagen-nano-silver complexes. Microscopy e Analysis 97, 21-23.

Vidal, B.C. 2003b. Image analysis of tendon helical superstructure using interference e polarized light microscopy. Micron 34(8), 423-432.

Vidal, B.C. Carvalho, H.F. 1990. Aggregation state e molecular order of tendons as a function of age. Matrix 10, 48-57.

Vidal, B.C. Mello, M.L.S. 2005. Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye ponceau SS to collagen fibers. Biopolymers 78:121-128.

Vilarta, R. Vidal, B.C. 1989. Anisotropic e biomechanical properties of tendons modified by exercise e denervation: aggregation e macromolecular order in collagen bundles. Matrix 9, 55-61.

Vogel, K.G. Koob, T.J. 1989. Structural specialization in tendons under compression. *International Journal of Cytology* 115, 267-293.

Wang, J. H.-C. 2006. Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics* 39, 1563-1582.

Woo, S. L.-Y. Ritter, M.A. Amiel, D. Seers, T.M. Gomez, M.A. Kuei, S.C. Garfin, S.R. Akeson, W.H. 1980. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons: long term effects of exercise on the digital extensors. *Connective Tissue Research* 7, 177-183.

Yoon, J.H. Halper, J., 2005. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interact* 5(1), 22-34.

CAPÍTULO I

O papel dos componentes não-colagênicos nas propriedades mecânicas de tendões de frangos

Flávia de Paoli¹, Sérgio da Rocha Piedade² e Benedicto de Campos Vidal¹

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia

² Departamento de Ortopedia, Faculdade de Ciências Médicas

Universidade Estadual de Campinas – SP, Brasil

Running title: composition and biomechanical in tendons

Correspondence to: Flávia de Paoli

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-863, Campinas, SP, Brasil.

Tel: (55) (19) 3521-6124 Fax: (55) (19) 3521-6111, e-mail: flavia.paoli@gmail.com

RESUMO

O objetivo foi descrever o papel dos componentes não-colagênicos nas propriedades mecânicas dos tendões. Tendões flexores de frangos foram distribuídos em 3 grupos: grupo I (não-tratados), grupos II (tratados com hialuronodase testicular) e grupo III (tratados com papaína). Após os tratamentos, parâmetros dimensionais foram mensurados. Após os testes de tensão, os tendões foram imediatamente fixados e processados para análises histoquímicas. Os resultados dos testes dos grupos II e III mostraram diminuição dos valores de tensão máxima, energia elástica e módulo de elasticidade. Ao contrário, os valores de deformação máxima foram maiores para o grupo II, indicando que, após o tratamento enzimático, os tendões perderam a sua capacidade de resistir às forças tensionais. As análises histoquímicas confirmaram a remoção dos componentes não-colagênicos dos grupos II e III. Em conclusão, a retirada dos componentes não-colagênicos modificam as propriedades mecânicas dos tendões.

Plavras-chave: tendões, biomecânica, colágeno, proteoglicanos, tratamento enzimático.

1. INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos tem sido descritos sobre as propriedades mecânicas dos tendões em diferentes condições fisiológicas, como crescimento [1], mineralização [2], envelhecimento [3] e em algumas patologias [4-6]. Estes autores enfocam a importância da organização e interação dos constituintes com as propriedades mecânicas dos tendões.

Um tendão é formado por tenócitos, fibras colágenas e elásticas, glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos (PGs), proteínas não-colagênicas e água [7,8]. Tenócitos estão arranjados em fileiras longitudinais entre as fibras de colágeno e são responsáveis pela produção inicial e a manutenção/remodelação da matriz extracelular (MEC) em resposta a diferentes forças mecânicas [8-11].

Diversos estudos tem sido realizados nas ultimas décadas para elucidar o papel dos PGs e GAGs na estabilidade e propriedade mecânica dos tendões [1,5,12,13]. É conhecido que componentes não-colagênicos fazem parte da orientação macromolecular dos feixes de colágenos por otimização de ligações eletrostáticas [14-16], na regulação do diâmetro das fibras de colágeno [12], nos processos de mecanotransdução[17], bem como na manutenção de água nos tecidos [8,18].

Em estudos prévios, Screen e colaboradores [5] analisaram fascículos de tendões tratados com tampão fosfato e condroitinase ABC e concluíram que alterações na composição ou organização dos componentes não-colagênicos podem influenciar no mecanismo de estrutura-função dos tendões. Devido a este fato, nosso estudo testa a hipótese que as propriedades mecânicas dos tendões podem ser alteradas por mudanças na composição extracelular de tendões de frangos, em particular os componentes não colagênicos. Pouco é conhecido sobre a resposta mecânica de tendões de frangos tratados com enzimas, como a hialuronidase testicular e papaína. A hialuronidase testicular é

especificamente utilizada para degradar ácido hialurônico e condroitim sulfato 4 e 6, enquanto a papaína não é uma enzima específica, degradando proteínas não-colagênicas, como a proteína central dos PGS [19].

O ensaio uniaxial de tensão produz uma curva de força (N)-deslocamento (mm). Entretanto, para quantificar as diferenças dimensionais entre espécimes, a força do tendão é convertida em valores de tensão (MPa) utilizando os valores da área de secção transversa, enquanto o deslocamento é convertido em deformação (%) utilizando os valores do comprimento inicial do tendão. Uma curva de tensão-deformação é similar a uma curva de força-deslocamento, mas reflete as propriedades intrínsecas do material, além das propriedades estruturais dos componentes do tendão [20]. As regiões da curva tensão-deformação foram descritas previamente [21-24].

O objetivo deste trabalho foi descrever o papel dos componentes não-colagênicos nas propriedades mecânicas em tendões de frangos. Esta é uma importante questão levantada na literatura por algum tempo, mas esta relação estrutura-função ainda não está clara.

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Animais

Tendões flexores digitais superficiais de frangos (*Rubro negro*) (n=21) com 45 dias foram gentilmente cedidos pela Granja Coperaves (Itatiba, SP, Brasil). As aves tinham peso médio de 2 kg (S 0,2) e foram alimentados com ração balanceada para frangos e água *ad libitum*.

Os tendões flexores foram dissecados desde a junção músculo-tendinosa até a região de entese, correspondendo a um comprimento médio de 20 cm (S 0,5). Após, os tendões

foram divididos em 3 grupos e em todos os grupos foram utilizados 7 tendões frescos e úmidos.

Grupo I (não-tratados) – os tendões foram preservados em solução fisiológica (0,9% NaCl) a 4°C durante 2 horas.

Grupo II – os tendões foram submetidos a tratamento enzimático *in totum* em solução de 2 mg/ml de hialuronidase testicular (Sigma, EUA), durante 10 horas a 37°C [19]. Após, os tendões foram preservados em solução (0,9% NaCl) a 4°C durante 2 horas.

Grupo III – os tendões foram submetidos a tratamento enzimático *in totum* em solução de papaína (Merck, Alemanha) na concentração de 40mg/g de tecido durante 2 horas a 37°C [19]. Após, os tendões foram preservados em solução fisiológica (0,9% NaCl) a 4°C durante 2 horas.

Após esses tratamentos, peso (g), largura (mm), espessura (mm) e área seccional transversa (mm^2) foram calculados. A área seccional transversa dos tendões foi aproximadamente um retângulo e foi mensurada em 3 regiões (proximal, intermediária e distal). O peso foi mensurado com uma balança analítica automática (Scientech Sa 0210, EUA) e o comprimento, a largura, a espessura e a área seccional transversa foram mensuradas utilizando um paquímetro (precisão 0,5 mm). A densidade relativa dos tendões foi determinada sendo o quociente de sua massa (g) pelo seu volume (ml). O volume dos tendões foi calculado utilizando o método de deslocamento salino com uma proveta graduada de 25 ml e 2 cm de diâmetro.

Uma máquina universal de testes (EMIC DL 2000, Brasil) equipada com célula de carga de 500N foi utilizada para os ensaios de tensão uniaxial, em sentido vertical. As amostras foram fixadas em garras de aperto frontal com capacidade de 50 Kgf (GR019, EMIC, Brasil) e a velocidade de carregamento foi de 0,3 mm/s. Os dados foram calculados

utilizando software Tesc 1.08. A temperatura ambiente foi controlada em 24°C e a umidade do ar em 65%.

Tensão máxima (TM), deformação máxima (DM) e módulo de elasticidade foram calculados a partir da curva de tensão-deformação. A energia elástica foi calculada como a área abaixo da curva força-deslocamento e o módulo de elasticidade sendo a projeção da região linear da curva tensão-deformação [2,25,26]. Softwares origin 5.0 e excel 5.0 foram utilizados para a construção das curvas e para todos os cálculos.

Imediatamente após os ensaios de tensão, os tendões de todos os grupos (n=7) foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1M, pH 7.4 durante 24 horas. Após, foram lavados em água destilada, processados para inclusão em Histosec (Merck, Alemanha) e cortes com 7 µm de espessura foram obtidos para as análises morfológicas. Os cortes foram corados em solução de azul de toluidina (AT) 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0 durante 15 min [27]. Após, os cortes foram colocados em solução de molibdato de amônia a 4% (Merck, Alemanha) durante 15 min, lavados em água destilada, diafanizados em xilol e montadas em bálsamo do Canadá (Vetec, Brasil).

Os cortes dos grupos de tendões foram analisados com microscópio Olympus BX51-B (Olympus Amer. Inc, EUA) equipado com objetiva 10X e 20X UPlan FL e optovar fator 2. O microscópio foi conectado a um computador Pentium 4 através de uma câmera Q3 Olympus. O software Image Pro Plus 5.0 foi utilizado para documentação de imagens.

Todos os resultados foram reportados com média e desvio padrão quando apropriado. Para os cálculos foi utilizado teste paramétrico (ANOVA) com software Minitab¹². Valores de $p < 0,05$ indicaram significância.

3. RESULTADOS

Os resultados dos parâmetros dimensionais e densidade relativa dos grupos de tendões estão demonstrados na tabela 1. Análises estatísticas demonstraram que o peso e a densidade relativa dos grupos II e III (tendões tratados com enzimas) diminuíram em comparação ao grupo I (não-tratados) ($p < 0,05$), enquanto comprimento (mm), espessura (mm), largura (mm) e área seccional transversa (mm^2) não foram alterados ($p > 0,05$).

Uma curva de tensão-deformação representativa é mostrada na figura 1 e diferenças foram observadas quanto ao formato da curva dos 3 grupos aqui analisados. O grupo I mostrou um formato de curva típico de tensão-deformação, semelhante ao demonstrado previamente. Por outro lado, o grupo II mostrou um aumento na região “toe” e “heel” da curva, enquanto o grupo III as regiões foram pouco observadas.

A tabela 2 mostra a análise estatística dos valores de TM, DM, energia elástica e módulo elástico dos 3 grupos analisados. O grupo I mostrou maior valor de TM, energia elástica (entre os grupos I e III) e módulo de elasticidade ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo II mostrou maior valor de DM do que os grupos I e III ($p < 0,05$) e entre os grupos I e III não foram detectadas diferenças ($p > 0,05$).

Cortes corados com AT mostraram diferenças entre os 3 grupos analisados. O grupo I (não-tratado) apresentou regiões altamente coradas, especialmente entre as fibras de colágeno, enquanto no grupo II observa-se uma MEC pouco corada e no grupo III a MEC não se corou (Fig. 2 A, B e C).

4. DISCUSSÃO

Tendões comportam-se viscoelasticamente e exibem respostas adaptativas para condições de aumento de carga, desuso [20] e diferentes tipos de forças [18,28]. As propriedades mecânicas dos tendões são diretamente dependentes da quantidade de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno, organização macromolecular das fibras de colágeno, interação entre os componentes da MEC, arranjo das fibras de colágeno, além da interação célula-matriz [1,8,9].

Tendões consistem de 55-70% de água, e uma importante parte está associada a PGs e GAGs na MEC [8,22,29]. Este fato explicaria a diminuição de peso e conseqüentemente a redução na densidade relativa em tendões dos grupos II e III, os quais foram tratados com hialuronidase testicular e papaína, respectivamente. Uma alta densidade tecidual pode refletir grande quantidade de componentes extracelulares que estão fortemente compactados nos tendões resultando em maior resistência a tensão [30]. Em adição, Hashemi e colaboradores [31] demonstraram diferenças nas propriedades de tensão, módulo de elasticidade e energia elástica entre os tendões com diferentes densidades.

O colágeno é o componente mais relacionado com as funções mecânicas. Entretanto, além do colágeno, outros componentes como decorim, biglicam, fibromodulin, ácido hialurônico e glicoproteínas não colagênicas também representam um importante papel nessas propriedades. Foi proposto que estes outros componentes são importantes no deslizamento das fibrilas de colágeno quando forças tensionais são aplicadas no tendão [32].

Diversos trabalhos tem discutido a orientação e organização dos PGs e GAGs com relação aos feixes de colágenos [12,13,33]. Com PGs e GAGs formando uma ponte entre as fibrilas de colágeno adjacentes, a matriz não-colagênica representa um importante papel no

controle do deslizamento entre as fibrilas, influenciando assim nas propriedades mecânicas [5,33,34].

Ao contrário das afirmações de Provenzano e Veerby Jr. [35] de que os componentes não colagênicos não participam da transmissão de forças em ligamentos e tendões, os nossos resultados demonstrados aqui confirmam a hipótese de Ciarletta e colaboradores [33] e Liao e Vesely [34] na qual, componentes não-colagênicos participam diretamente da propriedade viscoelástica dos tendões. Foi possível a detecção de GAGs em cortes histológicos de tendões corados com AT, no qual foram observados uma forte coloração entre as fibras de colágeno nos cortes do grupo I. Por outro lado, em cortes de tendões dos grupos II e III esta coloração diminuiu. Este fato confirma que GAGs foram removidas pela ação da hialuronidase testicular e indiretamente pela ação da papaína que, degradando a proteína central dos PGs, permitiu a solubilização dos GAGs.

Tendões e ligamentos comportam-se como materiais elásticos não linear em ensaios de tensão até a ruptura. A curva de tensão-deformação dos grupos aqui estudados confirma este comportamento. Enquanto no grupo I a curva de tensão-deformação foi similar com as curvas previamente descritas [21-23,25,36], a curva de grupo II mostrou um grande deslocamento e uma baixa tensão indicando que a perda de GAGs e consequentemente de água torna o tendão menos viscoso e mais elástico; a curva do grupo III mostrou baixos valores de TM e DM, indicando que a remoção de várias proteínas pela papaína comprometeu as propriedades mecânicas dos tendões. Nos grupos II e III, os valores de TM foram menores do que no grupo I. Parry [37] demonstrou que TM de tecidos colagenosos está diretamente relacionada com o diâmetro das fibras. Em tendões de peru com 12 semanas de idade, os valores de TM são de 80 MPa [38], indicando que as ligações cruzadas e processos de mineralização podem influenciar nos valores de TM. Mais ainda,

nossos achados completam estas informações, demonstrando um importante papel dos componentes não-colagênicos na estrutura, organização e conseqüentemente nas propriedades viscoelásticas do tendão.

Energia elástica é a energia estocada utilizada quando o tendão é tensionado pela ação da contração muscular. Como a energia é transmitida através do tendão, ela é parcialmente dissipada como calor por causa do deslizamento das fibras de colágeno. Quando o tendão inicia seu processo de estiramento, esta energia é convertida em força e termina quando o tendão retorna ao seu comprimento inicial [1,20]. É bem caracterizado que a capacidade de estocar energia de tecidos colagenosos pode ser alterada através de processos de ligações cruzadas e mineralização [38,39]. Diferenças estatísticas entre os grupos I e II não foram observadas ($p>0,05$), sugerindo que GAGs, como condroitim sulfato 4 e 6 e ácido hialurônico não estão relacionados com a energia elástica. As diferenças descritas entre os grupos I e III ($p>0,05$) indicam que tratamento enzimático com papaína degrada componentes colagênicos e não-colagênicos. Pesquisas em nosso laboratório, utilizando microscopia de força atômica, mostraram uma desorganização nas fibrilas de colágeno em cortes de tendões bovino submetidos a tratamento enzimático com papaína (dados não publicados).

A energia elástica estocada de tendões é proveniente da orientação das fibrilas de colágeno e da estrutura e quantidade de ligações cruzadas do colágeno no tecido. Esta composição química e física dos tendões está diretamente relacionada com as propriedades mecânicas e alterações relacionadas com a idade. Com o crescimento e envelhecimento, tendões tornam-se fortes e espessos, exibindo alta capacidade de estocar energia elástica [2,40].

A força e a espessura dos tendões também são indicadas através do módulo de elasticidade. Os resultados mostraram que tendões do grupo I são mais resistentes que tendões dos outros grupos. Estas observações indicam que tanto a energia quanto o módulo elástico são muito sensíveis à quantidade de colágeno e componentes não-colagênicos, respectivamente.

Em conclusão, estes resultados demonstraram que componentes não-colagênicos representam um importante papel quando o tendão é tensionado, contribuindo na manutenção e deslizamento do componente colagênico. A retirada dos componentes não-colagênicos modifica as propriedades mecânicas dos tendões.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Marco Aurélio de Paoli, docente do Instituto de Química da UNICAMP, pela permissão para utilização da máquina universal de testes e, em especial, a técnica Simone Staub pela preciosa ajuda durante os ensaios de tensão. Ainda, agradecem ao Sr. Marco Antônio Ferreira pela indicação da Granja Aves do Paraíso e pela doação dos tendões utilizados neste trabalho. O financiamento deste trabalho foi concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Silver, H. Freeman, J.W. and Seehra, G. (2003). Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech.*, 36, 1529-1553.
- [2] Landis, W.J. and Silver, F.H. (2002). The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 133(4), 1135-1157.
- [3] Mello, M.L.S. Vidal, B.C. Carvalho, A.C. and Caseiro-Filho, A.C. (1979). Change with age of anisotropic properties of collagen bundles. *Gerontology*, 25, 2-8.
- [4] Millesi, H. Reihnsner, R. Hamilton, G. Mallinger, R. and Menzel, E.J. (1995). Biomechanical properties of normal tendons, normal palmar aponeuroses and palmar aponeuroses from patients with Dupuytren's disease subjected to elastase and chondroitinase treatment. *Connect. Tissue Res.*, 31(2), 109-115.
- [5] Screen, H.R.C. Shelton, J.C. Chhaya, V.H. Kayser, M.V. Bader, D.L. and Lee, D.A. (2005). The influence of noncollagenous matrix components on the micromechanical environment of tendon fascicles. *Ann. Biomed. Eng.*, 33(8), 1090-1099.
- [6] Maganaris, C.N. Reeves, N.D. Rittweger, J. Sargeant, A.J. Jones, D.A., Gerrits, K. and Hann, A. (2006). Adaptative response of human tendon to paralysis. *Muscle and Nerve*, 33, 85-92.

- [7] Silver, F.H. Ebrahimi, A. and Snewhill, P.B. (2002). Viscoelastic properties of self assemblies type I collagen fibers: molecular basis of elastic and viscous behaviors. *Connect. Tissue Res.*, 43, 569-580.
- [8] Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.*, 84, 649-698.
- [9] Vilarta, R. and Vidal, B.C. (1989). Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*, 9, 55-61.
- [10] Hayem, G. (2001). Tenology: a new frontier. *Joint Bone Spine*, 68, 19-25.
- [11] Ralphs, J.R. Wagget, A.D. and Benjamin, M. (2002). Actin stress fibers and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro. *Matrix Biol.*, 21, 67-74.
- [12] Scott, J.E. Orford, C.R. and Hughes, E.W. (1981). Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. *Biochem. J.*, 195, 573-581.
- [13] Cribb, A.M. and Scott, J.E. (1995). Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stresses tendon. *J. Anat.*, 187, 423-428.

[14] Vidal, B.C. (1963). Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 56, 529-536.

[15] Vidal, B.C. (1964). The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. *Protoplasma*, 59, 472-479.

[16] Vidal, B.C. (1980). The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell. Mol. Biol.*, 26, 421-451.

[17] Chiquet-Ehrismann, R. and Tucker, R. (2004). Connective tissue: signaling by tenascins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36, 1085-1089.

[18] Vogel, K.G. and Koob, T.J. (1989). Structural specialization in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.*, 115, 267-293.

[19] Kiernan, J.A. (1981). "Histological and histochemical methods." Pergamon Press (ed.), pp. 166. (Oxford).

[20] Maganaris, C.N. Narici, M.V. Almekinders, L.C. and Maffulli, N. (2004). Biomechanics and pathophysiology of overuse tendon injuries. *Sports Med.*, 34 (14), 1005-1017.

[21] Woo, S. L-Y. Ritter, M.A. Amiel, D. Sanders, T.M. Gomez, M.A. Kuei, S.C. Garfin, S.R and Akeson, W.H. (1980). The biomechanical and biochemical properties of swine

tendons: long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect. Tissue Res.*, 7, 177-183.

[22] Józsa, L, Kannus, P., 1997. "Function and mechanical behaviour of tendons." In: *Human tendons: anatomy, physiology and pathology*, Human Kinetics (ed.), pp. 98-113

[23] Fratral, P. Misof, K. and Zizak, I. (1997). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J. Struct. Biol.*, 122, 119-122.

[24] Gutschmann, T. Fantner, G.E. Kindt, J.H. Venturoni, M. Danielsen, S. Hansma, P.K. (2004). Force spectroscopy of collagen fibers to investigate their mechanical properties and structural organization. *Biophys. J.*, 86, 3186-3193.

[25] Vincent, J.F.V. (1992). "Biomechanics materials: a practical approach." IRL Press Oxford University Press (ed.). (London).

[26] Louis-Ugbo, J. Lusson, B. and Hutton, W.C. (2004). Tensile properties of fresh human calcaneal (Achilles) tendons. *Clin. Anat.*, 17, 30-35.

[27] Mello, M.L.S., and Vidal, B.C. (1980). "Práticas de biologia celular." Edgar Blücher (ed.). (Campinas, SP).

[28] Benjamin, M. and Ralphs, J.R. (1998). Fibrocartilage in tendons and ligaments – an adaptation to compressive load. *J. Anat.*, 193, 481-494.

[29] Riley, G.P. Harrall, R.L. Constant, C.R. Cawston, T.E. and Hazleman, B.L. (1994). Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendonitis. *Ann. Rheum. Dis.*, 53, 359-366.

[30] Hawkes, S. J. (2004). The Concept of Density. *J. Chem. Educ.*, 81, 14-15.

[31] Hashemi, J. Chandrashekar, N. and Slauterbeck, J. (2005). The mechanical properties of the human patellar tendon are correlated to its mass density and are independent of sex. *Clin. Biomech.*, 20, 645-652.

[32] Puxkandl, R., Zizak, I., Paris, O., Keckes, J., Tesch, W., Bernstorff, S., Purslow, P. and Fratral, P. (2002). Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 357 (1418), 191-197.

[33] Ciarletta, P. Micera, S. Accoto, D. and Dario, P. (2006). A novel microstructural approach in tendon viscoelastic modelling at the fibrillar level. *J. Biomech.*, 39 (11), 2034-2042.

[34] Liao, J. and Vesely, I. (2007). Skewness angle of interfibrillar proteoglycans increases with applied load on mitral valve chordae tendineae. *J. Biomech.*, 40 (2), 390-398.

- [35] Provenzano, P.P. and Vanderby Jr., R. (2006). Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.*, 25 (2), 71-84.
- [36] Viidik, A. (1996). "Tendons and ligaments." In: *Extracellular Matrix – tissue function*, Wayne D. Comper (ed.), Vol. 1 pp. 303-327. (Harwood Academic Publishers).
- [37] Parry, D.A. (1988). The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys. Chem.*, 29, 195-209.
- [38] Silver, F.H. Christiansen, D. Snowhill, P.B. Chen, Y. Landis, W.J. (2000). The role of mineral in the storage of elastic energy in turkey tendons. *Biomacromolecules*, 1, 180-185.
- [39] Christiansen, D.L. Silver, F.H. (1993). Mineralization of an axially aligned collagenous matrix: a morphological study. *Cells and Materials*, 3, 177-188.
- [40] Shadwick, R.E. (1990). Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to functions and age. *J. Applied Physiol.*, 68 (3), 1033-1040.

Tabela 1: Valores dos parâmetros dimensionais dos 3 grupos estudados. Para os grupos II e III os parâmetros dimensionais foram calculados após o tratamento enzimático.

Parâmetros Dimensionais	Não-Tratado (n=07)		Hialuronidase Testicular (n=07)		Papaína (n=07)	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
Peso (g)	2,1*	0,1	1,0*	0,3	1,2*	0,1
Largura (mm)	3,0	0,1	2,8	0,1	2,9	0,2
Espessura (mm)	2,0	0,1	2,0	0,1	1,8	0,2
Área seccional transversa (mm ²)	6,0	0,3	5,6	0,3	5,3	1,2
Densidade Relativa (g/ml)	5,2*	0,8	2,5*	0,3	1,7*	0,1

\bar{X} média S desvio padrão

*ANOVA p<0. 05 indica significância

Tabela 2: Valores de tensão máxima, deformação máxima, energia elástica e módulo de elasticidade dos grupos estudados.

Grupos	TM (MPa)		DM (%)		Energia Elástica (N.mm)		Módulo de Elasticidade (MPa)	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
I	53,6*	10,6	23,3*	4,9	641,4*	147,4	3,5*	0,2
II	25,7*	5,6	46,5*	5,6	513,0	186,7	1,3*	0,3
III	4,1*	1,9	20,6	6,3	55,5*	14,3	0,3*	0,1

n = 7 tendões

TM: tensão máxima; DM: deformação máxima.

\bar{X} média S desvio padrão *ANOVA $p < 0.05$ não indica significância

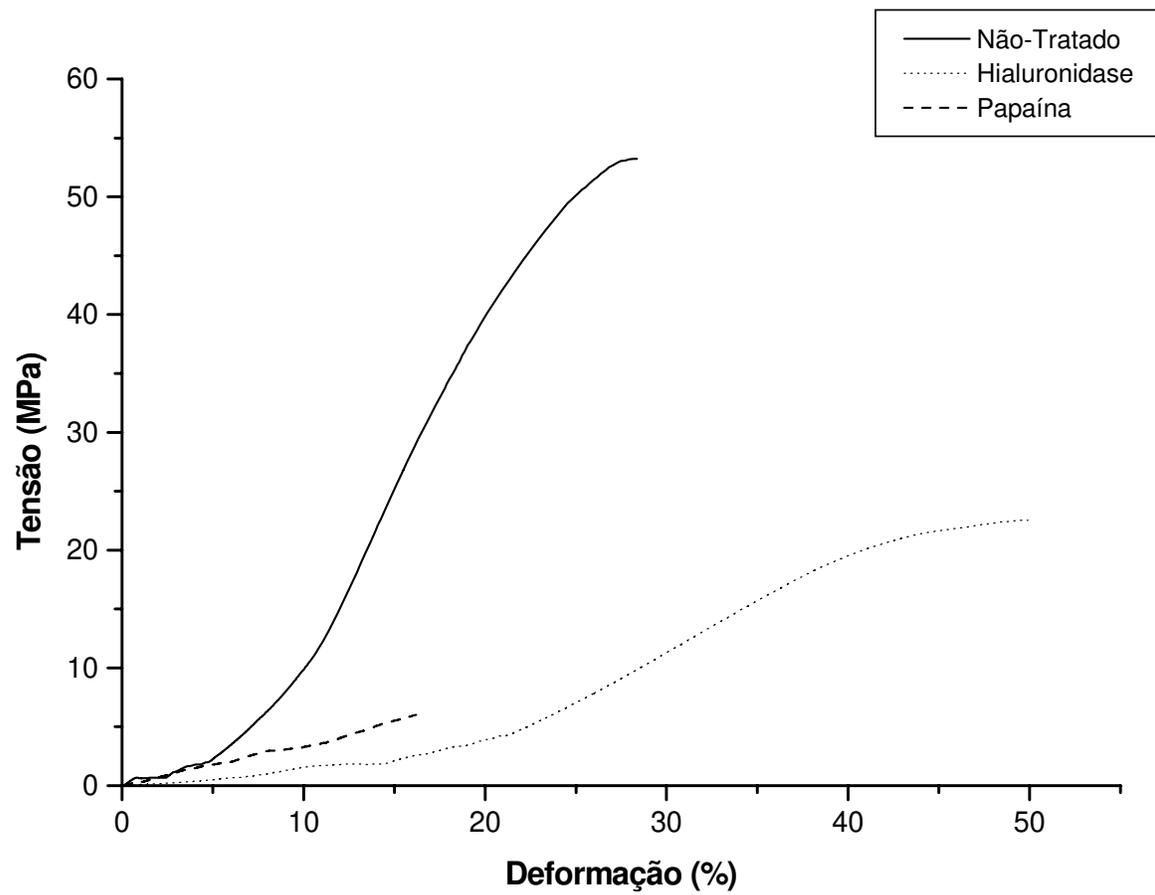


Figura 1. Curva representativa de tensão-deformação dos grupos I, II e III.

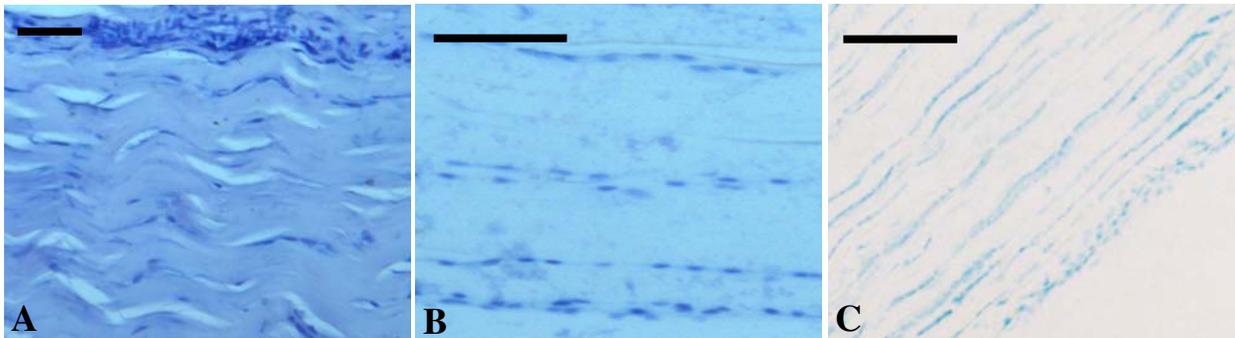


Figura 2: Cortes de tendão flexor digital superficial de frango corados com AT. A: Grupo I (não-tratados); B: Grupo II (tratados com hialuronidase testicular); C: Grupo III (tratados com papaína). Esta análise histoquímica confirma a remoção dos componentes não-colagênicos. Barras = 500 μ m

CAPÍTULO II

Influência de ensaios uniaxiais de tensão na organização molecular em tendões de frangos.

Flávia de Paoli e Benedicto de Campos Vidal

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas – SP - Brasil

Short Title: Testes mecânicos e organização molecular em tendões

Correspondência: Flávia de Paoli

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-863, Campinas, SP, Brasil.

Tel: (55) (19) 3788-6124 Fax: (55) (19) 3788-6111, e-mail: flavia.paoli@gmail.com

RESUMO

Alterações na organização molecular em tendões de frangos, submetidos à ensaio uniaxial de tensão, foram examinados através de análises histoquímicas e microespectrofotométricas. Os tendões foram divididos em controle (não submetidos aos ensaios) e experimental (submetidos aos ensaios). Após os testes de tensão, todos os tendões foram fixados e encaminhados para inclusão em parafina rotineiros. Duas metodologias foram empregadas: para detecção de glicosaminoglicanos (cortes corados com azul de toluidina) e para radicais eletropositivos totais (cortes corados com ponceau SS). Análises microespectrofotométricas dos cortes do grupo controle corados com azul de toluidina observou-se uma forte coloração em azul ($\lambda=540-550$ nm), enquanto em cortes do grupo experimental esta coloração variou da coloração azulada para a avermelhada ($\lambda=540-550$ nm e $\lambda=590-600$ nm). Com isso, pode-se considerar que o grupo negativo dos glicosaminoglicanos disponíveis quando o tendão encontrava-se relaxado tornaram-se menos disponíveis quando o tendão foi estirado. Já os cortes corados com ponceau SS demonstraram pico de absorção de $\lambda= 520-530$ nm e altos valores de absorbâncias. A deformação de materiais envolve diversos mecanismos, como por exemplo, o desaparecimento de crimps. Esta alteração morfológica explicaria tanto o bloqueio dos grupos negativos de glicosaminoglicanos quanto o alto valor de absorbância detectado nos corte do grupo experimental corados com ponceau SS. Em conclusão, os componentes dos tendões são estruturas dinâmicas, altamente organizadas e orientadas, que são capazes de se rearranjarem durante o estiramento.

Palavras-Chave: Tendões, testes mecânicos, colágeno, glicosaminoglicanos e organização molecular.

INTRODUÇÃO

As propriedades mecânicas dos tecidos conjuntivos são estudadas através de procedimentos biomecânicos, demonstrando que as funções teciduais são uma direta consequência de seus componentes e como estes estão organizados. Em tendões, pesquisas têm relacionado à existência de variações na organização molecular durante diversos processos, como reparo (Vidal, 1966; Mello et al., 1975), envelhecimento (Mello et al., 1979), após exercícios físicos e denervação em tendões (Vilarta e Vidal, 1989).

As macromoléculas presentes na matriz extracelular (MEC) dos tendões podem ser classificadas em: 1) colágenos, 2) proteoglicanos (PGs); 3) glicosaminoglicanos (GAGs) e 4) glicoproteínas não-colagênicas (Silver et al, 2002; 2003; Kjaer, 2004; Yoon e Halper, 2005). Os componentes não-colagênicos variam ao longo de todo o tendão e dependem das diferentes forças mecânicas que são aplicadas (e.g. tensão e compressão) (Vogel e Koob, 1989; Berenson et al., 1996; Wang, 2006). Scott e colaboradores (1981) sugerem que a interação entre o colágeno e PGs/GAGs é um importante aspecto para o desenvolvimento do tendão, já que PGs agem como organizadores de tecidos, orientando e organizando as fibrilas de colágeno e inibindo processos de mineralização. Em adição, interações específicas entre as fibrilas de colágeno e os componentes não-colagênicos podem estar envolvidos no comportamento de tendões sob tensão (Scott, 1992; Cribb e Scott, 1995; Redaelli et al., 2003; Kjaer, 2004).

A microscopia eletrônica é utilizada para detectar estas interações (Scott, 1980; 1981; Cribb e Scott, 1995; Silver et al., 2003). Mas, nestes casos, resultados de microscopia eletrônica podem ser complementados com resultados obtidos em análises microespectrofotométricas, como reportado por Vidal (1977) e Vidal e Mello (1984). Devido a este fato, nosso estudo testa a hipótese que alterações podem ser detectadas,

através de análises microespectrofotométricas, na organização molecular de tendões após estiramento.

A organização molecular é apenas expressada em valores quantitativos e estatísticos quando estudada através das anisotropias ópticas, como o dicroísmo linear. O dicroísmo linear é a absorção máxima da luz polarizada que ocorre ao atingir a região cromofórica de uma molécula cujos elétrons estejam vibrando no mesmo plano que o azimute do vetor elétrico. Ele é calculado como a diferença entre as absorbâncias do espécime, localizado paralelo (A_{pa}) e perpendicular (A_{per}) com respeito ao plano de luz polarizada (Vidal, 1980; 1987; Vidal e Mello, 1984; 2005). Com isso, as análises anisotrópicas do complexo formado (componentes da MEC-corantes dicroicos) podem contribuir para o esclarecimento da participação dos componentes colagênicos e não-colagênicos nas propriedades mecânicas do tendão (Vidal and Mello, 2005; Vidal and Volpe, 2005).

O objetivo do presente estudo foi detectar alterações na organização molecular de tendões de frangos antes e após os ensaios de tensão, utilizando análises histoquímicas e microespectrofotométricas.

MATERIAL E METODOS

Animais

Tendões flexores digitais superficiais de frangos (n=14) (raça *Rubro negro*) foram gentilmente cedidos pela granja Coperaves (Itatiba, SP, Brasil). Os animais possuíam um peso médio de 2 kg (S 0,2) e eram alimentados com ração balanceada para frangos e água *ad libitum*.

Os tendões flexores foram dissecados desde a junção músculo-tendinosa até a região de entese, correspondendo a comprimento médio de 20 cm (S 0,5). Eles foram divididos em

controle (não submetidos aos testes mecânicos; n=7) e estirados (submetidos aos testes mecânicos; n=7).

Ensaio uniaxial de tensão

Uma máquina universal de testes (EMIC DL 2000, Brasil) equipada com célula de carga de 500N foi utilizada para ensaios de tensão. As amostras foram fixadas em garras de aperto frontal com capacidade de 50 Kgf (GR019, EMIC, Brasil), no sentido vertical e com velocidade de carregamento de 0,3 mm/s. Ao atingirem a região plástica do tendão, os ensaios foram interrompidos e os tendões retirados do sistema de garras.

Histoquímica

Após os ensaios, todos os tendões foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, pH 7,4 durante 24 horas. Após, eles foram lavados em água destilada, encaminhados para processos de inclusão em Histosec (Merck, Alemanha) e cortes com 7 µm de espessura foram obtidos. Os tendões do grupo controle (não submetidos aos testes) foram fixados e processados como descrito acima.

Duas metodologias foram empregadas:

- Para detecção de glicosaminoglicanos – cortes foram corados com solução de azul de toluidina (AT) 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0 durante 15 min (Mello e Vidal, 1980). Após, os cortes foram mergulhados em solução de molibdato de amônia 4% (Merck, Alemanha) durante 15 min, lavados em água destilada, diafanizados em xilol e montados em bálsamo do Canadá natural (Vetec, Brasil).

- Para detecção de radicais eletropositivos – cortes foram corados durante 3 min com solução de ponceau SS 0,025% em 3% de ácido acético diluído em água destilada (Vidal e Mello, 2005). Após, os cortes foram lavados em solução de ácido acético 3%, diafanizados em xilol e montados em bálsamo do Canadá natural (Vetec, Brasil), um meio natural de montagem tradicionalmente recomendado devido ao seu índice de refração ($n_D = 1.54$) que é próximo ao índice de refração de espécimes biológicos ($n_D \sim 1.53$).

Microespectrofotômetro

Curvas de absorção espectral e valores de absorção máxima foram determinadas em cortes corados com AT e ponceau SS, utilizando um microespectrofotômetro de varredura automático Zeiss (Oberkochen, Alemanha) conectado a um computador. As condições operacionais foram: objetiva plan 40/0,60, optovar fator 2,0, diâmetro de diafragma de campo 0,2 mm, diafragma de medida 0,25 mm e condensador 16/0,30 LD-Epiplan. Curvas foram plotadas e construídas utilizando absorbâncias obtidas com o eixo maior do tendão posicionado paralelo e perpendicular ao plano de luz polarizada em comprimentos de ondas iniciando em 490 nm até 620 nm. Software origin 5.0 foi usado para construir às curvas de absorbâncias.

Fotodocumentação

Um microscópio com luz polarizada Olympus BX51-B (Olympus Amer. Inc, NY, EUA) equipado com objetiva UPlan FL 10X e optovar fator 2 foi utilizado. O microscópio foi conectado a um computador Pentium 4 através de uma câmera Q3 Olympus. Para a captura das imagens o software Image Pro Plus 5.0 foi utilizado.

Análises estatísticas

Todos os resultados foram reportados com média e desvio padrão quando apropriado. Para os cálculos foi utilizado teste paramétrico (ANOVA) com software Minitab¹². Valores de $p < 0,05$ indicaram significância.

RESULTADOS

Glicosaminoglicanos

A figura 1 (A, B, C e D) mostra imagens de cortes de tendões corados com AT. O grupo controle (A e B) demonstrou uma forte coloração em azul entre as fibrilas e fibras de colágeno, enquanto no grupo experimental (C e D) esta coloração variou do azul para o vermelho.

A curva de absorção espectral dos grupos controle apresentou um pico de absorção de $\lambda = 540-550$ nm, enquanto para o grupo experimental dois picos de absorção ($\lambda = 540-550$ nm e $\lambda = 580-600$ nm) foram observados. Porém, os 2 grupos apresentaram dicroísmo linear negativo ($A_{par} < A_{per}$) (Figura 2 – A e B). Com isso, duas diferentes médias de absorbâncias foram observadas para o grupo experimental (tabela 1).

Radicais eletropositivos totais

A figura 1 (E, F, G e H) mostra imagens de cortes de tendões corados com ponceau SS. Os cortes dos grupos controle e experimental corado com ponceau SS demonstraram diferentes intensidades de coloração e em contraste aos resultados apresentados com AT, apresentaram um dicroísmo linear positivo ($A_{par} > A_{per}$).

As curvas de absorção espectral revelaram um pico de absorção em $\lambda=520-530$ nm (Figura 2 – C e D). Em geral, o grupo experimental mostrou maior valor de absorbância, demonstrando diferenças estatísticas em comparação ao grupo controle (tabela 2).

DISCUSSÃO

A determinação da geometria e organização molecular é necessária para uma melhor compreensão tanto das funções normais quanto das desordens em diversos modelos biológicos. Achados de dicroísmo linear têm permitido a autores descreverem a orientação macromolecular de componentes colagênicos e não-colagênicos em tecidos normais (Vidal, 1963; Vidal, 1970; Mello e Vidal, 1973; Vidal, 1977).

Utilizando microscopia eletrônica, Cribb e Scott (1995) descreveram as interações entre colágeno-PGs antes e após ensaios de tensão em tendões da cauda de ratos. Porém, estes autores concluíram que a relação ultraestrutural entre os filamentos de PGs e as fibrilas de colágeno não foram visivelmente alteradas ao longo do tendão. Entretanto, em nossos resultados utilizando análises microespectrofotométricas, alterações na organização molecular após os ensaios de tensão foram observadas

Considerando o fenômeno da metacromasia, duas diferentes cores e, conseqüentemente, dois diferentes picos de absorção foram observados em cortes de tendões do grupo experimental corados com AT. Desde que o PG e sua cadeia de GAG transmite forças entre as fibrilas de colágeno e é mediador de força (Scott, 1992; Redaelli et al., 2003; Vesentini et al., 2005; Liao e Vesely, 2006), pode-se considerar que grupos negativos de GAGs disponíveis em tendões que se encontravam em repouso (controle) tornaram-se menos disponíveis em tendões após os ensaios de tensão (experimental).

A observação que complexos corante-GAGs apresentam dicroísmo linear negativo suporta a idéia de que transições eletrônicas das moléculas de corante nos cortes encontram-se perpendiculares ao longo eixo dos tendões, indicando que GAGs estão orientados paralelos a fibras de colágeno. Vidal e Mello (1984) propuseram uma organização para PGs na MEC de tendões de ratos, demonstrando que a orientação das cadeias de GAGs encontram-se predominantemente paralela às fibras de colágeno. Em adição, se cadeias de GAGs estão ligadas covalentemente à proteína central de PGs, elas possuem mobilidade e podem alinhar-se ortogonalmente ou paralelamente ao eixo maior das fibrilas de colágeno, distribuindo o estresse mecânico através de todo o tecido (Scott, 1988; 1992; Redaeli et al., 2003; Vesentini et al., 2005; Liao e Vesely, 2007). É preciso considerar que alterações nas condições biomecânicas (Vogel e Koob, 1989), reparo (Mello et al., 1975) e envelhecimento (Mello et al., 1979) podem alterar esta organização molecular.

As moléculas de ponceau SS ligam-se a paralelamente ao longo eixo das moléculas de colágeno, permitindo diversos pontos de interações via ligações eletrostática e hidrofóbicas, forças de van der Waals e pontes de hidrogênio, as quais contribuem para a estabilidade térmica do colágeno (Melling et al., 2000; Vidal e Volpe, 2005). Estas interações podem prover uma base para interpretação do papel da orientação molecular em tecidos biológicos. Com o estiramento as fibras de colágeno tornam-se mais alinhadas e compactadas. Sabe-se que a deformação de materiais colagenosos pode envolver vários mecanismos, como o desaparecimento do crimp. Crimps são características morfofuncionais, que refletem a organização molecular das fibras colágenas em estruturas fibrosas, e possuem diversas propriedades biofísicas que respondem a requerimentos mecânicos (Vidal, 1995; Vidal, 2003). O desaparecimento do crimp pode explicar os altos

valores de absorvância, em cortes corados com ponceau SS e com a não disponibilidade de grupos negativos de GAGs, como se pode deduzir a partir das observações dos cortes corados com AT no grupo experimental.

Em conclusão, diferenças quanto à organização e orientação dos componentes da MEC foram detectadas quando o tendão encontra-se não-tensionado e tensionado, demonstrando que esses componentes são estruturas dinâmicas, capazes de se reorganizarem durante diferentes condições fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Marco Aurélio de Paoli, docente do Instituto de Química da UNICAMP, pela permissão para utilização da máquina universal de testes e, em especial, a técnica Simone Staub pela preciosa ajuda durante os ensaios de tensão. Ainda, agradecem ao Sr. Marco Antônio Ferreira pela indicação da Granja Aves do Paraíso e pela doação dos tendões utilizados neste trabalho. O financiamento deste trabalho foi concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Berenson MC, Blevinis FT, Plaas AH, Vogel KG. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *Journal of Orthopaedic Research* 1996; 14:518-525.

Cribb AM, Scott JE. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stresses tendon. *Journal of Anatomy* 1995; 187:423-428.

Graham HK, Holmes DF, Watson RB, Kadler KE. Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction. *Journal of Molecular Biology* 2000; 295:891-902.

Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon e skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews* 2004; 84:649-698.

Liao J, Vesely I. Skewness angle of interfibrillar proteoglycans increases with applied load on mitral valve chordae tendineae. *Journal of Biomechanics* 2007; 40 (2): 390-398.

Melling M, Pfeiler W, Karimian-Teherian D, Schllaninger M, Sobal G, Zangeler C, Menzel EJ. Differential scanning calorimetry, biochemical e biomechanical analysis of human skin from individuals with diabetes mellitus. *Anatomical Records* 2000; 259:327-333.

Mello MLS, Vidal BC. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Annals of Histochemistry* 1973; 18:103-122.

Mello, MLS, Godo C, Vidal BC, Abujadi JM. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. *Annals of Histochemistry* 1975; 20:145-172.

Mello MLS. Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatins e euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. *Cellular Molecular Biology* 1979; 24:1-16.

Mello MLS, Vidal BC. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo: Edgar Blücher Funcamp Campinas, SP; 1980.

Redaeli A, Vesentini S, Soncini M, Vena P, Mantero S, Montevecchi FM. The possible role of decorin glycosaminoglycan in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons – a computational study from molecular to microstructural level. *Journal of Biomechanics* 2003; 36:1555-1569.

Scott JE. Localization of Proteoglycans in tendon by electron microscopy. *Biochemical Journal* 1980; 187:887-891

Scott JE. Proteoglycan-fibrillar interactions. *Biochemical Journal* 1988; 252:313-323.

Scott JE. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro e in the tissues. *FASEB Journal* 1992; 6:2639-2645.

Scott JE, Orford CR, Hughes EW. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. *Biochemistry Journal* 1981; 195:573-581.

Silver FH, Ebrahimi A, Snewhill PB. Viscoelastic properties of self assembles type I collagen fibers: molecular basis of elastic e viscous behaviors. *Connective Tissue Research* 2002; 43:569-580.

Silver H, Freeman JW, Seehra G. Collagen self-assembly e the development of tendon mechanical properties. *Journal Biomechanics* 2003; 36:1529-1553.

Vesentini S, Redaeli A, Montevicchi FM. Estimation of the binding force of the collagen molecule-decorin core protein complex in collagen fibril. *Journal of Biomechanics* 2005; 38:433-443.

Vidal BC. Pleochroism in tendon e its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma* 1963; 56:529-536.

Vidal BC. Macromolecular desorientation in detached tendons. *Protoplasma* 1966; 62:121-132.

Vidal BC. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine-ponceau 2R. *Annals of Histochemistry* 1970; 15:289-296.

Vidal BC. Acid glycosaminoglycans e endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation e macromolecular orientation. *Cellular and Molecular Biology* 1977; 22:45-64.

Vidal BC. The part played by proteoglycans e structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cellular e Molecular Biology* 1980; 26: 421-451.

Vidal BC. Métodos em Biologia Celular. In: Vidal BC, Mello MLS, editors. *Vidal & Mello Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Atheneu; 1987. p. 17-25.

Vidal BC. Crimp as part of a helical structure. *C.R. Acad. Sci. Paris* 1995; 318:173-178.

Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron* 2003; 34(8):423-432.

Vidal BC, Mello MLS. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cellular and Molecular Biology* 1984; 30 (3):195-204.

Vidal BC, Mello MLS. Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye ponceau SS to collagen fibers. *Biopolymers* 2005; 78:121-128.

Vidal BC, Volpe PLO. Differential scanning calorimetry e optical properties of collagen-dichroic azo ponceau SS complexes. *Brazilian Journal of Morphological Science* 2005; 22(3):105-111.

Vilarta R, Vidal BC. Anisotropic e biomechanical properties of tendons modified by exercise e denervation: aggregation e macromolecular order in collagen bundles. *Matrix* 1989; 9:55-61.

Vogel KG, Koob TJ. Structural specialization in tendons under compression. *International Review of Cytology* 1989; 115:267-293.

Wang JH-C. Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics* 2006; 39:1563-1582.

Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry e function. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interact* 2005; 5(1):22-34.

Tabela 1: Médias e desvios das absorvâncias (A) obtidas em cortes de tendões de frangos corados com AT, quando posicionados: paralelo (A_{par}) e perpendicular (A_{per}) ao polarizador.

Parâmetros	Controle				Experimental			
	540-550 ^a		580-590 ^a		540-550 ^a		580-590 ^a	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
A _{pa}	0,4*	0,03	0,3**	0,01	0,5*	0,02	0,4**	0,01
A _{per}	0,5	0,08	0,4**	0,02	0,6	0,05	0,5**	0,03

n= 7, dois cortes em cada lâmina.

^a comprimento de onda em nm \bar{X} média S desvio padrão

Tabela 2: Médias e seus respectivos desvios das absorvâncias (A) dos cortes dos tendões de frangos corados com ponceau SS, obtidas quando posicionados: paralelo (A_{par}) e perpendicular (A_{per}) ao polarizador.

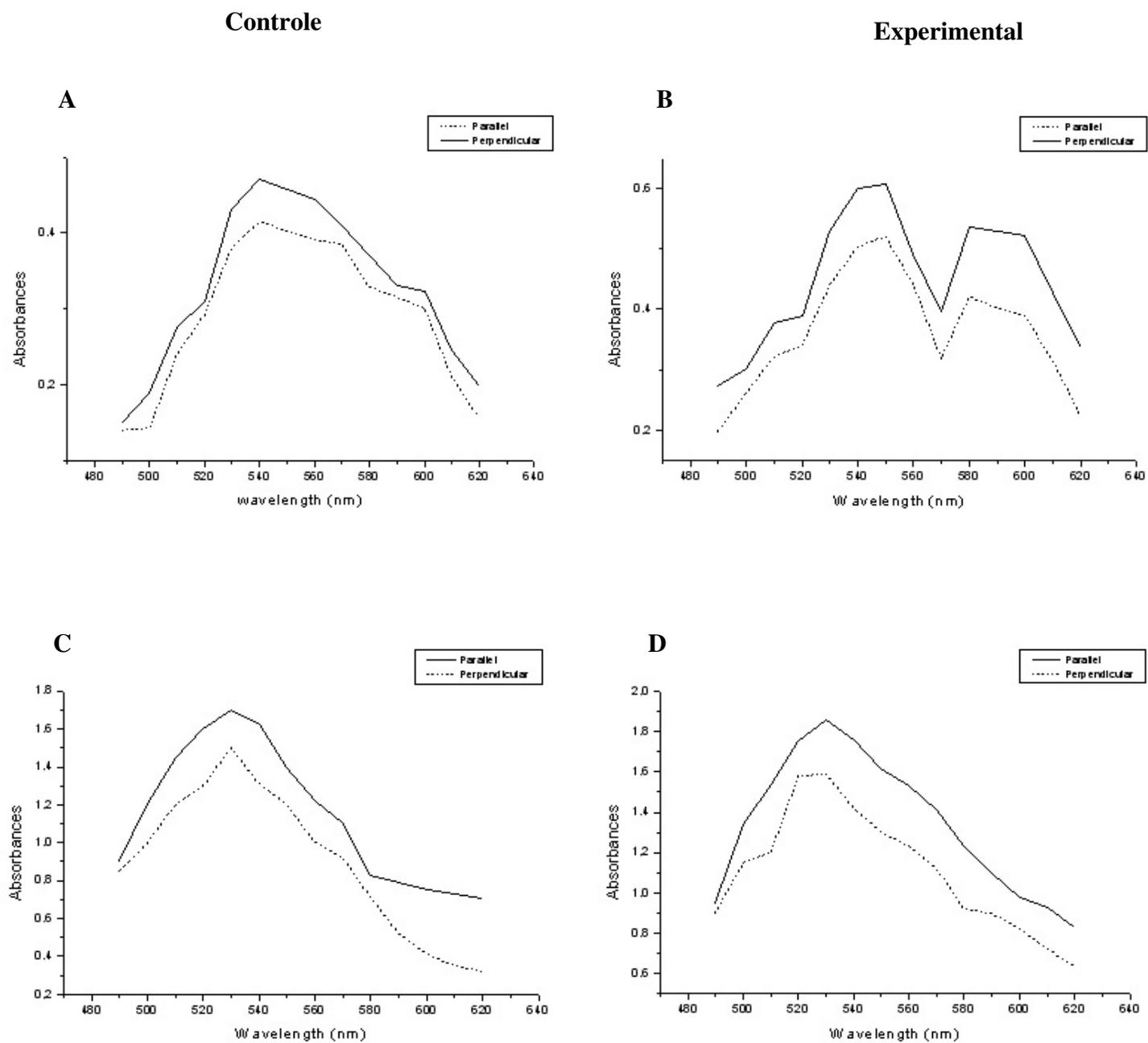
Parâmetros	Controle		Experimental	
	520-530 ^a		520-530 ^a	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S
Apar	1,5	0,02	1,9	0,03
Aper	1,3	0,01	1,6	0,01

n= 7, dois cortes em cada lâmina.

^a comprimento de onda em nm \bar{X} média S desvio padrão

Todas as médias p<0,05 (ANOVA)

Figura 2: Curvas de absorvância representativas dos cortes dos grupos controle e experimental corados com AT (A e B) e ponceau SS (C e D), respectivamente.



CONCLUSÕES GERAIS

- Os componentes não-colagênicos representam um papel fundamental na funcionalidade do tendão, ou seja, quando o mesmo é tensionado, contribuindo na manutenção e deslizamento do componente colagênico. Com isso, pode-se afirmar que a propriedade mecânica dos tendões é uma consequência da composição, organização e interação entre os componentes colagênicos e não-colagênicos.

- Diferenças quanto à organização e orientação dos componentes da MEC foram detectadas quando o tendão encontra-se em repouso e tensionado, demonstrando que esses componentes são estruturas dinâmicas, capazes de se reorganizarem durante diferentes condições fisiológicas.