## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

### **CRISTIANO PEDROZO VIEIRA**

## ESTUDO DO EFEITO DA INFLAMAÇÃO EM PATA DE RATO INDUZIDA POR CARRAGENINA SOBRE O TENDÃO FLEXOR DIGITAL PROFUNDO

Este exemp da tese de Crist	lar corres fendida	sponde à pelo(a)	redação candidato	final (a)	Disser Biolog Mestro na área
e aprovada	pela Con	nissão Ju	ilgadora.		
		P		Ø/	

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Campinas, 2011

1

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

Ve	673e	Vieira, Cristiano Pedrozo Estudo do efeito da inflamação em pata de rato induzida por carragenina sobre o tendão flexor digital profundo / Cristiano Pedrozo Vieira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.
		Orientador: Edson Rosa Pimentel. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
		<ol> <li>Tendão flexor digital profundo. 2. Matriz extracelular. 3. Inflamação. I. Pimentel, Edson Rosa, 1949 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</li> </ol>
		(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of inflammation in rat paw induced by carrageenan on the deep digital flexor tendon.

Palavras-chave em inglês: Deep digital flexor tendon; Extracellular matrix; Inflammation. Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Edson Rosa Pimentel, Silvia Borges Pimentel de Oliveira, Fernanda Martins de Almeida.

Data da defesa: 21/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 21 de fevereiro de 2011.

#### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)

Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Profa. Dra. Fernanda Martins de Almeida

Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marreto Esquisatto

unum Assinatura

Assinatura

fernanda marchins de ferreida Assinatura

Assinatura

Assinatura

3

"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com

paixão,

perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a

## quem se atreve...

A vida é muito para ser insignificante."

Charles Chaplin

# Dedicatória

À Minha Mãe

Acho que o mais difícil da minha vinda à Campinas foi a separação do colo da mamãe. Nunca nos separamos e o momento torna-se, ainda extremamente difícil. Cada ida e vinda fica um sentimento de perda, mesmo isso não sendo verdade. Hoje, a dor é menor, mas ainda está presente.

Mas como não agradecê-la? Foi ELA que me deu toda a força necessária para arriscar, tentar e conseguir. Ela sempre esteve lá, torcendo, chorando, rindo e me amando muito. Ela é única. É minha MÃE.

# Agradecimento Especial

Quem diria que aquele menino do sul chegasse em seu laboratório e te desse tanto trabalho, né? Pois é, necessito agradecer, e muito. Agradeço toda sua paciência (que foi enorme), seus ensinamentos, as criticas, sugestões, os momentos de consolo, o respeito, a sua abundante calma em conversar e me ouvir sempre, por se preocupar e mostrar total desempenho em ajudar, pela confiança e elogios. Há muitas palavras a serem ditas e pouco espaço para escrevê-las. No entanto, acredite professor, o senhor se tornou um grande amigo. Obrigado Edson Rosa Pimentel, meu orientador... muito obrigado por tudo isso, e obrigado por ser essa pessoa extremamente boa e querida por todos.

### Agradecimentos

À meus pais e minha irmã por acreditar, por sentir saudades, por chorar nas minhas vindas do Rio Grande do Sul, por rir em nossos momentos alegres, por serem especiais e por ser a minha fortaleza. Obrigado.

À Andrea Aparecida de Aro, pela amizade durante todo esse tempo, pelos ensinamentos das técnicas do laboratório, por ler e discutir meus manuscritos, pelas altas e gostosas risadas, por me incentivar a tentar de novo em vários experimentos que deram errados, pela paciência, por me ensinar a pensar como pesquisador, e por fim por ser essa pessoa especial que nunca quero perder contato.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta, pelo apoio essencial na realização dos experimentos no laboratório, pela paciência em explicar tudo mais de uma vez, por me ensinar muito, pelas risadas e conversas informais que levavam a momentos felizes.

À Profa Dra Heidi por ser minha enfermeira particular, em todos os momentos que me machucava durante a realização de experimentos e por permitir a utilização do microscópio e micrótomo.

À Flavia da Ré Guerra pela sinceridade, conversas amigas, discussões, por me acalmar em vários momentos tensos, por momentos de muitas risadas e por ser essa pessoa extremamente importante na minha vida.

Ao amigos do laboratório de Bioquímica de Matriz Extracelular.

À Liliam Panagio, pela amizade, competência, pelo auxilio em varios momentos, pela hora boa do café, pelas piadas contadas com grande habilidade e pelos momentos felizes. À Profa Dra Laurecir Gomes pela correção da introdução da dissertação, pelas críticas e sugestões.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao pessoal do laboratório de biologia reprodutiva, Karine, Marcos, Rodrigo, Cidinha, Fabricia, Juliana, Pedro.

À Barbara Hahn, pela amizade de tanto tempo, por acreditar em mim, por todo o incentivo e palavras doces.

Ao Dieison Rafael, por sempre estar comigo e ouvir meus desabafos nervosos e ter palavras pra me acalmar.

À Ricardo Mossato pelo apoio e enorme paciência em ouvir inumeras vezes sobre meus experimentos.

Aos docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofisica.

Ao Programa de Pos-Graduação de Biologia Celular e Estrutural.

À meus amigos para momentos de risos, estudos e happy hour(s), Giane, Mariane, Daniel. Juliana.

Aos membros da banca pela atenção e análise com este trabalho.

# SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Características Bioquímicas e estruturais do tendão	14
1.2 Tendão Flexor Digital Profundo	
1.3 Inflamação	
1.4 Carragenina	24
2. OBJETIVOS	26
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
4. ARTIGOS	
Artigo 1: Effect of acute inflammation induced in paw rat on the deep digital flexor tendon	
Artigo 2: Análise do tendão flexor digital profundo após 12 e 24 horas da indução de inflama	ção em
pata de rato	63
5. CONCLUSÕES	

#### **RESUMO**

Os tendões podem ser acometidos por lesões, infecções e inflamações, seguidas ou não de ruptura, podendo ser decorrentes de atividades desportivas, como exercícios e alongamentos, ou de atividades diárias de muitos trabalhadores. Em situações patológicas a matriz extracelular (MEC) do tendão passa por um processo de reorganização de seus componentes, visando à regeneração e homeostasia do tecido. A inflamação pode ser desencadeada por diferentes fatores, entre os principais causadores desse processo estão injúrias mecânicas e químicas, agentes infecciosos, queimadura, radiação e supressão de oxigênio. Pouco é conhecido na literatura sobre as possíveis alterações que a inflamação instalada em tecidos próximos pode ocasionar em tendões. Desse modo, o presente estudo teve por objetivo analisar as alterações bioquímicas e morfológicas do tendão flexor digital profundo (TFDP) após indução da inflamação aguda em pata. Os períodos de análises foram 4 horas, período em que ocorre o pico da inflamação, 12 e 24 horas. Ratos Wistar (140-160g) foram separados em três grupos experimentais: os que receberam aplicação da carragenina (1%), os que receberam NaCl (0,9%), e os que não receberam nada, sendo utilizados como controle. O TFDP foi dividido conforme suas diferentes regiões (distal, intermediária, proximal). Para análises bioquímicas, os tendões foram processados e analisados de acordo com as seguintes técnicas: SDS-PAGE, para observação do perfil de proteínas, eletroforese em gel de agarose para análise de glicosaminoglicanos sulfatados; zimografia para detecção de metaloproteínase (MMP) 2 e 9; e dosagem de proteínas não colagênicas e hidroxiprolina. Para análises morfológicas, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina, azul de toluidina e ponceau SS. De acordo com nossos resultados, no pico da inflamação aguda foi observada menor quantidade de proteínas e glicosaminoglicanos nas três regiões do TFDP dos animais tratados com carragenina. A concentração de hidroxiprolina foi maior nas duas regiões de tensão do tendão do grupo inflamado. A presença da MMP-9 foi detectada na região distal e foi evidenciado o epitendão mais espesso com células inflamatórias nas três regiões do TFDP no grupo com carragenina. Uma melhor organização dos feixes de colágeno foi observada nas duas regiões de tensão desse mesmo grupo. Após o período de pico da inflamação foi evidenciado a presença da isoforma latente e ativa da MMP-9 em 12 horas após a indução da inflamação. Houve maior quantidade de hidroxiprolina na região intermediária e proximal no grupo de 12 horas e, na região distal no grupo de 24 horas no grupo tratado com carragenina. A concentração de proteínas foi menor na região distal do grupo tratado com carragenina em 12 horas e maior em 24 horas nessa mesma região e grupo. A presença de um epitendão mais espesso com infiltrado de células foi observado nas regiões do TFDP dos animais com carragenina em 24 horas e, a organização dos feixes de colágeno foi menor na região proximal em 12 e 24 horas foram mostradas nos animais que receberam o veículo e a carragenina. Nenhuma diferença foi encontrada durante 4, 12 e 24 horas nos géis de SDS-PAGE. Nossos resultados mostram que embora o tendão não esteja inflamado, durante o pico do processo inflamatório agudo na pata de rato, alterações marcantes são evidenciadas. Contudo, podem ser ressaltados que o período posterior ao pico da inflamação também desencadeia alterações nos elementos estruturais e bioquímicos da MEC do TFDP.

#### ABSTRACT

The often affected by injuries, infections tendons are and inflammations. followed or not by rupture, which may occur during sport activities such as exercise and stretching, or during other daily activities. In pathological situations the extracellular matrix of tendons undergoes a reorganization process of their components, aimed at the improvement, regeneration and tissue homeostasis. Inflammation can be triggered by different factors, among the main causes of this process are mechanical and chemical injuries, infectious agents, burns, radiation and suppression of oxygen. Little is known in the literature on possible changes that the inflammation may trigger in near tissues where it is installed. This study aims to examine biochemically and morphologically the deep digital flexor tendon (DDFT) after induction of acute inflammation in rat paw (140-160g). The analysis was performed in the peak of inflammation (4 hours) and after that period (12 and 24 hours). Rats Wistar were divided into three groups: those who received application of (1%) carrageenan, those receiving 0.9% NaCl, and those who received nothing and were used as control. The DDFT was analyzed according to their regions (distal, intermediate and proximal). The DDFT was analyzed according to its different regions (distal, intermediate, proximal). For biochemical analysis, the tendons were processed and analyzed in accordance with the following techniques: SDS-PAGE, to observe the profile of proteins, agarose gel electrophoresis to analysis of sulfated glycosaminoglycans; zymography for detection of metalloproteinases 2 and 9, and dosage of non collagenous proteins and hydroxyproline.For morphological analysis, sections were stained with hematoxylin-eosin, toluidine blue and Ponceau SS. At the peak of acute inflammation was observed lower amount of proteins and glycosaminoglycans in the three regions of animals tendons with carrageenan. The hydroxyproline concentration was higher in the two tension regions of tendon of inflamed group. The presence of MMP-9 was detected in the distal region and was shown a thicker epitendon with inflammatory cells in the three regions of the DDFT in the group with carrageenan. Better organization of collagen bundles were observed within two regions of tension in the mentioned group. After the peak of inflammation was evidenced the presence of the latent and active isoform of the MMP-9 in 12 hours after induction of inflammation. A higher amount of hydroxyproline was detected in the intermediate and proximal region in the 12 hours and in the distal region in 24 hours in group treated with carrageenan. The protein concentration was lower in the distal region of the inflamed group at 12 hours and higher in 24 hours on the same region in the group treated with carrageenan. The presence of a thicker epitendon with cell infiltration was observed in the animals with DDFT of carrageenan animals as well as, a smaller organization of collagen bundles in the proximal region in 12 and 24 hours were shown in rats treated with vehicle and carrageenan. No difference was found for 4, 12 and 24 hours in SDS-PAGE gels. Our results show that although the tendon is not inflamed, during the peak of acute inflammation in rat paw, the most marked changes are evident. However, it can be emphasized that the period after the inflammation also triggers changes in the structural and biochemical components of the extracellular matrix of the deep digital flexor tendon.

### 1. INTRODUÇÃO

Os tendões e ligamentos são estruturas que geralmente são acometidas por diferentes patologias como lesões, infecções e inflamação, podendo desencadear ruptura ou não (MARSOLAIS *et al.* 2007, ENOCH & LEAPER 2007).

O tratamento do processo inflamatório agudo em tendão é amplamente estudado em várias pesquisas. Trabalhadores que executam movimentos repetitivos e atletas são afastados das suas atividades diárias quando apresentam tendões com inflamação (JÄRVINEM *et al.*, 2005, RUSCHEL *el al.*, 2009, DARIO *et al.*, 2010). Quando a inflamação nos tendões e ou ligamentos é detectada, o tratamento ocorre mais rápido e consequentemente a recuperação do individuo, porém, em muitos casos a inflamação não está diretamente no tendão e sim, em tecidos adjacentes. O processo inflamatório instalado em tecidos próximos aos tendões é pouco conhecido na literatura, não sabendo se esse processo pode desencadear alterações na matriz extracelular (MEC) que forma o tendão.

#### 1.1 Características bioquímicas e estruturais do tendão

Os tendões possuem variações em relação à organização, distribuição e quantidade de seus componentes, dependendo dos tipos de forças mecânicas que estejam atuando sobre ele, como já observado em tendões de bovinos (VOGEL *et al.*, 1986; EVANKO & VOGEL 1990), coelhos (GILLARD *et al.*, 1979; MERRILEES & FLINT 1980), anfíbios (CARVALHO & VIDAL, 1994; CARVALHO & FELISBINO 1999), ratos (COVIZI *et al.*, 2001), porcos (FEITOSA *et al.*, 2002 a,b; FEITOSA *et al.*, 2006) e frangos (BENEVIDES *et al.*, 2004). De acordo com a organização, quantidade e propriedades dessas macromoléculas na MEC é possível obter uma diversidade de formas adaptadas às necessidades de cada tipo de tendão (CHIQUET 1999).

Os tendões são formados por tecido conjuntivo denso, bem organizados e fibrosos, que transmitem a força gerada no músculo ao osso, tornando possível o movimento articular. A

MEC do tendão é formada por fibras de colágenos (65-80%), predominantemente colágeno tipo I (cerca de 95%) (BENJAMIN *et al.*, 2008) e podem ser encontrados o colágeno tipo II em região de compressão dos tendões, o tipo III, que está relacionado ao controle do diâmetro fibrilar e compõe fibrilas heterotípicas com os colágenos tipos I e V, o tipo VI que é encontrado na parte mediana e na entese do tendão calcanear, além dos tipos XII e XIV que participam na regulação do crescimento e associação fibrilar (BERENSON *et al.*, 1996, WAGGETT *et al.*, 1998, YOUNG *et al.*, 2000, AHTIKOSKI *et al.*, 2003).

O colágeno fibrilar possui uma estrutura longa, rígida e estável com conformação em fitatripla helicoidal, composta de três cadeias polipeptídicas em que consiste de uma sequência de aminoácido repetida de glicina, Gly-X-Y, onde X e Y podem ser quaisquer aminoácidos. Cerca de um terço das posições X são ocupadas por prolina e um número semelhante de posições Y são 4-hidroxiprolina, resultante de modificações pós-traducionais de prolina. A prolina, hidroxiprolina e glicinas encontradas na molécula de colágeno são fundamentais na estabilização da tripla hélice de colágeno (PIEZ & REDDI, 1984). Resíduos de lisina encontrados na molécula de colágeno passam por um processo de hidroxilação através da enzima Lisil-hidroxilase (CARVALHO & PIMENTEL 2007) e posterior formação do grupo aldeído pela ação da Lisil-oxidase, favorecendo a formacao de ligações cruzadas intra e intermoleculares, importantes para o aumento da capacidade das fibrilas de colágeno de resistir às forcas de tensão. Quanto maior o número de ligações cruzadas, maior será a resistência à força tensora (JAMES *et al*, 2008).

As moléculas de colágeno arranjam-se formando fibrilas, que por sua vez formarão as fibras que constituem os feixes que formam os tendões. Esse arranjo estrutural das fibrilas e associação com outros elementos da matriz são responsáveis pelas propriedades biomecânicas como flexibilidade, resistência e até mesmo certa elasticidade dos tendões (BENJAMIN *et al.*, 2008). As unidades estruturais das fibras colagênicas são ligadas dentro de feixes pelo endotendão (figura 1), que é formado por tecido conjuntivo frouxo e tem papel fundamental por possuir redes de transmissão vascular, linfático e neural (JAMES & WANG 2006, JAMES *et al.*, 2008). Os feixes de fibras formam fascículos, esses são rodeados pelo epitendão, que também possui a função de nutrir o tecido (WANG 2006).



Figura 1: Organização hierárquica da estrutura do tendão a partir da molécula de colágeno (WANG, 2006).

Os feixes de fibras de colágeno do tendão possuem um padrão ondulado chamado "crimp", este é facilmente detectado em microscopia de polarização como regiões transversais claras e escuras. O "crimp" fibrilar atua na absorção de choques durante o estresse e a deformação inicial pelos quais os feixes de colágeno são submetidos quando o tendão é alongado (FRANCHI et al., 2007).

Outro componente fibrilar encontrado na MEC, é uma pequena quantidade de fibras elásticas (~2%) (JOZSA & KANNUS 1997, AQUINO *et al.*, 2005) que se dispõem ao longo de algumas fibras de colágeno, contribuindo para a distensão inicial dos tendões quando submetidos às cargas unidirecionais durante as atividades desportivas ou diárias (AQUINO *et al.*, 2005). A maior quantidade de fibras elásticas é facilmente encontrada nas regiões fibrosas do TFDP e tendão flexor digital superficial em regiões distal e proximal e na região proximal do tendão calcanear. Entretanto na região intermediária do TFDP há um leve aumento desses elementos elásticos ao redor de suas células (COVIZI *et al.*, 2001).

A MEC do tendão também é constituída por componentes não-fibrilares como os proteoglicanos (PGs), glicoproteínas não-colagênicas e glicosaminoglicanos (GAGs) (JAMES et al., 2008). Os GAGs são cadeias polissacarídicas não ramificadas, compostas de unidades repetidas de dissacarídeo. Os PGs especialmente os de alto peso molecular encontrados em regiões em que o tendão passa junto a uma protuberância óssea ou contorna uma articulação, são responsáveis pela resistência à compressão no tecido (ALIMOHAMAD et al., 2005) e consistem de um esqueleto de proteína central e cadeias de GAG ligadas covalentemente. Regiões que suportam forças de compressão em tendão flexor digital profundo de bovino, o conteúdo de proteoglicanos é 3,5% do peso seco do tendão, predominando 68% a presença de grandes proteoglicanos. No mesmo tendão em região que suportam forças de tensão o conteúdo de proteoglicanos é cerca de 0,2-0,5% do peso seco do tendão, 90% são pequenos proteoglicanos (VOGEL & KOOB 1989, COVIZI et al., 2001, JAMES et al., 2008) O agrecam, grande proteoglicano, juntamente com a água presente no tecido, reduz a fricção, facilitando o deslizamento das fibrilas em respostas a cargas mecânicas (WANG 2006). Os PGs, devido à grande quantidade de cargas negativas, formam géis hidratados que são importantes na manutenção do espaçamento entre as fibras de colágeno, facilitando o deslizamento entre as mesmas e conferindo ao tecido a propriedade de viscoelasticidade (YANG *et al.*,2008). Os PGs de baixo peso molecular, como o fibromodulim e o decorim, estão presentes na matriz interfibrilar mantendo e regulando o diâmetro das fibrilas de colágeno, (WATANABE *et al.*, 2005) além de estarem envolvidos na modulação da MEC e no comportamento celular. Os GAGs também associam-se às proteínas fibrosas da matriz, como o colágeno, gerando estruturas supramoleculares (VIDAL & MELLO, 1984).

Proteínas não colagênicas correspondem a 0,5% do peso úmido do tendão. (FRANK *et al.*, 1987), as quais atuam entre outras funções na interação célula-matriz permitindo uma comunicação entre ambas, importante para vários processos fisiológicos. Como por exemplo, pode ser citada a tenascina-C, que contribui com a estabilidade mecânica da matriz através da interação entre as fibrilas de colágeno e a fibronectina que tem sua síntese aumentada na cicatrização e trombospondina, ambas participam também em processos de reparo e regeneração de tendão (JOZSA *et al.*, 1991, WANG 2006, JAMES *et al.*, 2008). A água representa aproximadamente 55% do peso do tendão, importante para a redução da fricção, facilitando o deslizamento das fibrilas em respostas a cargas mecânicas (JAMES *et al.*, 2008).

Entre os feixes de colágeno são encontradas células como tendinócitos com núcleos achatados e fibroblastos com núcleos alongados, que possuem papel importante na produção dos elementos da MEC (O'BRIEN, 1997, WANG 2006, BENJAMIN *et al.*, 2008). Auxiliando no estágio proliferativo e no remodelamento quando o tecido sofre injúrias como ruptura e processos inflamatórios. A quantidade de células presentes nos tendões e a espessura dos feixes de fibras de colágeno variam de acordo com a idade, sendo que tendões de animais adultos têm feixes de colágeno mais compactos e menor número de células, enquanto que animais mais jovens apresentam grande celularidade e feixes de fibras mais finos (VIDAL & CARVALHO, 1990). Fibroblastos e os componentes da MEC formam uma interação célulamatriz que permite que as células detectem e respondam a estímulos mecânicos. Em geral, fibroblastos através de receptores de superfície celular interagem ao citoesqueleto intracelular com a matriz permitindo que sinais mecânicos possam ser desencadeados, quando necessários (CHIQUET 2004, FRANCHI *et al.*, 2007).

Os tendões possuem uma vascularização relativamente limitada. A área ocupada por vasos sanguíneos representa 1-2% de toda a MEC, provenientes principalmente do epitendão (KJAER, 2004). Em regiões onde os tendões recobrem superfícies ósseas há uma diminuição

ainda maior do suprimento sanguineo, e essa característica pode ter uma relação direta com as forças de compressão aplicadas nestas regiões (BENJAMIN *et al.*, 2008).

A integridade da matriz envolve a síntese e degradação dos componentes da MEC, seja colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). As enzimas proteolíticas essenciais para a degradação e remodelamento tecidual são endopeptidases dependentes de cálcio (Ca<sup>++</sup>) ou zinco (Zn<sup>++</sup>) chamadas metaloproteinases (MMPs) que desempenham um importante papel na degradação e remodelamento da MEC. A família das MMPs compreende pelo menos 23 membros nos seres humanos que são reguladas ao nível de transcrição gênica e ativação enzimática por inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMP). Em condições normais, as MMPs estão presentes em níveis baixos, geralmente em forma latente, e são ativadas para manter o remodelamento fisiológico do tecido. Esses elementos são os grandes responsáveis pela homeostasia do tecido após uma condição patológica ou remodelamento de matriz (PARKS *et al.*, 2004; CLUTTERBUCK 2010).

#### 1.2 Tendão Flexor Digital Profundo

O tendão flexor digital profundo tem origem no músculo flexor digitorum profundus. Sua porção intermediária passa pelo sulco do maléolo medial deslizando sobre ele quando o músculo se contrai. A porção distal se divide em 5 tendões que se estendem para os dígitos (figura 2B, C, E, F)

Esse tendão é considerado "wrap around" por estar próximo a polias ósseas e receber diferentes forças ao longo de sua extensão (COVIZI *et al.*, 2001; FEITOSA *et al.*, 2006). Esse tendão, devido a suas características bioquímicas e estruturais, é dividido em três regiões: região distal que recebe forças de tensão e um pouco de força de compressão, região intermediária que recebe forças de compressão estando em contato direto com o osso calcâneo, e região proximal que é submetida predominantemente a forças de tensão (figura 3) (VOGEL & KOOB 1989; SOEJIMA *et al.*, 2003).

A manutenção em forma de rede dos feixes de colágeno da região intermediária está ligada com a continuidade do estímulo compressivo, entretanto nas regiões de tensão, o colágeno forma feixes alinhados (VOGEL & KOOB 1989; COVIZI et al., 2001, JAMES *et al.*, 2008). Morfologicamente, os fibroblastos na região de tensão se dispõem ao longo das fibras de colágeno, na região de compressão apresentam células tipo condrócitos.



Figura 2: Localização anatômica do tendão flexor digital profundo (TFDP) e tecidos próximos como o tendão calcâneo (TC), osso calcanear (OC), tendão superficial (TFS). O TFDP dos ratos utilizados mede 3,5 cm de comprimento. Em A e D: pata de rato com vista lateral e posterior (VIEIRA, 2011)



Figura 3. Tendão Flexor Digital Profundo dividido nas três regiões: Distal ( D), Intermediaria (I) e Proximal (P) ( VIEIRA 2011).

#### 1.3 Inflamação

O tendão pode passar por um processo inflamatório oriundo de esforços repetitivos, alongamentos excessivos, e ou tendinopatias. Em geral, a inflamação pode ser causada por diferentes fatores, tais como, injúrias mecânicas e químicas, agentes infecciosos, queimadura, radiação, supressão de oxigênio, entre outras causas (RANKIN 2004; SHÖNBEIN-SCHIMID 2006; ALLER et al., 2006). Em situações como essas, o tecido passa por um processo de reorganização de sua matriz extracelular visando à regeneração e melhoria funcional. A inflamação é uma resposta normal do tecido a injúria ou infecção, que tem por finalidade restabelecer a normalidade do tecido. Atuando através de seus mediadores e células Os mediadores inflamatórios são os responsáveis pela atração de células inflamatórias. inflamatórias que por sua vez são os responsáveis pela liberação de novos mediadores. Os mediadores inflamatórios apresentam estrutura variada assim como as funções (SHERWOOD & KINSKY 2004, ALLER et al., 2006). As citocinas são conhecidas amplamente por serem moléculas de comunicação, o que permite a interação de células do sistema imune com outras células. Há mediadores lipídicos, que são sintetizados a partir de células que são lesadas e secretam a fosfolipase, responsável pela destruição das membranas. Nesse processo ocorre produção de tais mediadores lipídicos, cujos maiores representantes estão as prostaglandinas, que junto com outro grupo de mediadores inflamatório das aminas, como exemplo a bradicinina, atravessam veias e artérias da região lesada atuando como vasodilatadoras para a chegada rápida dos glóbulos brancos. Na realidade, são elas que ampliam o calibre dos vasos próximos a lesão, permitindo que a circulação se intensifique e dessa maneira o rubor característico da inflamação apareça. Interleucinas e prostaglandina são responsáveis por amplificar a sensação dolorosa ao cérebro. Leucócitos polimorfonucleares e os monócitos, que fora da corrente sanguínea se caracterizam como macrófagos, são os dois elementos responsáveis por degradação de patógenos e células mortas no local através da fagocitose, secreção de enzimas como colagenase e gelatinases, que visam degradar e reestruturar um novo tecido (WHITE 1999, TRACEY, 2002, SHERWOOD & KINSKY 2004, ALLER et al., 2006, EMING 2007).

A inflamação aguda é caracterizada por ter curta duração, cerca de horas ou dias sendo fundamentalmente benéfica para o organismo, contudo quando ocorre uma inflamação severa essa se torna extremamente perigosa. A inflamação aguda apresenta alguns sintomas clássicos que caracterizam o processo, como dor, rubor no local da injúria, seguida ou não de febre. Outro sintoma bastante característico é o edema, que é um fluxo transvascular de fluido rico em proteínas do compartimento intravascular no interstício como um resultado de ações da histamina, bradicinina, leucotrienes, componentes complementares, substância P e fator de ativação plaquetário (PAF). Esses fatores são os responsáveis por alterar a função de barreiras de pequenos vasos sanguíneos e com isso aumentar a permeabilidade de capilares e vênulas com água e proteínas (RANKIN 2004, SHERWOOD & KINSKY 2004, SHÖNBEIN-SCHIMID 2006, ALLER et al., 2006).

Quanto mais mediadores ativados mais leucócitos são recrutados. Esses mediadores podem ser ativados com o próprio contato com o patógeno, por substâncias tóxicas ou por células danificadas, como é o caso de traumas, esforços físicos exagerados e repetitivos (SHÖNBEIN-SCHIMID 2006). O processo inflamatório é uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado se tornando uma resposta de proteção cuja finalidade é se livrar do organismo causador da lesão celular (microorganismo, toxina) e das consequências dessa lesão, como células e tecidos necróticos (SHERWOOD & KINSKY 2004)

Quando desencadeado o processo inflamatório sobre tendão, uma cascata de acontecimentos contribui para reorganização de sua MEC e consequente melhoria do tecido lesionado. Dentre as enzimas, destacam-se a MMP-9, característica de processos inflamatórios e a MMP-2 de processos de remodelamento da MEC, ambas presentes durante processos de reorganização da matriz, além da liberação de quimioatraentes, infiltração de células inflamatórias, fatores de crescimentos tais como TGF- $\beta$  envolvido com a nova formação da MEC pelos fibroblastos (PARK *et al.*, 2004; CLUTTERBUCK 2010).

#### 1.4 Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído de diferentes espécies de Rhodophyta: *Chondrus crispus*, ou *Gigartina*, *Eucheuma* e *Hypnea* encontrada ao longo das áreas rochosas da costa do Atlântico das Ilhas Britânicas, da Europa, e America do Norte. A palavra carragenina é derivada do nome Irlandês coloquial para esta alga, "carrageen", que quer dizer pequena rocha. Todas as algas que produzem carragenina como principal material da parede celular pertencem a *Rhodophyta*, porém pouca informação é encontrada sobre a biossíntese da carragenina e a genética da parede celular dessas algas. Estruturalmente, a carragenina é um grupo complexo de polissacarídeos formada de repetidos monômeros de galactose que apresentam grupos sulfatos. (MORRIS 2003, CAMPO *et al.*, 2009)

Há tradicionalmente seis formas básicas desses polissacarídeos: carragenina Iota (1)-, Kappa ( $\kappa$ )-, Lambda ( $\lambda$ )-, Mu ( $\mu$ )- , Nu ( $\nu$ ), e Theta ( $\theta$ ). Essa nomenclatura é relevante por sua classificação química e produção comercial, a partir de diferentes subtipos de carragenina que são extraídos de distintas algas. A carragenina- $\kappa$  é produzida a partir da extração da alga *Eucheuma cottoni* (RUDOLPH 2000), sendo a *Eucheuma denticulatum* é a principal fonte da carragenina- $\iota$ . As algas são usualmente extraídas com solução alcalina em altas temperaturas para transformar os precursores biológicos carragenina  $\mu$  e  $\nu$  para carragenina  $\kappa$  e  $\iota$ . A Carragenina  $\lambda$  é obtida de diferentes espécies do gênero *Chondrus* (CAMPO *et al.*, 2009).

A carragenina  $\lambda$  é geralmente usada como agente de indução e estudo do processo inflamatório. (TILLANDER *et al.*, 2001, MORRIS 2003, VADIVELAN *et al.*, 2007). O modelo precursor foi realizado por Winter e colaboradores (1962) e, posteriormente foi aceito ser o melhor modelo para indução da inflamação aguda em pata de rato. Os sinais cardinais da inflamação são o edema, hiperalgesia e eritema, que desenvolvem imediatamente após a aplicação. Atualmente são aceitas três fases da inflamação induzida por carragenina em pata de rato. A primeira fase que ocorre na 1<sup>a</sup> hora e é mediada pela histamina e 5-hidroxitriptamina, que é seguida pela segunda fase mediada por cininas, notavelmente pela bradicinina, essa fase ocorre entre a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> hora. A última fase é atribuída à produção de prostaglandinas, especialmente prostaglandina E. Os precursores de ambas prostaglandinas e tromboxanos é PGH2, derivado do ácido araquidônico pela ação da ciclooxygenase. A inibição dessa enzima é à base de medicamentos para dor e inflamação (DI ROSA 1972, MORRIS 2003, CICALA *et al.*, 2007).

É conhecido que a carragenina possui seu pico da inflamação aguda em 4 horas pósaplicação. Nesse período é quando o edema está mais acentuado e ocorre maior migração celular (MORRIS 2003, CICALA *et al.*, 2007). Após esse período ocorre uma diminuição no edema, e a migração celular diminui consideravelmente. Com este modelo de inflamação pode-se avaliar as várias etapas que ocorrem no processo inflamatório, seus mediadores e células envolvidos, além de testar novas drogas para futuros tratamentos da inflamação.



Figura 4: Representação esquemática das diferentes estruturas dímeras repetitivas da carragenina e estruturas relacionadas (CAMPO *et al.*, 2009)

### 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar aspectos bioquímicos e estruturais do tendão flexor digital profundo após indução da inflamação aguda na pata de rato

Objetivos específicos:

1. Quantificar proteínas, glicosaminoglicanos, hidroxiprolina nos diferentes grupos experimentais.

2. Analisar a atividade enzimática das metaloproteinases.

3. Analisar em gel de SDS-poliacrilamida, o perfil de proteínas da matriz extracelular do tendão flexor digital profundo dos grupos experimentais.

4. Analisar em gel de agarose a presença de heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato do tendão dos grupos experimentais.

5. Analisar aspectos morfológicos, dos tendões dos animais com pata inflamada, em 4, 12 e 24 horas.

6. Verificar possíveis alterações na organização das moléculas de colágeno dos tendões dos diferentes grupos experimentais.

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHTIKOSKI AM, KOSKINEM SOA, VIRTANEM P, KOVANEM V, RISTELI J, TAKALA TES. Type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, 177: 473-481, 2003

ALLER AM, ARIAS JL, PATÁN FS, ARIAS J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Med Sci Monit.** 12: 225-234, 2006.

ALIMOHAMAD H, HABIJANAC T, LARJAVA H, HÄKKINEN L. Colocalization of the collagen-binding proteoglycans decorin, biglycan, fibromodulin and lumican with different cells in human gingiva. **J Periodontal Res**. 40(1): 73: 86, 2005.

AQUINO CF, VIANA SO, FONSECA ST. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e à imobilização. **Fisioterapia em Movimento**. Curitiba, 18(2): 35-43, 2005.

BENEVIDES GP, PIMENTEL ER, YOYAMA MH, NOVELLO JC, MARANGONI S, GOMES L. Biochemical and biomechanical analysis of tendon of caged and penned chickens. **Connect Tissue Res**. 45: 206-215, 2004.

BENJAMIN M, KAISER E, MILZ S. Structure-function relationships in tendons: a review. J Anat. 212: 211-228, 2008.

BERENSON MC, BLEVINS FT, PLASS AHK, VOGEL KG. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. **J Orthop Res**.14: 518-525, 1996.

CAMPO VL, KAWANO DF, DA SILVA JR DB, CARVALHO I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - a review. **Carbohydrate Polymers**. 77: 167-180, 2009.

CARVALHO HF, FELISBINO SL. The development of the pressure-bearing tendon of the bullfrog, Rana catesbeiana. **Anat Embryol**. 200: 55-64, 1999.

CARVALHO HF, RECCO-PIMENTEL SM, VEIGA- MENONCELLO, ACP. A célula. 2 ed. São Paulo: Manole, 1-380, 2007.

CARVALHO HF, VIDAL BC. The unique fibrillar arrangement of the bullfrog pressurebearing tendon as an indicative of great functional deformability. **Biol. Cell.** 82: 59-65, 1994.

CHIQUET M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. **Matrix Biol**. 18: 417-426, 1999.

CHIQUET-EHRISMAN R, TUCKER RP. Conective tissues: signalling by tenascins. In: J Biochem Cell Biol 36:1085-1089, 2004.

CICALA C, MORELLO S, ALFIERI A, VELLESCO V, MARZOCCO S, AUTORES G. Haemostatic imbalance following carrageenan-induced rat paw oedema. **European J of Pharmac.** 577: 156-161, 2007.

CLUTTERBUCK AL, HARRIS P, ALLAWAY D, MOBASHERI A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal** 183: 27-38, 2010.

COVIZI DZ, FELISBINO SL, GOMES L, PIMENTEL ER and CARVALHO HF. Regional adaptations in three rat tendons. **Tissue&Cell**, 33(5): 483-490, 2001.

DARIO BES, BARQUILHA G, MARQUES RM. Lesões esportivas: um estudo com atletas de basquetebol Bauruense. **Rev. Bras. Cienc. Esporte**. 31(3): 205-215, 2010.

DI ROSA M. Biological properties of carrageenan. J Pharm Pharmac. 24: 89-102, 1972.

EMING SA, KRIEG T, DAVIDSON JM. Inflammation in wound repair: Moleclular and Cellular Mechanisms. **J of Investigative Dermatology.** 127: 514-525, 2007.

ENOCH S, LEAPER DJ. Basic science of wound healing. Surgery 26: 32-36, 2007.

EVANKO SP, VOGEL KG. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. **Matrix**. 10: 420-36, 1990.

FEITOSA VL, ESQUISATTO MA, JOAZEIRO PP, GOMES L, FELISBINO SL, PIMENTEL ER. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. **Cell Mol Biol**. 48: 359-367, 2002 a.

FEITOSA VL, REIS FP, ESQUISATTO MAM, JOAZEIRO PP, VIDAL BC, PIMENTEL ER. Comparative ultrastructural analysis of different regions of two digital flexor tendon of pigs. **Micron**. 37: 518-525, 2006,

FEITOSA VL, VIDAL BC, PIMENTEL ER. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. J. Anat. 200: 105-111, 2002 b.

FRANCHI M, TRIRÉ A, QUARANTA M, ORSINI E, OTTANI V. Collagen scruture of tendon relates to function. **The Scientific World Journal** 7: 404-420, 2007.

FRANK C, WOO S, ANDRIACCHI T, BRAND R, OAKES B, DAHNERS L, DEHAVEN K, LEWIS J, SABISTON P. 1987. Normal ligament: structure, function and composition. In: Injury and repair of musculoskeletal soft tissues. Ed. by Woo, S.L.Y. and Buckwalter, J. A, **Am Acad Orthop Surg**, Park Ridge, Illiois, 45-101, 1987.

GILLARD GC, REILLY HC, BELL-BOOTH PG, FLINT MH. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. **Connect Tissue Res**. 7: 37-46, 1979.

GONZÁLEZ A, LÓPES B, QUEREJETA R, DÍEZ J. Regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in hypertension heart disease? J Mol Cell Cardiol 34: 1585-1593, 2002.

JAMES R, KESTURU G, BALIAN G, CHHABRA B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repairs, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. **J Hand Surg**. 33A: 102-112, 2008.

JAMES H, WANG C. Mechanobiology of tendon. Journal of Biomechanics. 39: 1563-1582, 2006.

JÄRVINEM TAH, KANNUS P, MAFFULLI N, KHAN KM, Achilles tendon disorders: etioloy and epidemiology. **Foot Ankle Clin N Am**. 10: 255-266, 2005.

JOZSA L & KANNUS P. Human tendons. Champaign, IL: Human Kinetics. 1-576, 1997.

JOZSA L, KANNUS P, BALINT BJ and REFFY A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. Acta Anat, 142: 306-312, 1991.

KJAER M, Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Phsysiol Rev** 84: 649-698, 2004.

MARSOLAIS D, DUCHESME E, CÔTE CH, FRENETTE J. Inflammatory cells do not decrease the ultimate tensile strength of intact tendons in vivo and in vitro: protective role of mechanical loading. **J Apply Physiol** 102: 11-17, 2007.

MERRILEES MJ, FLINT MH. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. **Am J Anat**. 157: 87-106, 1980.

O'BRIEN M. Structure and metabolism of tendons. Scand J Med Sci Sports 7: 55–61 1997.

MORRIS CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol.** 225: 115-121, 2003.

PARKS WC, WILSON CL, LÓPEZ-BOADO YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate imunity. **Nature Reviews: Immunology**. 4: 617-629, 2004.

PIEZ KA & REDDI AH. Extracellular matrix biochemistry. New York: Elsevier, 1984.

RANKIN JA. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical Issues** 15: 3-17, 2004.

RUSCHEL C, MENEZES FS, HAUPENTHAL A, HUBERT M, SCHUTZ GR, CERUTTI PR, PEREIRA SM, ROESLER H. Incidência de lesões em velejadores brasileiros de diferentes níveis técnicos. **Rev Bras Med Esporte**. 15(4): - Jul/Ago, 2009.

RUDOLPH B. Seaweed product: Red algae of economic significance. In R.E. Martin, E. P. Carter, L. M. Davis, & G. J. Flich (Eds.), **Marine and freshwater products handbook** 515–529, 2000.

SHERWOOD ER, TOLIVER-KINSKY T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology** 18: 385-405, 2004.

SHÖNBEIN-SCHMID GW. Analysis of Inflammation. The Annual review of Biomedical Engineering. 8: 93-151, 2006.

SOEJIMA O, DIAO E, LOTZ JL, HARIHAN JS, NAITO M. Dorsal and palmar material properties of the adult human flexor profundus tendon in zone II. **Hand Surg**. 8: 53-58, 2003.

TILLANDER B, FRANZEN LE, NILSON E, NORLIN R. Carrageenan-induced subacromial bursitis caused changes in the rat's rotattor cuff. **J of Orthopaedic** 19: 441-447, 2001.

TRACEY KJ. The inflammatory reflex. Nature. 420: 19-26, 2002.

VADIVELAN S, SINHA BN, KALYAN SB, CHRISTINA AJM, RAKESH NP. Antiinflammatory activity of Spermacoce articularis Linn on Carrageenan induced paw edema in wistar male rats. **Pharmacologyonline** 3: 478-484, 2007.

VIDAL BC & CARVALHO H.F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. **Matrix**, 10: 48-57, 1990.

VIDAL BC & MELLO MLS. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. **Cellular Mol Biol**, 30: 195-204, 1984.

VOGEL KG, KELLER EJ, LENHOFF RJ, CAMPBELL KTJ Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. **Eur J Cell Biol**.41: 102-112, 1986.

VOGEL KG & KOOB TJ. Structural specialization in tendon under compression. Int **Rev Cytol**. 115: 267-293, 1989.

WAGGETT KG, RALPHS JR, KWAN APL, WOODNUTT D, BENJAMIN M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. **Matrix Biol**, 16: 457-470, 1998.

WANG JHC. Mechanobiology of tendon. J of Biomechanics. 39: 1563-1582, 2006.

WATANABE T, HOSAKA Y, YAMAMOTO E, UEDA H, SUGAWARA K, TAKAHASHI H, TAKEHANA K. Control of the collagen fibril diameter in the equine superficial digital flexor tendon in horses by decorin. **J Vet Med Sci**. 67(9): 855-860, 2005.

WHITE M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. J Allergy Clin Immunol. 103: 378-381, 1999.

WINTER CA, RISLEY EA, NUSS GW. Carrageenin – induced edema in hind paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Proc Soc exp Biol. Med.** 111: 544-547, 1962.

YANG L, van der WERF KO, FITIÉ CF, BENNINK ML, DIJKSTRA PJ, FEIJEN J. Mechanical properties of native and cross-linked type I collagen fibrils. **Biophys J**. 94(6): 2204-11, 2008.

YOUNG BB, GORDON MK, BIRK DE. Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: Association with assembly and growth of collagen fibrils. **Dev. Dyn**. 217: 430-439, 2000.

## ARTIGOS

**Artigo 1:** Effect of acute inflammation induced in rat paw o the deep digital flexor digital tendon.

Artigo 2: Análise do tendão flexor digital profundo após 12 e 24 horas de indução da inflamação em pata de rato.

## EFFECT OF ACUTE INFLAMMATION INDUCED IN RAT PAW ON THE DEEP DIGITAL FLEXOR TENDON

Vieira, C.P.<sup>1</sup>; Aro, A. A.<sup>1</sup>; Almeida, M.S.<sup>1</sup>; Mello, G.C.<sup>2</sup>; Antunes E.<sup>2</sup>; Pimentel, E.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophyisics, Institute of Biology, UNICAMP. <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP

**Keywords**: deep digital flexor tendon, acute inflammation, extracellular matrix, carrageenan, rat.

Contact Author: Dr. Edson Rosa Pimentel Department of Cell Biology Institute of Biology CP 6109, State University of Campinas - UNICAMP 13083-863 Campinas, SP, Brazil. e-mail: <u>pimentel@unicamp.br</u> Telephone: 0055-19-35216117 Phone/Fax: 0055-19-35216111

#### Abstract

The tendon is generally affected by inflammation, in such situations, the tissue undergoes a process of reorganization of the extracellular matrix aiming at the improvement and regeneration. Little is known in the literature about possible changes that might trigger inflammation in surrounding tissues to which it is installed. The objective of this study was to analyze biochemically and morphologically the deep digital flexor tendon (DDFT) at the peak of acute inflammation in rat paw. Wistar rats were divided into three groups: those that received injection of 1% carrageenan, those that received 0.9% NaCl and those that received nothing. The DDFT was divided into distal, proximal and intermediate regions. For biochemical analysis, the tendons were treated with 4M guanidine hydrochloride and analyzed by SDS-PAGE. Proteins, glycosaminoglycans and hydroxyproline were quantified and MMPs were analyzed by zymography. The GAGs were analyzed by agarose gel. For morphological analysis, sections were stained with haematoxylin-eosin, toluidine blue and Ponceau SS. The content of proteins and glycosaminoglycans was smaller in the group receiving the application of carrageenan. The hydroxyproline concentration was higher in the two tension regions of the inflammation group when compared to the control. The presence of MMP-9 was detected in the distal region and a thicker epitendon with inflammatory cells was observed in groups with inflamed paws, while a better organization of collagen bundles was observed in two tension regions of that same group. Our results show that although the tendon is not inflamed, changes in the structural and biochemical parameters were observed.

**Keywords**: deep digital flexor tendon, acute inflammation, extracellular matrix, carrageenan, rat.
# **INTRODUCTION**

The deep digital flexor tendon is a dense connective tissue that is considered a "wrap around" tendon for being close to pulley bones, which receives different forces according to its extension. This tendon due to its biochemical and structural characteristics was divided into three regions: distal region that receives tension and compression forces, intermediate region which is wrapped around bony pulleys and receives compressive forces and the proximal region that is subjected mainly to tensile forces (Fig. 1) (Vogel and Koob 1989; Soejima et al. 2003). The tendon is formed by collagen fibers (65-80%), predominantly type I collagen (about 95%) (Benjamin et al, 2008), but also types II, III, V, VI, IX, XI (Berenson et al, 1996, Waggett et al, 1998, Young et al, 2000). Proteoglycans and non-collagenous proteins also comprise the extracellular matrix of this tissue (Benjamin et al, 2008). Tenascin, fibronectin, thrombospondin-1 are some of the proteins found in tendons (Jozsa & Kannus 1997). Elastic fibers are found in the distal and proximal regions of this tendon, and there are elastic elements around cells in the intermediate region, which are important for the performance of its function (Covizi et al, 2001). These regions are biochemically distinct and can vary in quantity and arrangement of extracellular matrix components. In regions where the tendon is under tensile forces, the presence of small proteoglycans is outstanding, close to 90% of the total, whereas in the region of compression the presence of large proteoglycans corresponds to about 68%. Aggrecan, large proteoglycan, along with the water present in the tissue, reduces friction, facilitating the sliding of the fibrils in responses to mechanical loads (Vogel et al, 1994). The proteolgycans are composed of glycosaminoglycan chains attached to core protein, and are responsible to resistance to compression due to their high negative charge (Feitosa et al, 2006, Yang et al, 2008).

The maintenance in the organization of collagen bundles in several directions of the intermediate region, depends on the continued compressive stimulation. In regions of tension, collagen forms aligned bundles to support unidirectional forces (Vogel and Koob, 1989;

Covizi 2001, James et al. 2008). The collagen fibers are surrounded by epitendon, that with their blood vessels, has an important role in supplying the tissue with nutrients.

The components of the extracellular matrix allow the tissue to resist and transmit the forces exerted by muscles to the bone. Fibroblasts have an important role in the production of extracellular matrix elements such as proteoglycans, non-collagenous proteins, collagen, elastin and glycosaminoglycans. Morphologically, fibroblasts in the tension region are arranged along the collagen fibers and there are chondrocyte-like cells in the region of compression. Fibroblasts assists in the proliferative and remodeling stage when tissue undergoes injuries ruptures and inflammatory processes( as Sharma and Maffulli 2005). In the extracellular matrix, enzymes called metalloproteinases (MMP) and their inhibitors (TIMP) have the function to degrade and inhibit degradation, respectively. These elements are largely responsible for homeostasis of the tissue where occur processes of matrix remodeling (Parks et al, 2004; Clutterbuck 2010).

The tendon is generally affected by injury, fatigue and inflammation, which may be followed or not by rupture. In such situations, the tissue undergoes a process of reorganization of the extracellular matrix aiming at the improvement and regeneration. Inflammation can be triggered by different factors such as chemical and mechanical injury, infectious agents, burns, radiation, supression of oxygen, among other causes (Rankin 2004; Shönbein-Schmid 2006; Aller et al. 2006). Inflammation is a normal response to tissue injury or infection, which aims to reestablish the normal tissue. The inflammatory process acts directly through its mediators and inflammatory cells. Inflammatory mediators are triggered by different factors and are responsible for the migration of different cells to the injury site. Symptoms such as pain, redness and swelling at the site, followed by fever or not, are characteristics of the inflammatory process (Sherwood and Kinsky 2004)

In many cases the inflammation is not directly on the tendon, but in tissues next to it. However, little is known whether the inflammatory process in tissues close to the tendons can initiate changes in their extracellular matrix. Our study aims to analyze the peak of acute inflammation in the paw and the possible changes that may occur in the extracellular matrix of the deep digital flexor tendon.

# MATERIAL AND METHODS

#### **Experimental Groups**

A total of 72 Wistar male rats of 140-160g, were kept with free access to water and food. The rats were divided into 3 groups: animals that received subcutaneous injection of 1% carrageenan type IV (Sigma, cod 22039) (0.1 ml) dissolved in saline (Winter et al 1962); animals that received saline solution or vehicle (NaCl 0.9%) and animals that received no application in the right paw. After 4 hours of application, the animals were sacrificed by overdose of inhalation anesthesia with isoflurane (Forame), and the tendons were removed for morphological and biochemical analysis.

#### **Edema Measurement**

The paw volume was measured using hydropletysmometer (UgoBasile, VA) at time zero and at each interval of time up to the 4<sup>th</sup> hour after application of carrageenan and saline. Changes in volume of water in the tubes were performed as described by Morris (2003).

#### Extraction of components of extracellular matrix

The deep digital flexor tendon (DDFT) was removed from the right paw of animals of different groups and divided into three regions: distal, intermediate and proximal. The regions were analyzed individually. The tendons were properly washed with PBS (0.15M NaCl– 5mM sodium phosphate buffer pH7.4 with 50mM EDTA). The tissue fragments were cut into small pieces and immersed in 50 volumes of 4M Guanidine hydrochloride containing 0.05 M EDTA and 1 mM PMSF in 0.05 M acetate buffer pH 5.8, according to the method of Heinergard and Sommarin (1987). The extraction lasted for 24 hours at 4°C followed by centrifugation at 27,000×g for 50 min. The supernatant was used for biochemical analysis.

#### **Electrophoresis in agarose gel**

The fragments of the regions of the tendons were dehydrated and sulfated glycosaminoglycans released from proteoglycans by digestion with papain solution (40mg/g of dry tissue) containing 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, 40 mm EDTA and 80mM  $\beta$ -mercaptoethanol (Harab & Morão 1989). The papain was stopped by the addition of 4 mM iodoacetic acid for 1 hour. The sulfated glycosaminoglycans (GAGs) were precipitated in ethanol and separated by electrophoresis on agarose gel (0.6%) in 0.05 M propylenediamine (PDA) according to Dietrich & Dietrich (1976)

## **Quantification of Hydroxyproline**

The fragments of the three regions of the DDFT were immersed in acetone for 48 hours and chloroform:ethanol (2:1) for 48 hours. Thereafter, the fragments were hydrolyzed with 6N HCl (1mL/10mg tissue) for 16 hours at 110°C. The hydrolyzate was neutralized with 6N 1.41% NaOH and treated with solution of chloramine Т and 15% pdimethylaminobenzaldehyde as described by Stegemann and Stalder (1967). Subsequently, the samples were incubated for 15 min at 60°C. The solution was cooled to reach room temperature and absorbance was read at 550nm using Diode Array spectrophotometer, Model 8452A from Hewlett Packard.

#### Quantification of proteins and sulfated glycosaminoglycans

Samples of guanidinium chloride extracts collected from the experimental groups were used to quantify protein according to the method of Bradford (1976). Bovine serum albumin was employed as standard. Samples digested by papain solution were used to quantify the GAGs of the experimental groups. The quantification was determined using the dimethylmethylene blue (DMMB) method (Farndale et al. 1986), considering chondroitin sulfate as standard. The absorbance measured was in 595nm for proteins and 540nm for glycosaminoglycans. The reading of the samples was in Asys Expert Plus Microplate Reader.

# Zymography of gelatinases

The tendons were treated according to Marquet et al. (2006). The fragments from each region of the DDFT were immersed in a solution of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.1% Triton and a protease inhibitor cocktail of 1% (Sigma P8340) for protein extraction at 4°C for 2 hours. After the first extraction, samples were incubated and added 1/3 the volume of the solution described above, at 60°C for 5 minutes. Then, 20µg of protein were applied on the gel. The 10% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin was run at 4°C and, after the end of electrophoresis, the gel was washed with 2.5% Triton X-100 and incubated for 21 hours in the solution of 50mM Tris-HCL (pH 7.4), 0.1M NaCl and 0.03% sodium azide at 37°C. The gel was stained with coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) for 1 hour. Thereafter, the gels were washed with a solution containing 50% methanol and 10% acetic acid in order to observe negative bands of proteins corresponding to enzymatic activity. As a positive control, 20 mM EDTA was used in the incubation buffer, which inhibits the activity of gelatinase, confirming the identification of MMPs in the gels. The bands in negative image were quantified by densitometry using Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, USA).

## Light microscopy analysis

The tendons were fixed in a solution containing 4% formaldehyde in Millonig buffer (0.13 M sodium phosphate, NaH 0.1 M - pH 7.4) for 24 hours at room temperature. After tendons were washed for 6 hours in tap water, dehydrated with a sequence of increasing ethanol, diaphanized with xylene and embedded in paraffin (Histosec, Merck), according to Neto et al. (2003). Longitudinal serial sections of 7µm were made for microscopic analysis. In order visualize the overall structure of the tissue, some sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and other with toluidine blue (TB) (0.025%) in McIlvaine buffer (0.03 M citric acid, 0.04 M sodium phosphate dibasic - pH 4.0). For observation of collagen fibers, the sections were stained with 0.025% Ponceau SS and 2% acetic acid for 1.5 minutes and linear dichroism was

observed in polarization microscope (Vidal and Mello, 2005). Sections stained with HE and TB were observed on light microscope Olympus BX 60.

# Statistical analysis

Data were presented as mean  $\pm$  SEM of results obtained by a number of five animals per group. After data collection, a statistical analysis were carried out by the one-way analysis of variance (ANOVA), with Tukey post-test, considering p<0.05 and using the statistical program GraphPad Prism®, version 3.0.

# Results

The different regions of the DDFT were analyzed individually and characterized by biochemical and morphological analyses. For analysis of the inflammatory process, the paw edema was measured. The swelling was higher 3 hours after the application of the inflammatory agent. However, it was reduced after 4 hours since the carrageenan aplication. In the group that was administered only the vehicle, there was a small swelling at the 1<sup>st</sup> hour, but it disappear by the 4<sup>th</sup> hour. The paws of the control group and contralaterals of the vehicle and carrageenan groups were measured and showed no edema (Fig. 2).

Regarding to the amount of non-collagenous proteins, it was possible to identify a decrease in the three regions analyzed in animals that received inflammatory agent when compared with control and vehicle groups (Fig. 3).

In regard to quantification of hydroxyproline, an indirect manner to assess changes in the amount of collagen in tissue, a higher amount of hydroxyproline was observed in animals that received the application of carrageenan in the paw when compared with the control group, in the distal and proximal regions, characterized for bearing mainly tension forces. The intermediate region of this group showed no significant difference (p>0,05) compared to vehicle and control groups (Fig. 4).

The total amount of glycosaminoglycans in the distal region of the animals treated with carrageenan was lower than in control and vehicle groups. There were no differences in other regions (Fig. 5). Relation to the density of bands in agarose gel (Fig. 6), which identifies the various individual glycosaminoglycans, there was no significant difference in the amount of

dermatan sulfate in the three regions of the tendon. Regarding the profile of proteins analyzed by SDS-PAGE, also no differences were found between experimental groups (results not shown).

No differences were observed for the three isoforms of MMP-2 present in each region of the DDFT in the different experimental groups (Fig. 8-10). However it is necessary to emphasize to the presence of the active isoform of MMP-9 only in the distal region of the tendon of rats treated with carrageenan (Fig. 7).

Analyses in light microscopy of sections stained with toluidine blue and hematoxylin and eosin, showed the epitendon thicker in the three regions of animals that received the inflammatory agent in the paw. The presence of inflammatory cells on the epitendon was other aspect evidenced in the tissue, easily viewed with TB (Figure 11).

The analysis of sections stained with Ponceau SS and observed under a polarizing microscope showed strong linear dichroism (Fig. 12E, F) in the distal region of the animals treated with carrageenan, as compared to control and saline (Fig. 12A, B, C,D). The dichroism was also detected in the proximal region, but no differences were found between groups (Fig. 13).

#### Discussion

In this study, we analyzed the possible alterations in extracellular matrix of the deep digital flexor tendon after induced inflammation in rat paw. Carrageenan has been used for many years to analyze effects of inflammation in ligaments and tendon (Tillander et al. 2001, Marsolais et al. 2007). According to Di Rosa et al. (1974), the inflammation caused by carrageenan is similar to other types of inflammation and can be either acute or chronic. The presence of edema in the paw is a characteristic symptom of an acute inflammatory process (Winter et al. 1962; Chunkhorn 1971; Whiteleu and Dalrmple 1998; Morris 2003; Vandivelan et al. 2007; Cicala et AL 2007). The inflammation caused by carrageenan has its peak at the 3<sup>rd</sup> hour and its effects on those first few hours are widely discussed. In the period from 2<sup>nd</sup> to 4<sup>th</sup> hour occurs the maximum vascular response and most intense cell migration (Di Rosa 1972; Morris 2003).

During the inflammatory process in the paw, we noticed that a decrease in the concentration of non-collagenous proteins in the three regions. When the tissue is under inflammatory process there is a migration of immune cells derived from the bloodstream into the injury site, which have function of establishing the tissue homeostasis (Rankin 2004). It is known that the cleavage of signaling molecules and of proteins from the extracellular matrix occurs during the inflammatory phase, where different types of enzymes such as metalloproteinases, especially MMP 1, 3, 7 and 9, are capable of regulating chemotactic activity (Gil and Parks, 2008). The degradation of extracellular matrix proteins promotes the passage of inflammatory cells to the site where the inflammatory process was initiated (Szabo et al. 2004, Korkmaz et. al. 2008).

Analysis of glycosaminoglycans in the distal region showed a smaller amount in the group with carrageenan compared with control and vehicle groups, suggesting that the extracellular matrix of this region is in process of degradation and consequent reorganization of its components. Our results of linear dichroism showed a higher organization in this region. The active MMP-9 was detected only in this region in groups treated with the inflammatory agent, and this enzyme uses among other substrates, proteoglycans as aggrecan, versican and other extracellular matrix proteins (Chakraborti et al. 2003). It is known that the MMP-9 is characteristic of inflammatory processes (Marsolais et al. 2007; Clutterbuck et al. 2010) and possibly, this gelatinase participated in the remodeling of ECM in this region. However, the active MMP-2 was detected in this region, and it is known that this enzyme is characteristic of processes of ECM remodeling (Magra and Maffulli 2005). The most striking changes were found in the distal region, possibly because it is the closest region to the site where carrageenan is injected.

The increased degradation of extracellular matrix accompanies inflammation (Laurent, 1987). However, the dynamics of ECM in the process of remodeling during inflammation and wound healing involves changes in its components. The degradation of its components, such as non-collagenous proteins and glycosaminoglycans seems to be involved in matrix remodeling, cellular response and signaling to the inflammatory response (Gayle & Vaday 2000; Adair-Kirk and Sênior 2008).

The increased thickness of epitendon observed in animals treated with carrageenan with the concomitant presence of inflammatory cells indicates alterations in the ECM of DDFT, besides the cell infiltration is a typical characteristic of inflammatory process. (Marsolais 2001, Shönbein-Schmid 2006). When there is a migration of these cells into the tissue, specific enzymes of the extracellular matrix are activated. The presence of inflammatory cells such as neutrophils and macrophages is an important factor for activation of metalloproteinases in the extracellular matrix of tendon as well as the increase in temperature, which can cause the action of these enzymes that trigger an increase in degradation of extracellular matrix components (Piez & Reddi 1984; Henry and Garner 2003; Marsolais et al. 2007; Black 2009). The active form of MMP-2 tends to be more prominent in the distal region, although it is not significant. It is known that MMP-2 has a preference among other substrates, for proteins such as laminin-5 and galectin, as well as the core protein of proteoglycans and glycosaminoglycans (Chakrabort et al. 2003; Chutterbuck et al. 2010). Moreover, MMPs regulate various aspects of inflammation, such as migration of leukocytes to the site of injury, control of the chemoattractant activity and establishment of chemotactic gradients. (Parks el al. 2004; Gill & Parks 2008). Besides MMPs, various enzymes act on inflammation, such as elastase produced by granulocytes, which can lead to degradation of matrix glycoproteins and elastin (Werb et al. 1980).

Regarding the amount of hydroxyproline, a higher concentration was evidenced in tension regions of the tendon of group treated with carrageenan. Although some MMPs are tending to increase, the collagen concentration did not decrease, suggesting a remodeling. However, according to other studies (Chakraborti et al. 2003; Clutterbuck et al. 2010) MMP-2 and MMP-9 are gelatinases and have preference for degraded collagen and other extracellular matrix proteins. The concentration of hydroxyproline may be related with the constant position of the rat paw due to the peak of edema. Probably, the tendon was in a short position and forced the regions of the DDFT during the contraction of the muscle.

Given that there was a strong linear dichroism in the polarization microscopy suggesting that the distal region of animals with inflamed paws had a better organization of collagen fibers compared to the control, we believe that the collagen molecules are being arranged in a more organized manner in the extracellular matrix. However, in the proximal region is observed that the collagen fibers remain as organized as in the control group, differing from the distal region where there is a greater organization of these fibers.

In our analysis it is possible to observe that there is no inflammatory cells between the collagen fibers, only in the region where is located the epitendon, differing from other studies (Tillander et al. 2001; Marsolais et al. 2007), in which inflammation was induced on the tendon, and caused intense infiltration of inflammatory cells between collagen fibers.

The inflammation can trigger the release of growth factors and cytokines, as well as leukocytes, macrophages and other inflammatory cells. Matrix proteins can modulate the cellular response since some proteins such as thrombospondin-1 can bind and activate TGF- $\beta$ , a growth factor that induces chemotaxis of fibroblasts and may stimulate collagen synthesis (Sharma and Maffulli 2005; Midwood et al. 2004). However, our results suggest that the organization presented by the fibers prevent the extracellular matrix from further alterations and do not allow the passage of inflammatory cells into the matrix. This reinforces that the inflammation induced in adjacent tissue did not directly affect the collagen fibers, but only the epitendon.

According to Tillander et al. (2001), the induction of subacromial bursitis caused changes in the supraspinatus tendon, which was near the site of inflammation, therefore, inflammation in surrounding tissues may directly affect extracellular matrix of tendon. Alterations such as the decrease in the concentration of proteins and glycosaminoglycans, the presence of active MMP-9, the increase in the amount of hydroxyproline, presence of thicker epitendon, the presence of inflammatory cells and changes in the organization of collagen fibers, are evidences that the acute inflammation installed in rat paw but not directly on the tendon also causes biochemical and structural changes in the tendon. **Figures and captions:** 



FIG. 1 Deep digital flexor tendon divided into three regions: Distal (D), Intermediate (I) and Proximal (P).



FIG. 2 Variation of edema induced by carrageenan and saline in rat paw, in function of time. The edema caused by carrageenan was more pronounced at the 3<sup>rd</sup> hour after application.



FIG. 3 Non-collagenous proteins concentration (mg/g tissue) of the regions of deep digital flexor tendon. A smaller amount of non-collagenous protein was observed in animals that received the application of carrageenan in the three regions of the tendon. \*Significant difference compared to control, # significant difference compared to the vehicle.



FIG. 4 Concentration of hydroxyproline (mg/g dry tissue) in the DDFT regions. After 4 hours, a high concentration was detected in the distal and proximal regions of the animals that received the carrageenan.\* Significant difference compared to control, # significant difference compared to the vehicle.



FIG. 5 Concentration of sulfated glycosaminoglycans (mg/g dry tissue) in the DDFT regions. Note smaller amount of glycosaminoglycans in distal region of the animal treated with carrageenan. \*Significant difference compared to control, # significant difference compared to the vehicle.



FIG. 6 Agarose gel electrophoresis. HS (heparan sulphate), DS (dermatan sulfate) and CS (chondroitin sulfate) standards are in the left. Distal region (A), intermediate region (B) and proximal region (C). No difference was detected between the regions with treatments.



FIG. 7 Zymography for MMP-2 and MMP-9 in extracts of rat tendons. Observe that in the distal region there is an (62 kDa) active and intermediate (68 kDa) isoforms tend to increase of the group with carrageenan compared with saline and control groups. The 3 isoforms of MMO-2 can be observed in the intermediate and proximal region of all groups, but without significance differences, as shown by densitometry of bands. Note the presence of active MMP-9 (83kDa) only in the group receiving the inflammatory agent in the same region.



FIG. 8 Densitometry of bands of the latent, intermediate and active isoforms of MMP-2 in the distal region of DDFT. Observe that the intermediate isoform tends to increase, although it is not significant compared to control group.



FIG. 9 Densitometry of bands of the latent, intermediate and active isoforms of MMP-2 in the intermediate region of DDFT. No difference was observed in the intensity of bands.



FIG. 10 Densitometry of bands of the latent, intermediate and active isoforms of MMP-2 in the proximal region of DDFT. No difference was observed in the intensity of bands.



FIG. 11 Histological appearance of the DDFT. A and B: control group; C and D: vehicle group; E and F: carrageenan group. Note that the epitendon is thicker in sections stained with HE in the carrageenan group (E) when compared with control (A) and vehicle (C). Observe the larger amount of cells in this region and inflammatory cells in the epitendon in F ( $\rightarrow$ ). Staining with HE (A,C,E) and TB (B,D,F). Bars: 50µm (A, C, E) and 20µm (B, D, F).



FIG. 12 Longitudinal sections of the tendons stained with PSS from distal region and analyzed by polarization microscopy. In A, C and E sections are parallel to the plane of polarization and B, D and F sections are perpendicular. Observe that there is a stronger linear dichroism in E and F, compared with the control (A, B) and vehicle (C, D). Bar: 20µm.



FIG. 13 Longitudinal sections of the tendons stained with PSS from proximal region and analyzed by polarization microscopy. In A, C and E sections are parallel to the plane of polarization and B, D and F sections are perpendicular to the plane of polarization. There was no apparent difference between the sections. Bar: 20µm.

#### REFERENCES

1. Vogel, K.G., & Koob, T.J. (1989) Structural specialization in tendon under compression. *Int Rev Cytol* 115: 267-293

2. Soejima, O., Diao, E., Lotz, J.L., Harihan, J.S., Naito, M. (2003) Dorsal and palmar material properties of theadult human flexor profundus tendon in zone II. *Hand Surg* 8: 53-58

3. Benjamin, M., Kaiser, E., Milz, S. (2008) Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat* 212: 211-228

4. Berenson, M.C., Blevins, F.T., Plass, A.H.K., Vogel, K.G. (1996) Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res*14: 518-525

5. Waggett, K.G., Ralphs, J.R., Kwan, A.P.L., Woodnutt D, Benjamin M (1998) Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16: 457-470

6. Young, B.B., Gordon, M.K., Birk, D.E. (2000) Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: Association with assembly and growth of collagen fibrils. *Dev Dyn* 217: 430-439

 Jozsa, L & Kannus, P. (1997) Human tendons. Champaign, In: *Human Kinetics*. 1-576

8. Covizi, D.Z., Felisbino, S.L., Gomes, L., Pimentel, E.R., Carvalho, H.F. (2001) Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell* 33(5): 483-490

9. Vogel, K.G., Sandy, J.D., Pagony, G., Robbins, J.R. (1994) Agrecan in bovine tendon. *Matrix Biol* 14:171–179

Feitosa, V.L., Reis, F.P., Esquisatto, M.A.M., Joazeiro, P.P., Vidal, B.C., Pimentel,
 E.R. (2006) Comparative ultrastructural analysis of different regions of two digital flexor
 tendon of pigs. *Micron* 37: 518-525

11. James, R., Kesturu, G. Balian, G., Chhabra, (2008) Tendon: Biology,
Biomechanics, Repairs, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. *J Hand Surg*.
33A: 102-112

12. Sharma, P., Maffulli, N. (2005) Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6(2): 181-190

13. Parks, W.C., Wilson, C.L., López-Boado, Y.S. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate imunity. *Nature Reviews: Immunology* 4: 617-629

14. Clutterbuck, A.L., Harris, P., Allaway, D., Mobasheri, A. (2010) Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Vet J* 183: 27-38

15. Rankin, J.A. (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues* 15: 3-17

16. Shönbein-Schmid, G.W. (2006) Analysis of Inflammation. *The Annual review of Biomedical Engineering*. 8: 93-151

17. Aller, A.M, Arias., J.L, Patán, F.S, Arias, J. (2006) The inflammatory response: an efficient way of life. *Med Sci Monit.* 12: 225-234

18. Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T. (2004) Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 18: 385-405

19. Morris, C.J. (2003) Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol* 225: 115-121

20. Heinergard, D & Sommarin. (1987) Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods Enzymol* 144: 319-373

21. Zingales, B. (1984) Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Genes and Antigens of Parasites*. Rio de Janeiro - Fiocruz 357-363

22. Weber, K., Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244(16): 4406–4412

23. Harab, R.C., Morão, P.A.S. (1989) Increase of chondroitim sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. *Biochim Biophis Acta* 992: 237-240

24. Dietrich, C.P., Dietrich, S.M.C. (1976) Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* 70: 645-647

25. Stegemann, H., Stalder, K. (1967) Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 18(2): 267-273

59

26. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254

27. Farndale, R.W., Buttle, D.J., Barret, A.J. (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethyleneblue. *Biochim Biophys Acta* 883: 173-177

28. Marquetti, R.C., Parizotto, N.A., Chriguer, R.S., Perez, S.E.A., Selistre-De-Araujo HS (2006) Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affest the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am J Sports Med.* 34 (8): 1274-1280

29. Neto, A.G.F., Rodrigues, C.I., Tolosa, E.M.C., Behmer AO (2003) *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. Ed. Manole p.1-341

30. 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

 Di Rosa, M. (1972) Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmac*. 24: 89-102

32. Gardner, D.L. (1960) Production of arthristis in the rabit by the local injection of the mucopolysaccharide caraghenin. *Ann Rheum Dis* 129-157

33. Lowther, D., Gillard, G.C., (1976) Carrageenin-induced arthritis: The effect of intraarticular carrageenin on the chemical composition articular cartilage. *Arthritis Rheum* 19: 769-776

34. Di Rosa, M. Giroud, J.P., Willoughby, D.A. (1974) Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Path* 104: 15-29

35. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. (1962) Carrageenin – induced edema in hind paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Proc Soc exp Biol Med* 111: 544-547

36. Chunkhorn, P., Meacok, S.C.R. (1971) Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *Br J Pharmac* 42: 392-402

37. Whiteley, P.E., Dalrmple, A.S. (1998) Models of inflammation: Carrageenaninduced paw edema in the rat. *Current Procols Pharmac* 5.4.1-5.4.3

38. Vadivelan, S., Sinha, B.N., Kalyan, S.B., Christina, A.J.M., Rakesh, N.P. (2007) Anti-inflammatory activity of Spermacoce articularis Linn on Carrageenan induced paw edema in wistar male rats. *Pharmacologyonline* 3: 478-484

39. Cicala, C., Morello, S., Alfieri, A., Vellesco, V., Marzocco, A.G. (2007) Haemostatic imbalance following carrageenan-induced rat paw oedema. *European J of Pharmac* 577: 156-161

40. Gill, S.E & Parks, W.C. (2008) Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1334-1347

41. Szabo, K.A., Ablin, R.J., Singhingh, G. (2004) Matrix metalloproteinases and the immune response. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4 295–319

42. Korkmaz, B., Moreau, T., Gauthier, F. (2008) Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: hysicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochemic* 90 227-242

43. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., Chakraborti, T. (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: na overview. *Mol Cell Biochem*. 253: 269-285

44. Marsolais, D., Duchesme, E., Côte, C.H., Frenette, J. (2007) Inflammatory cells do not decrease the ultimate tensile strength of intact tendons in vivo and in vitro: protective role of mechanical loading. *J Apply Physiol* 102: 11-17

45. Magra, M., Maffulli, N. (2005) Matrix metaloproteases: a role in overuse tendinopathies. *Br J Sports Med.* 39: 789-791

46. Laurent, T. C. (1987) Structure, function and turnover of the extracellular matrix Adv. *Microcirc*. 12 15–34

47. Gayle, G & Vaday, L.O. (2000) Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *Leukoc Biol* 67: 149–159

48. Adair-Kirk, T.L., Senior R.M. (2008) Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1101–1110

49. Marsolais, D., Côtém C.H., Frenette, J. (2001) Neutrophilis and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res.* 19: 1203-1209
50. Piez, K.A & Reddi, A.H (1984) *Extracellular matrix biochemistry*. New York: Elsevier.

51. Werb, Z., Banda, M.J., Jones, P.A. (1980) Degradation of connective tissue matrices by macrophages: I: proteolysis of elastin, glycoproteins and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J Exp Med* 152: 1340-1351

52. Tillander, B., Franzen, L.E., Nilson, E., Norlin, R. (2001) Carrageenan-induced subacromial bursitis caused changes in the rat's rotattor cuff. *J Orthop* 19: 441-447

53. Midwood, KS., Willians, L.V., Schawarzbauer, J.E. (2004) Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 1031-1037

# ANÁLISE DO TENDÃO FLEXOR DIGITAL PROFUNDO APÓS 12 E 24 HORAS DE INDUÇAO DA INFLAMAÇÃO EM PATA DE RATO

Vieira, C.P.<sup>1</sup>; Aro, A. A<sup>1</sup>; Da Ré Guerra F<sup>1</sup>; Mello, G.C.<sup>2</sup>; Antunes E.<sup>2</sup>; Pimentel, E.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Biofísica e Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
<sup>2</sup>Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Palavras-chave: tendão flexor digital profundo, inflamação, matriz extracelular

# Resumo

O tendão é composto principalmente de colágeno (65-80%), predominantemente do tipo I. Outros componentes tais como glicoproteinas não-colagenicas e proteoglicanos também estão presentes na matriz extracelular (MEC) dos tendões. Inflamações agudas e crônicas desencadeadas por diferentes fatores podem se instalar em tecidos adiacentes aos tendões e atingir sua MEC. Entretanto não há relatos na literatura sobre o efeito da inflamação aguda instalada em pata de rato sobre o tendão flexor digital profundo (TFDP), que apresenta regiões bem definidas com diferentes forcas de tensão e compressão. Nesse estudo foram realizadas análises bioquímicas e morfológicas do TFDP de ratos Wistar sacrificados 12 e 24 horas, período pós pico da inflamação. Os animais foram separados em três grupos: ratos que receberam aplicação da carragenina 1%, os que receberam NaCl 0.9%, e os que não receberam nada, sendo utilizados como controle. O TFDP foi dividido nas regiões distal, intermediária e proximal que foram analisadas separadamente. Para análises bioquímicas foram realizadas dosagens de proteínas, glicosaminoglicanos (GAGs) e hidroxiprolina; as metaloproteinases (MMP) foram analisadas por zimografia. A identificação e quantificação dos GAGs sulfatados foram analisados através do gel de agarose. Para análises morfológicas, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina, azul de toluidina e ponceau SS. Foram observadas alterações na composição bioquímica e estrutural da matriz extracelular do TFDP. Um novo edema é formado em 24 horas após indução da inflamação. No grupo de 12 horas ocorre uma diminuição na quantidade de proteínas no grupo tratado com carragenina na região distal do TFDP. Uma maior concentração de hidroxiprolina é detectada na região intermediária e proximal do grupo da carragenina quando comparado ao controle e ao veículo no grupo de 12 horas, seguida de uma diminuição na região distal em 24 horas. Foi detectado a presença da isoforma latente e ativa da MMP-9 no grupo de 12 horas na região distal do animal tratado com carragenina e, foi notado o epitendão mais espesso em 24 horas após a indução da inflamação nos animais que receberam a carragenina. Conforme nossos resultados, após o pico da inflamação aguda em pata de rato é observado alterações na composição da matriz extracelular TFDP.

# INTRODUÇÃO

Os tendões são estruturas anatômicas que geralmente promovem a inserção dos músculos ao osso (BENJAMIN *et al.*, JAMES *et al.*, 2008). São uma forma especializada de tecido conjuntivo fibroso denso, consistindo basicamente de colágeno tipo I, 65-80%, e elastina 1-2% da massa seca do tendão, embebidos numa matriz de proteoglicanos e água (O'BRIEN, 1997).

As fibras de colágeno I encontram-se altamente orientadas, de maneira que transmitem a força mecânica da contração muscular ao osso promovendo assim o movimento da articulação (KANNUS, 2000). Também possuem a capacidade de absorver parte do impacto da força de tração diminuindo o risco de dano ao músculo (BEST & GARRET 1994). Além do colágeno tipo I, também estão presentes o colágeno tipo II, III, IV (AHTIKOSKI *et al.*, 2003), V e VI (JÓZSA & KANNUS; VIIDIK 1969). O arranjo estrutural das fibrilas de colágeno e a associação dessas fibrilas com outros elementos de matriz são responsáveis pelas propriedades biomecânicas do tendão (JAMES & WANG 2006, BENJAMIN *et al.*, 2008).

O tendão flexor digital profundo consiste de um tecido conjuntivo denso que é considerado um tendão "wrap around" por estar próximo a polias ósseas, que recebe diferentes forças, conforme sua extensão Esse tendão usualmente é dividido em três regiões, devido a suas características bioquímicas e estruturais, em: região distal que recebe forças de tensão e alguma compressão, região intermediária que recebe forças de compressão estando em contato direto com o osso calcâneo, e região proximal que é submetida só a forças de tensão (COVIZI *et al.*, 2001; FEITOSA *et al.*, 2006). Essas regiões são distintas bioquimicamente podendo variar na quantidade e na disposição dos componentes da matriz extracelular. Em regiões em que o tendão está sob forças de tensão, destacam-se os pequenos proteoglicanos, próximo a 90% do total de PG, na região de compressão, é destacado a presença de grandes proteoglicanos cerca de 68%. do total de PG. O agrecam, grande proteoglicano, juntamente com a água presente no tecido, reduz a fricção, facilitando o deslizamento das fibrilas em respostas a cargas mecânicas (VOGEL et al, 1994). A manutenção em forma de rede dos feixes de colágeno da região intermediária está ligada com a continuidade do estímulo compressivo, entretanto nas regiões de tensão, o colágeno forma feixes alinhados (VOGEL & KOOB 1989;

COVIZI et al., 2001, JAMES et al., 2008). As fibras colágenas são cercadas pelo epitendão, que com seus vasos sanguíneos é responsável pela nutrição do tendão.

Os tendões respondem a esforços repetitivos através da degeneração ou inflamação, e em alguns casos a combinação de ambos (SHARMA & MAFFULLI 2006). A inflamação é uma resposta normal do tecido à injúria ou infecção, que tem por finalidade reestabelecer a normalidade do tecido. O processo inflamatório atua diretamente através de seus mediadores e células inflamatórias. Os mediadores inflamatórios são desencadeados por diferentes fatores e são os responsáveis pela migração de diferentes células para o local da lesão. Sintomas como, dor, inchaço no local e vermelhidão, seguida ou não de febre são característicos do processo inflamatório (SHERWOOD & KINSKY 2004).

Em muitos casos a inflamação não está diretamente no tendão e sim, em tecidos próximos a ele. Tillander e colaboradores (2001) relatam que a bursite pode provocar alterações no tendão suprespinal. Entretanto, é pouco conhecido se o processo inflamatório instalado em tecidos adjacentes aos tendões desencadeia alterações na matriz extracelular. Sabe-se que estudo realizado em nosso laboratório mostrou-se que em 4 horas após indução do processo inflamatório na pata de rato há alterações bioquímicas e estruturais na matriz extracelular do TFDP (trabalho submetido à publicação). Contudo é necessário saber se as mudanças que uma inflamação instalada em tecidos próximos ao tendão, possa interferir em seus elementos bioquímicos e estruturais. Por isso, nosso objetivo é analisar o efeito da inflamação na pata e as possíveis alterações que possam ocorrer nos elementos da matriz extracelular do TFDP em 12 e 24 horas, período posterior ao pico do processo inflamatório.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

# **Grupos Experimentais**

Nesse trabalho, ratos machos Wistar com 140-160g foram analisados e mantidos com acesso livre a água e comida. Os grupos foram divididos em: os que receberam aplicação subcutânea de 1% de carragenina tipo IV (Sigma cod 22039) (0,1ml) dissolvida em salina (Winter et al 1962); solução salina ou veículo (NaCl 0,9%) e os que não receberam nenhuma aplicação na pata direita. Após 12 e 24 horas da aplicação os animais formam sacrificados por overdose de anestesia inalatória com Isoflurano, e os tendões formam retirados para análises morfológicas e bioquímicas.

#### Medida do Edema

O volume das patas foi medido através da utilização do hidropletismômetro (UgoBasile, Comercio, VA) no tempo zero e a cada intervalo de hora até a 6° hora, e na 12° e 24° hora após a aplicação de carragenina e da solução salina. As alterações de volume da água nos tubos foram realizadas conforme descrito por Morris (2003).

# Extração dos componentes da Matriz Extracelular

O tendão flexor digital profundo (TFDP) foi retirado da pata direita dos animais de diferentes grupos e divididos nas três regiões: distal, intermediária e proximal. As regiões foram analisadas individualmente. Os tendões foram pesados, devidamente lavados com PBS (NaCl 0,15M – tampão fosfato de sódio 5mM pH7,4 com EDTA 50mM) e cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Os fragmentos foram imersos em 50 volumes de 4M de Hidrocloreto de Guanidina (Gu-HCl), contendo 0,05M EDTA e 1 mM PMSF in 0.05 M tampão acetato pH 5.8, de acordo com o método de Heinergard e Sommarin (1987) .A extração teve duração de 24 horas, em 4°C, seguida por centrifugação em 27,000×g por 50 min. O sobrenadante foi utilizado para análises bioquímicas.

#### Eletroforese de gel de agarose

Os fragmentos das regiões dos tendões foram desidratados e os glicosaminoglicanos sulfatados foram liberados dos proteoglicanos pela digestão com solução de papaína (40mg/g de tecido seco) contendo tampão fosfato de sódio 100mM, pH 6,5, com EDTA 40mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 80mM (Harab & Morão 1989). Os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) foram precipitados em etanol e separados por eletroforese em gel de agarose (0,6%) em 0,05M propilenodiamino (PDA) segundo Dietrich & Dietrich (1976).

#### Quantificação de Hidroxiprolina

Os fragmentos das três regiões do TFDP foram imersos em acetona por 48 horas e clorofórmio:etanol (2:1) por 48 horas. Após os fragmentos foram hidrolisados com HCl 6N (1mL/10mg de tecido) em 16 horas em 110°C. O hidrolisado foi neutralizado com 6N NaOH e tratado com 1.41% de solução de cloramina T e 15% de *p*-dimetilaminobenzaldeido como descrito por Stegemann and Stalder (1967). Posteriormente, as amostras foram incubadas por 15 min em 60°C. A solução com hidroxiprolina foi resfriada até alcançar temperatura ambiente e foi medida a absorbância em 550nm no espectrofotômetro Diode Array, modelo 8452A da Hewlett Packard.

#### Quantificação de proteínas e glicosaminoglicanos sulfatados

Amostras dos extratos em cloreto de guanidina dos grupos experimentais foram utilizadas para a dosagem de proteínas, que foram quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976), usando albumina bovina sérica como padrão. As amostras digeridas por solução de papaína foram utilizadas para quantificar os GAGs totais dos grupos experimentais. A quantificação foi determinada usando o método de azul de dimetilmetileno (DMMB) (FARNDALE *et al.*, 1986) usando condroitim sulfato como padrão. A absorbância medida foi 595nm para as proteínas e 540nm para os glicosaminoglicanos. A leitura das amostras foram medidas através da leitora multicanal para microplaca de 96 posições Asys hitech modelo expert plus.

#### Zimografia para gelatinases

Os tendões foram tratados segundo Marqueti et al. (2006). Os fragmentos de cada região do TFDP foram imersos numa solução de Tris-HCL 50mM ( pH 7,4), NaCl 0,2M, 10mM CaCl<sub>2</sub>, e Triton 0,1% e um coquetel de inibidor de protease 1% ( Sigma P8340) para extração de proteína em 4°C durante 2 horas. Após a primeira extração, as amostras foram incubadas e foi adicionado 1/3 do volume da mesma solução descrita anteriormente, em 60°C por 5 minutos. Após foi aplicada 20µg de proteína por amostra no gel. O gel de poliacrilamida de 10% contendo 0,1% de gelatina foi desenvolvido em 4°C e após o final da eletroforese, o gel foi lavado com 2,5% de Triton X-100 e incubados durante 21 horas na solução de Tris-HCL 50mM (pH7,4) NaCl 0.1M e azida sódica 0,03% em 37°C. O gel foi corado com coomassie brilhant blue R-250 (Sigma) por 1 hora. Depois disso, os géis foram lavados com uma solução contendo metanol 50% e ácido acético 10% para observação das bandas negativas das proteínas correspondendo a atividade das enzimas. Como controle positivo, é usado EDTA 20mM no tampão de incubação, que inibe a atividade das gelatinases, confirmando a identificação das MMPs nos géis. As bandas em imagem negativa foram quantificadas através da densitometria usando Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, USA).

# Análise de Microscopia de luz

Os tendões foram fixados em solução contendo formaldeído 4% em tampão Millonig (fosfato de sódio 0,13M, NaH 0,1M – pH7,4) durante 24 horas em temperatura ambiente. Após os tendões foram lavados por 6 horas em água corrente, desidratados como uma sequencia crescente de etanol, diafanizado com xilol e embebidos em parafina (Histosec, Merck), segundo Neto et al. (2003). Cortes longitudinais seriados de 7 $\mu$ m foram feitos para análises no microscópio. Para visualizar a estrutura geral do tecido, alguns cortes foram corados com hematoxilina-eosina e outros com azul de toluidina (0,025%) em tampão Mcllvaine ( ácido cítrico 0,03M, fosfato de sódio dibásico 0,04M – pH 4,0). Para observação das fibras de colágeno, os cortes foram corados com Ponceau SS 0,025% em ácido acético 2% durante 1,5 minutos e foi observado o discroismo linear em microscópio de polarização (VIDAL & MELLO 2005). Os cortes foram posicionados de modo que o eixo mais longo do

tendão ficasse paralelo e depois perpendicular ao plano de luz polarizada. Os cortes corados com HE e AT foram observados sob microscópio comum de luz Olympus BX 60.

# Análise estatística

Os dados foram apresentados como as médias  $\pm$  SEM dos resultados obtidos por um número de 5 animais por grupo. Após coleta de dados, realizou-se a análise estatística pelo teste de variância one-way (ANOVA), com pós-teste de Tukey, considerando o nível de significância p<0,05 através do programa estatístico GraphPad Prism®, versão 3.0.

# **Resultados**

As três regiões do TFDP foram analisadas individualmente e caracterizadas por análises bioquímicas e morfológicas. Foi analisada a variação do edema induzido pela carragenina e pela salina em pata de rato, em função do tempo. Observou-se que em 3 horas o edema está mais acentuado no grupo da carragenina, este diminui até 12<sup>a</sup> hora, sendo o edema em menor volume, quando comparado com a 1<sup>a</sup> hora analisada após indução na pata. Na 24<sup>a</sup> hora é notado um aumento no volume do edema superior a 12<sup>a</sup> hora, sendo semelhante ao edema observado na 6<sup>a</sup> hora. O grupo veículo apresenta edema menor que no grupo com carragenina, na 4<sup>a</sup> hora este grupo não apresenta edema, já na 24<sup>a</sup> hora um pequeno edema é observado, este, porém, menor que o edema observado na 1<sup>a</sup> hora desse grupo (Figura 2).

Em relação à quantidade de proteínas não colagênicas é possível observar nos animais que receberam a aplicação do agente inflamatório na pata, menor concentração na região distal do grupo de 12 horas e a região intermediária do grupo de 24 horas, quando comparada ao controle e veículo. Na região proximal do grupo de 24 horas é observada uma maior concentração de proteínas não colagênicas nos animais que receberam a carragenina na pata, quando comparado ao controle e veículo (Figura 3).

Não houve diferenças significativas exceto na região distal para o grupo veículo, que apresentou menor concentração de GAGs do que o controle (Figura 4). Em relação à eletroforese em gel de agarose, é possível notar no grupo de 12 horas que a banda de dermatam sulfato é menos proeminente no grupo da carragenina na região intermediária, quando comparada ao controle e veículo (Figura 5B). Nos demais géis do grupo de 12 horas e

os géis referentes ao grupo de 24 horas (Figura 6) não apresentaram diferenças no gel de agarose e em relação a densitometria de bandas (resultado não mostrado).

Em relação à dosagem de hidroxiprolina, uma forma indireta para avaliar alterações na quantidade de colágeno no tecido, foi evidenciada uma maior quantidade de hidroxiprolina na região intermediária e proximal no grupo da carragenina quando comparado ao controle, no grupo de 12 horas. Foi possível notar que o grupo veículo apresenta maior quantidade de hidroxiprolina na região distal e proximal do grupo de 12 horas, quando comparado ao controle, não apresentando diferença em relação ao grupo da carragenina. Em referência ao grupo de 24 horas foi notada uma maior concentração de hidroxiprolina na região distal dos animais do grupo da carragenina, quando comparado ao controle e veículo (Figura 7).

Na análise de zimografia para detecção das gelatinases não foram observadas diferenças entre as isoformas latente, intermediária e ativa da MMP-2 nas regiões do TFDP com os tratamentos dos grupos experimentais em 12 e 24 horas, apesar de algumas isoformas mostrarem maior ou menor quantidade de pixels, de acordo com a análise de densitometria de bandas, isto não foi significativo. Foi evidenciado a isoforma latente e ativa da MMP-9 na região distal dos animais tratados com carragenina no grupo de 12 horas (Figura 8). A MMP-9 não foi notada no grupo de 24 horas (Figura 9).

Nos cortes corados com hematoxilina e eosina e analisados na microscopia de luz, não foram observadas diferenças estruturais nas três regiões do TFDP no grupo de 12 horas. No grupo de 24 horas, o epitendão aparece mais espesso com células inflamatórias nas três regiões dos tendões dos animais que receberam carragenina na pata, quando comparado ao controle e ao veículo Nos cortes corados com azul de toluidina observou-se na região distal, próximo aos dígitos, um infiltrado de células no grupo da carragenina nos grupos de 12 e 24 horas. Essa característica não ocorreu no controle e nem salina (Figura 10).

A análise dos cortes corados com Ponceau SS e observados em microscópio de polarização não mostrou diferença na região distal entre o grupo de carragenina 12 e 24 horas quando comparado ao controle e veiculo (Figura 11). Contudo, em relação à região proximal foi evidenciado um dicroísmo linear menor nos grupo do veiculo e carragenina em 12 e 24 horas (Figura 13 C, D, E, F, G, H, I, j) quando comparado ao controle (Figura 12 A, B).

#### Discussão

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório foram analisadas as mudanças que ocorrem no TFDP durante o pico do processo inflamatório. No presente trabalho, foram analisadas as alterações na matriz extracelular do TFDP após o pico da inflamação aguda que ocorre 4 horas após a indução desse processo na pata de rato. Um dos melhores protocolos para indução da inflamação é através do uso da carragenina, utilizada para experimentos com a finalidade de testar novas drogas contra a inflamação (WINTER *et al.*, 1962, ROBINSON & REEVES 2008). Sendo assim, nosso principal objetivo foi investigar se um processo inflamatório desencadeado pela carragenina em tecidos adjacentes ao TFDP pode atingir a MEC desse tendão após 12 e 24 horas.

Após a aplicação da carragenina, as patas dos ratos apresentaram um edema, evidenciando um processo inflamatório como já descrito anteriormente (WINTER *et al.*, 1962,; CHUNKHORN 1971; WHITELEU& DALRMPLE 1998; MORRIS 2003). Após 3 horas da aplicação da carragenina, observou-se que o pico do processo inflamatório e o edema estava mais proeminente, com uma posterior diminuição. Um novo edema é formado após 12 e 24 horas da aplicação da carragenina, indicando que ocorre novamente uma resposta vascular, contudo não tão intensa quanto durante o pico da inflamação (VANDIVELAN *et al.*, 2007; CICALA *et al.*, 2007).

A MEC do TFDP apresentou menor concentração de proteínas não colagênicas na região distal do grupo 12 horas de inflamação. Acredita-se que essa menor quantidade de proteínas pode ser devido à diminuição de síntese ou aumento da degradação que ocorre devido à reorganização da MEC após intensa migração celular, no pico do processo inflamatório (trabalho submetido à publicação). Tendo em vista que a mesma região após 24 horas de inflamação apresentou maior quantidade de proteínas não colagênicas, se aproximando da concentração observada no controle. A degradação é um dos passos para a reorganização da matriz extracelular após injúria (SHARMA & MAFFULLI 2006). Conforme o decorrer das horas é notado que o tecido tende a alcançar a normalidade. Entretanto, no grupo de 24 horas, é a região intermediária que apresenta menor quantidade no grupo com inflamação, indicando
degradação também nessa região, ao contrário da região proximal desse mesmo grupo em que ocorreu um aumento da concentração de proteínas não colagênicas.

A análise de glicosaminoglicanos sulfatados na região distal mostrou uma menor concentração no veículo quando comparado ao grupo controle e grupo da carragenina. Contudo, de acordo com estudo realizado em nosso laboratório (trabalho submetido à publicação), durante o pico da inflamação aguda, o grupo veículo permanece com menor quantidade de glicosaminoglicanos em relação ao controle, diminuindo sua concentração ainda mais em 12 horas. Na eletroforese em gel de agarose foi observada diferenças entre as bandas de dermatam sulfato no grupo com inflamação em 12 horas na região intermediária, em que uma menor presença de dermatam sulfato é notada quando comparado ao veiculo e controle, sugerindo que durante o processo inflamatório houve uma degradação desse glicosaminoglicano. Entretanto, em 24 horas do grupo com inflamação, não é notado diferenteça entre as bandas de dermatam sulfato. Acreditamos que houve uma reorganização desse glicosaminoglicano em 24 horas quando comparado a degradação observada em 12 horas. A matriz extracelular quando está sob processos patológicos sofre uma reorganização que pode levar a degradação de alguns de seus componentes (JÄRVINEM *et al.*, 2005, ADAIR-KIRK & SÊNIOR 2008).

A dosagem de hidroxiprolina foi evidenciada uma maior quantidade de hidroxiprolina na região intermediária e proximal no grupo da carragenina quando comparado ao controle, no grupo de 12 horas. Contudo, em 24 horas a região intermediária e proximal possui menor concentração de hidroxiprolina quando comparado a 12 horas, se aproximando da quantidade observada no grupo controle. Acreditamos que a região distal em 12 horas não teve um aumento da concentração de hidroxiprolina, devido a presença da MMP-9 ativa presente nessa região, contudo em 24 horas essa gelatinase não é detectada. Durante o pico do processo inflamatório, conforme estudo em nosso laboratório (trabalho submetido à publicação) foi observado um aumento gradual na quantidade de hidroxiprolina nas três regiões do TFDP, contudo quando observado em 24 horas, apenas a região distal possui maior concentração de hidroxiprolina nos animais que receberam a aplicação do agente inflamatório.

De acordo com a detecção de gelatinase foi observado a presença da isoforma latente e ativa da MMP-9, enzima característica de processos inflamatórios (KAROUSOU *et al.*, 2008,

CLUTTERBUCK *et al.*, 2010) na região distal em 12 horas após a aplicação da carragenina. Acreditamos que essa enzima possa ter sido a responsável pela diminuição da quantidade de hidroxiprolina na região distal em 12 horas, uma vez que esta enzima utiliza como substratos elementos da matriz extracelular como colágeno, gelatina, proteoglicanos e glicoproteínas (CHAKRABORT *et al.*, 2003, GILL & PARKS 2008, CLUTTERBUCK et al., 2010). Contudo a MMP-9 não é detectada em 24 horas, impedindo a degradação do colágeno. Sabese que a MMP-9 pode ativar diferentes quimiocinas, além de liberação de superfície do TNF- $\alpha$ , que provoca alterações dos elementos locais da MEC (SOROKIN 2010).

Em análise sob luz polarizada foi evidenciado menor organização dos feixes de colágeno, sugerindo uma menor organização da matriz na região proximal dos animais com carragenina e no grupo veículo em 12 e 24 horas. A concentração da hidroxiprolina na região proximal do grupo de 24 horas com inflamação diminui consideravelmente quando comparado a 12 horas do mesmo grupo, indicando que a matriz extracelular está sob processo de reorganização, sendo assim menos organizada. Na região distal do grupo inflamado, não ocorre uma diminuição entre 12 e 24 horas, sendo os feixes de colágeno mostrados com organização semelhante ao grupo controle. Estudos anteriores citam que possivelmente as moléculas de colágeno possam estar sendo dispostas organizadamente na matriz extracelular (trabalho submetido à publicação). Os feixes de colágeno são dispostos paralelamente em condições normais, contudo, quando submetidos a processos patológicos como inflamação, lesões, estresse, alongamentos e exercícios físicos, sua matriz extracelular passa por uma reorganização visando a estruturação do tecido (RILEY et al., 2002; RILEY 2008, ARO et al., 2008) Acreditamos que talvez pelo estresse provocado à matriz, o grupo veículo mostrou maior quantidade de hidroxiprolina em relação ao controle, podendo assim, indicar que a aplicação com solução salina na pata pode alterar a matriz extracelular do tendão em relação a hidroxiprolina. Sabe-se que fibroblastos da MEC podem liberar diferentes fatores de crescimento e podem sintetizar colágeno em determinados processos (MIDWOOD et al., 2004, SHARMA & MAFFULLI 2006, WANG 2006).

No grupo da carragenina das três regiões do TFDP em 24 horas foi observado o epitendão mais espesso quando comparado ao controle e salina em cortes corados com HE, indicando uma maior quantidade de células nesse local. Contudo, a espessura do epitendão em 24 horas

mostrou-se aparentemente menor em relação à análise durante o pico da inflamação (trabalho submetido à publicação). Além disso, a região distal, localizada nos dígitos do animal que recebeu a aplicação da carragenina na pata, apresentou um pequeno infiltrado de células em 12 e 24 horas. Isso aponta que mesmo após o pico da inflamação (trabalho submetido à publicação), a migração celular torna-se menos intensa, porém não desaparece, se apresentando com mais intensidade no edema em 24 horas. Sabe-se que a infiltração de células inflamatórias no tecido lesionado é típico de processo inflamatório, e possuem a função de estabelecer a homeostasia do tecido (GAYLE & VADAY 2000; ADAIR-KIRK & SÊNIOR 2008).

No período posterior ao pico da inflamação aguda instalada em pata de rato são observadas alterações na composição bioquímica e estrutural da matriz extracelular do tendão flexor digital profundo. A presença da isoformas latente e ativa da MMP-9, alterações de outros elementos da MEC como proteínas não-colagênicas, glicosaminoglicanos e hidroxiprolina nas diferentes regiões do DDFT, a presença de epitendão mais espesso com maior infiltrado de células, uma menor organização dos feixes de colágeno na região de tensão em 12 e 24 horas evidenciam que o processo inflamatório instalado em tecido adjacente pode afetar os elementos desse tendão.

## **Figuras e Legendas**



FIGURA 1. Tendão Flexor Digital Profundo divido nas três regiões: Distal ( D), Intermediaria (I) e Proximal (P).



FIGURA 2. Variação do edema induzido por carragenina e pelo veículo em pata de rato, em função do tempo. O edema causado pela carragenina foi mais acentuado na 3° hora após aplicação, o edema é menor na 12° hora e retorna na 24° hora.



FIGURA 3. Concentração de proteínas não colagênicas (mg/g do tecido) das regiões do tendão flexor digital profundo. Uma menor quantidade de proteinas não colagenicas foi verificado nos animais que receberam a aplicação da carragenina na regiao distal e intermediária dos grupos de 12 e 24 horas, respectivamente. Uma maior quantidade de proteinas é notado na região proximal do grupo de 24 horas. \* Diferença significativa em relação ao controle; # diferença significativa em relação ao veículo.



FIGURA 4. Concentração de glicosaminoglicanos sulfatados (mg/g do tecido seco) das regiões do DDFT. Notar na regiao distal maior quantidade de glicosaminoglicanos no animal tratado com carragenina. # diferença significativa em relação ao veiculo; ° diferença significativa em relação ao controle e veículo.



FIGURA 5 Eletroforese em gel de agarose do grupo de 12 horas. Notar menor quantidade de DS na região intermediária (B) quando comparado ao controle e salina Padrões de HS (heparam sulfato), DS (dermatam sulfato) e CS (condroitim sulfato) estão a esquerda. Região distal (A), intermediária (B) e proximal (C) do tendão.



FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose de 24 horas. Região distal (A), intermediária (B) e proximal (C) do tendão. Nenhuma diferença foi detectada entre as regiões com os tratamentos. Padrões de HS (heparam sulfato), DS (dermatam sulfato) e CS ( condroitim sulfato) estão a esquerda.



FIGURA 7. Concentração de hidroxiprolina (mg/g do tecido seco) das regiões do DDFT. Em 12 horas foi detectada nas regiões intermediária e proximal, e em 24 horas na região distal dos animais que receberam a carragenina, uma maior concentração de hidroxiprolina.\* Diferença significativa em relação ao controle; # diferença significativa em relação ao veiculo; ° diferença significativa em relação ao controle e veículo.



FIGURA 8. Zimografia para MMP-2 e MMP-9 de extratos de tendões de ratos do grupo de 12 horas. Notar a presença da isoforma latente (93kDa) e ativa (83kDa) da MMP-9 nos animais que receberam a aplicação de carragenina na pata (Car). Não foram evidenciadas diferenças entre as isoformas latente (72kDa), intermediária (68kDa) e isoforma ativa (62 kDa) da MMP-2 nos grupos experimentais. Foi realizada a densitometria de bandas que confirmou o resultado apresentado.



FIGURA 9. Zimografia para MMP-2 e MMP-9 de extratos de tendões de ratos do grupo de 24 horas. Não foram evidenciadas diferenças entre as isoformas latente (72kDa), intermediária (68kDa) e isoforma ativa (62 kDa) da MMP-2 e a MMP-9 não foi detectada nos grupos experimentais. Foi realizada a densitometria de bandas que confirmou o resultado apresentado.



FIGURA 10. Cortes do tendão flexor digital profundo corados com HE (A-E) e AT (F-H). A: grupo controle; B e C: grupo veículo e carragenina 12 horas; D e E: grupo veiculo e carragenina 24 horas; F: grupo controle; G: grupo veiculo; H: grupo carragenina. Note o epitendão mais espesso nos cortes corados com HE no grupo carragenina 24 horas (E) quando comparado ao controle (A) e veículo (D). A região distal próximo aos dígitos apresentam um infiltrado de células ( $\rightarrow$ ) no grupo carragenina 12 e 24 horas (H). Barras: 80µm (A,B,C,D,E), 40µm (F,G,H).



FIGURA 11. Cortes longitudinais dos tendões da região distal corados com PSS e observados através da microscopia de polarização. Em A,C,E,G e I os cortes estão paralelos, em B,D,F,H e J os cortes estão perpendiculares ao plano de polarização. Em A e B grupo controle, C e D veículo 12 horas, E e F veículo 24 horas, G e H carragenina 12 horas, I e J carragenina 24 horas. Não há diferença entre os grupos com relação a organização dos feixes de colágeno. Barra: 20µm.



FIGURA 12. Cortes longitudinais dos tendões da região proximal corados com PSS e observados através da microscopia de polarização. Em A,C,E,G e I os cortes estão paralelos, em B,D,F,H e J os cortes estão perpendiculares ao plano de polarização. Em A e B grupo controle, C e D veículo 12 horas, E e F veículo 24 horas, G e H carragenina 12 horas, I e J carragenina 24 horas. Em relação ao grupo controle, os demais grupos apresentam menor dicroísmo linear. Barra: 20µm.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAIR-KIRK TL, SENIOR RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 40: 1101–1110, 2008.

AHTIKOSKI AM, KOSKINEM SOA, VIRTANEM P, KOVANEM V, RISTELI J and TAKALA TES. Type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, 177: 473-481, 2003.

ARO AA de, VIDAL BC, TOMIOSSO TC, GOMES L, ROSA-MATIELLO SMG, PIMENTEL ER. Structural and Biochemical Analysis of the Effect of Immobilization Followed by Stretching on the Calcaneal Tendon of Rats. **Connective Tissue Research.** 49:443–454, 2008.

BENJAMIN M, KAISER E, MILZ S. Structure-function relationships in tendons: a review. **J Anat**. 212: 211-228, 2008.

BEST TM, GARRET WE. Basic science of soft tissues: muscle and tendon. In: Orthopaedic Sports Medicine:Principles and Practice. WB Saunders: Philadelphia. 1-45, 1994.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254, 1976.

CHAKRABORTI S, MANDAL M, DAS S, MANDAL A, CHAKRABORTI T. Regulation of matrix metalloproteinases: na overview. **Molecular and Celullar Biochemistry.** 253: 269-285, 2003.

CHUNKHORN P, MEACOCK SCR. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **Br J Pharmac.** 42: 392-402, 1971.

CICALA C, MORELLO S, ALFIERI A, VELLESCO V, MARZOCCO S, AUTORES G. Haemostatic imbalance following carrageenan-induced rat paw oedema. **European J of Pharmac.** 577: 156-161, 2007.

CLUTTERBUCK AL, HARRIS P, ALLAWAY D, MOBASHERI A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal** 183: 27-38, 2010.

COVIZI DZ, FELISBINO SL, GOMES L, PIMENTEL ER and CARVALHO HF. Regional adaptations in three rat tendons. **Tissue&Cell**, 33(5): 483-490, 2001.

DIETRICH CP, DIETRICH SMC. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal Biochem**.70: 645-647, 1976.

FARNDALE RW, BUTTLE DJ, BARRET AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethyleneblue. **Biochim Biophys** Acta. 883: 173-177, 1986.

FEITOSA VL, REIS FP, ESQUISATTO MAM, JOAZEIRO PP, VIDAL BC, PIMENTEL ER. Comparative ultrastructural analysis of different regions of two digital flexor tendon of pigs. **Micron**. 37: 518-525, 2006.

GAYLE G & VADAY LO. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. **Leukoc Biol** 67: 149–159, 2000.

GILL SE & PARKS WC. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 40: 1334-1347, 2008.

HARAB RC, MORÃO PAS. Increase of chondroitim sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. **Biochim. Biophis. Acta**. 992: 237-240, 1989.

HEINERGARD D & SOMMARIN. Isolation and characterization of proteoglycans. **Methods in Enzymol.** 1987, 144: 319-373.

JAMES R, KESTURU G, BALIAN G, CHHABRA B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repairs, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. **J Hand Surg**. 33A: 102-112, 2008.

JAMES H, WANG C. Mechanobiology of tendon. Journal of Biomechanics. 39: 1563-1582, 2006.

JÄRVINEM TAH, KANNUS P, MAFFULLI N, KHAN KM, Achilles tendon disorders: etioloy and epidemiology. **Foot Ankle Clin N Am**. 10: 255-266, 2005.

JOZSA L & KANNUS P. Human tendons. Champaign, IL: Human Kinetics. 1-576, 1997.

KANNUS P. Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports, 10: 312-320, 2000. KAROUSOU E, VIGETTI D, MAFFULLI N. Collagens, Proteoglyans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. Clin Orthop Relat Res. 466: 1577-1582, 2008.

MARQUETI RC, PARIZOTTO NA, CHRIGUER RS, PEREZ SEA, SELISTRE-DE -ARAUJO HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affest the remodeling of the Achilles tendon in rats. **The American Journal of Sports Medicine**. 34 (8): 1274-1280, 2006.

MIDWOOD KS, WILLIANS LV, SCHAWARZBAUER JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology.** 36: 1031-1037, 2004.

MORRIS CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol.** 225: 115-121, 2003.

NETO AGF, RODRIGUES CI, TOLOSA EMC, BEHMER OA. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. **Ed. Manole**. p.1-341, 2003.

O'BRIEN M. Structure and metabolism of tendons. Scand J Med Sci Sports 7: 55–61 1997.

RILEY G. Tendinopathy - from basic science to treatment. Nature Clinical Practice. 4: 82-89, 2008.

RILEY GP, CURRY V, DEGROOT J, VAN EL B, VERZIJL N, HAZLEMAN BL, BANK RA. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. **Matrix Biol**. 21, 185–195, 2002.

ROBINSON LE, REEVES S. Effect of EpiCor on Carrageenan-induced paw edema in rats. **Embria Health Sciences** 4: 1-4, 2008.

SHARMA P, MAFFULLI N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact**. 6(2): 181-190, 2006.

SHERWOOD ER, TOLIVER-KINSKY T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology** 18: 385-405, 2004.

SOROKIN L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. **Nature.** 712-723, 2010.

STEGEMANN H, STALDER K. Determination of hydroxyproline. Clin Chim Acta. 18(2): 267-273, 1967.

VADIVELAN S, SINHA BN, KALYAN SB, CHRISTINA AJM, RAKESH NP. Antiinflammatory activity of Spermacoce articularis Linn on Carrageenan induced paw edema in wistar male rats. **Pharmacologyonline** 3: 478-484, 2007.

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

VIIDIK A. Tensile strength properties of Achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. **Acta Othop Scand**, 40: 261-272, 1969.

VOGEL KG & KOOB TJ. Structural specialization in tendon under compression. Int **Rev Cytol**. 115: 267-293, 1989.

VOGEL KG, SANDY JD, PAGONY G, ROBBINS JR (1994) Agrecan in bovine tendon. **Matrix Biol** 14:171–179

WANG JHC. Mechanobiology of tendon. J of Biomechanics. 39: 1563-1582, 2006.

WHITELEY PE, DALRMPLE SA. Models of inflammation: Carrageenan-induced paw edema in the rat. **Current Procols in Pharmac**. 5.4.1-5.4.3, 1998.

WINTER CA, RISLEY EA, NUSS GW. Carrageenin – induced edema in hind paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Proc Soc exp Biol. Med.** 111: 544-547, 1962.

## CONCLUSÕES

A inflamação instalada em tecidos próximos pode interferir em aspectos bioquímicos e estruturais do tendão, sendo que essas alterações são mais marcantes em 4 horas, porém ainda persistem em 12 e 24 horas.

Em 4 horas de indução da inflamação são evidenciadas as seguintes alterações:

- Diminuição na concentração de proteínas não colagênicas e glicosaminoglicanos;
- A presença da MMP-9 ativa na região distal;
- Aumento da concentração de hidroxiprolina;
- Epitendão mais espesso com presença de células inflamatórias;
- Alterações na organização das fibras de colágeno na região distal do TFDP.

No período de 12 e 24 horas são observadas as seguintes alterações:

- A presença de isoformas latente e ativa da MMP-9 em 12 horas, não aparecendo em 24 horas;
- Menor concentração de proteínas não colagênicas na região distal e intermediária nos grupos de 12 e 24 horas, respectivamente;
- Maior concentração de hidroxiprolina na região intermediária e proximal em 12 horas, seguida pela diminuição desse elemento em 24 horas nessas duas regiões;
- Epitendão mais espesso com maior infiltrado de células em 24 horas;
- Menor organização dos feixes de colágeno na região proximal em 12 e 24 horas.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "ESTUDO DO EFEITO DA INFLAMAÇÃO EM PATA DE RATO INDUZIDA POR CARRAGENINA SOBRE O TENDÃO FLEXOR DIGITAL PROFUNDO":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

 (X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança\*: Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNICAMP, sob Protocolo(s) nº 2259-1.

> \* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vinculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Wristiane Reducie leve Aluno(a): Cristiano Pedrozo Vieira

munil Orientador(a): Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido / <u>Ana Maria Apruvida quavaldo</u> Nome: Função:

> Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP