

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Gustavo Pereira Benevides**

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

**BIOQUÍMICA E BIOMECÂNICA DOS TENDÕES  
FLEXORES DIGITAIS DE FRANGOS**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
GUSTAVO PEREIRA BENEVIDES  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Laurecir Gomes*  
30.08.02

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

Orientadora: Profa.Dra. Laurecir Gomes

UNIDADE Be  
Nº CHAMADA TI UNICAMP  
B435b  
V EX  
TOMBO BC/ 51352  
PROC 16.887102  
C DX  
PREÇO R\$11,00  
DATA 25/10/02  
Nº CPD                     

ii

CM0017572B-6

BIB ID 265409

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

**B435b**

**Benevides, Gustavo Pereira**

Bioquímica e biomecânica dos tendões flexores digitais  
de frangos/Gustavo Pereira Benevides. --  
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Laurecir Gomes

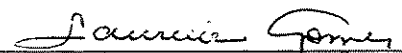
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

- 1.Frango. 2.Tendões. 3.Proteoglicanos. I. Gomes, Laurecir.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

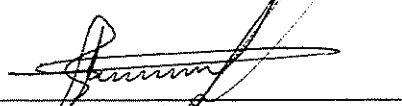
**Data da Defesa: 30/08/2002**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Laurecir Gomes (Orientadora)

  
Assinatura

Prof.Dr. Edson Rosa Pimentel

  
Assinatura

Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge

  
Assinatura

Prof. Dr. Roberto Vilarta

\_\_\_\_\_  
Assinatura

200250231

*"Parece que há duas sortes de vocação, as que têm língua e as que não as têm. As primeiras realizam-se; as últimas representam uma luta constante e estéril entre o impulso interior e a ausência de um modo de comunicação entre os homens"*

*Machado de Assis*

Dedico aos meus pais, Laurindo e Cleide, pelo incentivo, perseverança, confiança e amor incondicional.

Agradecimento especial ao meu grande amor Uyrá, a eterna companheira que me apoia em todas as minhas decisões e foi compreensiva com as minhas ausências e humores.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laurecir Gomes pela orientação científica, pela amizade, pelos ensinamentos diários e credibilidade.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pela amizade e a constante disposição em discutir os resultados e os textos científicos.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pela amizade, pela preocupação em sanar os problemas com os géis de agarose, pelo enriquecimento desse estudo com a inclusão da dosagem de hidroxiprolina, pelo uso do laboratório e pelas conversas metafísicas.

À Prof. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela amizade e por viabilizar minha morada.

Ao Prof Dr. Sérgio Marangoni e ao Dr. Marco Toyama, do Departamento de Bioquímica, pelo seqüenciamento N-terminal dos proteoglicanos.

Ao Técnico José Luís Lisboa, do Departamento de Engenharia de Materiais, pela realização dos testes de deformação dos tendões.

Às colegas Heloisa Colleta, Sílvia Pimentel e Eliane Antoniole pelo auxílio na dosagem de hidroxiprolina.

Ao Técnico Francisco Mallatesta pelo auxílio no laboratório.

Aos Secretários Lilliam Panagio e Sidnei Simões pelos préstimos.

Aos meus colegas de laboratório Frances, Adriano, Roberta e Ricardo pela convivência salutar.

À Karina, Adelina, Klélia, Ana, Odair e Carmem pelo companheirismo e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, à Fundação de Apoio ao Ensino e a Pesquisa - FAEP/UNICAMP e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa de estudos que permitiram a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo,                                                                                                                                                  | 01 |
| Abstract,                                                                                                                                                | 03 |
| Introdução,                                                                                                                                              | 04 |
| Objetivos,                                                                                                                                               | 17 |
| Referências,                                                                                                                                             | 18 |
| Artigo 1 - A presença de fibromodulim e decorim em tendões flexores digitais profundos e superficiais de frangos mantidos em ambiente restrito e amplo., | 24 |
| Resumo,                                                                                                                                                  | 25 |
| Introdução,                                                                                                                                              | 27 |
| Material e Métodos,                                                                                                                                      | 29 |
| Resultados,                                                                                                                                              | 32 |
| Discussão,                                                                                                                                               | 33 |
| Figura 01 - Aspectos anatômicos dos tendões flexores digitais de frangos.,                                                                               | 39 |
| Figura 02 - Dosagem de proteínas.,                                                                                                                       | 41 |
| Figura 03 - Cromatogramas e SDS-PAGE.,                                                                                                                   | 43 |
| Figura 04 - SDS-PAGE.,                                                                                                                                   | 45 |
| Figura 05 - Sequenciamento N-Terminal.,                                                                                                                  | 47 |
| Referências,                                                                                                                                             | 48 |
| Artigo 2 - Análise biomecânica e bioquímica do tendão de frangos mantidos em ambiente restrito e amplo.,                                                 | 54 |
| Resumo,                                                                                                                                                  | 55 |
| Introdução,                                                                                                                                              | 56 |
| Material e Métodos,                                                                                                                                      | 58 |
| Resultados,                                                                                                                                              | 61 |
| Discussão,                                                                                                                                               | 63 |
| Figura 01 - Aspecto anatômico do tendões flexor digital profundo de frangos.,                                                                            | 70 |
| Figura 02 - Equipamento TESTSTAR.,                                                                                                                       | 72 |
| Figura 03 - Propriedades mecânicas.,                                                                                                                     | 74 |
| Figura 04 - Curva força x deslocamento.,                                                                                                                 | 76 |
| Figura 05 - Curva tensão x deformação.,                                                                                                                  | 78 |
| Figura 06 - Intumescimento.,                                                                                                                             | 80 |
| Figura 07 - Dosagem de hidroxiprolina.,                                                                                                                  | 82 |
| Figura 08 - Dosagem de glicosaminoglicanos.,                                                                                                             | 84 |
| Figura 09 - Eletroforese dos glicosaminoglicanos.,                                                                                                       | 86 |
| Referências,                                                                                                                                             | 87 |
| Conclusões Gerais,                                                                                                                                       | 91 |

## RESUMO

Os tendões transferem forças entre os músculos e ossos. O tecido conjuntivo tendíneo muda suas propriedades mecânicas e estruturais respondendo às alterações de estresse como um fenômeno de adaptação funcional e otimização operacional. A característica peculiar do tecido conjuntivo é a presença de colágeno na matriz extracelular. A rede fibrosa colagênica é o principal elemento que provê a integridade mecânica tecidual em combinação com os proteoglicanos. Nesse estudo frangos da linhagem Hy-line foram divididos em dois grupos. Um grupo de animais foi mantido em gaiolas as quais restringia a deambulação e o outro grupo foi criado em um ambiente que possibilitava ampla locomoção. Os tendões flexores digitais profundos e superficiais foram retirados, de ambos os grupos de animais com 60 dias, para análises bioquímicas e do comportamento mecânico. Para as análises bioquímicas o tendão flexor superficial foi dissecado em três regiões de acordo com a situação anatômica, assim foram obtidas duas regiões de compressão, proximal e intermédia, e uma região de tração, distal. Do tendão profundo foi analisada a região intermediária a qual recebe eminentemente força de tração. As concentrações de proteínas, colágeno e glicosaminoglicanos foram diferentes entre os grupos de animais e as diversas regiões dos tendões. O condroitim sulfato foi o glicosaminoglicano predominante nas regiões de compressão e o dermatam sulfato na de tração. Dessas regiões, foram isolados dois pequenos proteoglicanos e identificados pelo seqüenciamento das suas porções N-terminal como sendo decorim e fibromodulim. Os tendões superficiais de ambos os grupos foram submetidos a testes de deformação sob tração onde foi verificado que os tendões provenientes dos animais de ambiente amplo apresentaram maior resistência a tração, menor deformação no pico de força e maior deslocamento total. Esses resultados demonstram que há diferenças bioquímicas entre as regiões de compressão e tração dos tendões dos animais e também foram notados os

efeitos positivos do exercício ativo não forçado nas propriedades mecânicas dos tendões dos animais de ambiente amplo.

## ABSTRACT

Tendons have function of transmitting tension forces from muscle to bones. The tendinous connective tissue changes their mechanical and structure properties in response to stress alteration as a phenomenon of functional adaptation and optimal operation. The peculiar characteristic of connective tissue is the presence of collagen in the extracellular matrix, providing the mechanical tissue integrity. The tendons are composed by a combination of collagen fibres and proteoglycans. In this study Hy-line chickens were randomly divided in two groups. One group was maintained in cages and the other group was raised in a wide environment. The animals were killed with 60 days old and the deep and superficial digital flexor tendons were analysed to identify the biochemical aspects and the mechanical behaviour. For the biochemical study the superficial digital flexor tendon was divided in proximal, intermediate and distal region. The proximal and intermediate regions bear compressive forces while the distal region withstands tensional forces. About the deep tendon was studied the intermediate region that receive only tensional forces. Comparing the two groups of animals and the several tendons regions, it was found a larger amount of proteins, collagen and glycosaminoglycans, in animals raised free than animals raised in cages. The chondroitin sulfate was prominent in compressive regions while dermatan sulfate was detected in tensional regions. The small proteoglycans, decorin and fibromodulin, were isolated and identified by analysis of N-terminal segments. A more expressive presence of decorin and fibromodulin were observed in chickens raised free, in relation to the caged chickens. The superficial tendons of both animals groups were submitted for tensile test and it was observed that the tendons of free animals showed more resistance to the tension, less deformation as the load increases and more displacement. Our biochemical and biomechanical studies showed that the physical exercise have positive effect on the strengthening of the tendons.

## INTRODUÇÃO

Tecidos e órgãos são dinâmicos mudando suas características estruturais em resposta às alterações de forças mecânicas como um fenômeno de adaptação funcional e otimização operacional, respondendo homeostaticamente às demandas mecânicas (HAYASHI, 1996). Desta forma, tanto o exercício como o desuso desencadeiam a remodelação tecidual, assim como a reparação de injúrias e a cicatrização (COWIN, 1993).

Analogamente, os tendões possuem características dinâmicas, sendo o elemento de conexão entre os músculos e os ossos, transmitindo a contração muscular e cargas externas (VOGEL & KOOB, 1989; SCHECHTMAN & BADER, 1997). O tendão é um tecido conjuntivo uniaxial, composto essencialmente por fibras colágenas altamente ordenadas, agrupadas paralelamente em feixes. Os feixes de fibras em conjunto com os fibroblastos do tendão são organizados em fascículos. O fascículo representa a maior unidade de subdivisão organizacional na hierarquia estrutural do tendão (PATTERSON-KANE *et al.*, 1998; SILVER *et al.*, 2000). O fibroblasto do tendão também é denominado tenócito, enquanto que a sua forma imatura é chamada de tenoblasto (JÓZSA & KANNUS, 1997). A regularidade do desenvolvimento do tendão e a manutenção dessa estrutura são determinadas pela integridade mecânica e seu funcionamento normal (BIRK & TRELSTAD, 1986) as quais são afetadas por mudanças significativas no meio ambiente mecânico (WOO *et al.*, 1990). Quando injuriados são capazes de reparação posterior e respondem ao exercício ou imobilização por alteração de suas forças elásticas (FRANK *et al.*, 1988) mudando a composição e a estrutura da matriz extracelular (CARVALHO, 1995; BENJAMIN & RALPHS, 1998).

Entre os fascículos existe uma região caracterizada pela presença de tecido conjuntivo frouxo denominado endotenônio. Esta região possui espessura variável agindo como um importante canal de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, além de possibilitar alguma

independência de movimento entre os fascículos (KAINBERGER *et al.*, 1997). Já o epitenônio é constituído por uma delgada bainha de tecido conjuntivo de variável proeminência que envolve todo o tendão (CHOWDHURY *et al.*, 1991). Assim, a bainha é formada por duas camadas cilíndricas, uma camada interna, a visceral, que repousa sobre a superfície do tendão e a parietal, separada por uma cavidade fluida. O tendão é invaginado para dentro da bainha de maneira que as camadas visceral e parietal sejam ligadas pelo mesotenônio. Nos tendões digitais, onde a excursão longitudinal dos tendões flexores é considerável, o mesotenônio é reduzido a fibras locais denominada vínculos. O paratenônio é uma falsa bainha que envolve o tendão mas é completamente separada deste (BENJAMIN & RALPHS, 2000), sendo uma condensação de tecido conjuntivo frouxo e adiposo.

A bainha sinovial permite que o tendão se movimente livremente, em reposta à contração muscular, principalmente em lugares onde os tendões passam por espaços restritos. Uma mudança de direção (*wrap-around*) causada por um acidente ósseo ou por uma polia fibrosa (ALEXANDER & DIMERY, 1985), aumenta a fricção do tendão e o paratenônio pode se dividir em duas camadas. Sua camada visceral, que está mais próxima do tendão, aumenta gradualmente de espessura a medida que a força de compressão vai se sobrepondo a de tensão (MERRILEES & FLINT, 1980). Nessas regiões é proeminente o desenvolvimento de fibrocartilagem (VOGEL & KOOB, 1989).

A fibrocartilagem é uma resposta adaptativa que protege o tendão frente a potenciais injúrias traumáticas estando correlacionada à presença de forças compressivas (WREN *et al.*, 1998). Um grande número de tendões fibrocartilaginosos vêm sendo documentados. No homem é bastante comum no tornozelo (BENJAMIN *et al.*, 1995), no boi no tendão flexor profundo (VOGEL *et al.*, 1999), em ratos (RALPHS *et al.*, 1992) e coelhos no tendão do quadríceps (BLAND & ASHHURST, 1997).

A unidade músculo-tendinosa engloba o músculo e o tendão propriamente dito, possuindo uma diversidade de regiões especializadas, onde se destaca a entese. Esta região de junção do tendão ao osso, está localizada tanto na origem da unidade músculo-tendinosa como na sua inserção. Esse tipo de especialização do tendão pode se formar por duas vias histologicamente distintas que são referidas como entese fibrosa e fibrocartilaginosa. As enteses fibrocartilaginosas são caracterizadas particularmente em tendões que se fusionam a epífises de ossos longos ou a ossos curtos. Esse tipo de entese contém quatro zonas diferenciadas: tecido conjuntivo denso fibroso com fibroblastos; zona não calcificada; zona calcificada de fibrocartilagem, que possui células fibrocartilaginosas; e o osso, que é caracterizado pelos osteócitos (BENJAMIN & RALPHS, 2000).

A entese fibrocartilaginosa também pode acompanhar ossos sesamóides ou fibrocartilagens periosteais. Essa formação fibrocartilaginosa é característica de regiões onde o ângulo de junção entre o tendão e o osso muda completamente ao longo do percurso do movimento articular. Os elementos fibrilares que compõe o tendão são expandidos na região de inserção, promovendo uma maior área de fixação (ELLIOTT, 1965). Esse tipo de entese promove a redução do desgaste do tendão pela dissipação do estresse ao longo da interface óssea (BENJAMIN & RALPHS, 1998).

Funcionalmente, as células fibrocartilaginosas localizadas na entese secretam para a matriz extracelular agregam e colágeno tipo II (BENJAMIN & RALPHS, 1999). Ambas moléculas existem na cartilagem articular e o agregam sequestra e acumula água, habilitando a cartilagem para resistir a compressão. A água é atraída para dentro do tecido devido a alta densidade de cargas negativas das moléculas de agregam, permitindo assim a formação de domínios com uma alta pressão osmótica (HEINEGÅRD & OLDBERG, 1993). A compressão que a fibrocartilagem recebe, assim como o arranjo estrutural apresentado, capacita a dissipação do estresse na interface tendão/osso. Frequentemente, a fibrocartilagem

é espessada na parte profunda da entese onde a curvatura é mais proeminente e está ausente superficialmente (WOO *et al.*, 1988).

As enteses fibrosas são tipicamente encontradas nas junções diafisárias dos ossos longos, onde a junção do tendão ao osso ou ao periósteo é realizada diretamente (BENJAMIN & RALPHS, 1998). Os fibroblastos são as células dominantes nas enteses fibrosas e de acordo com MATYAS e colaboradores (1995) sua ocorrência parece estar correlacionada com elevados níveis de forças tensionais.

Os fibroblastos são as células mais comuns nos tendões, sendo encontrados em todas as regiões: dentro dos fascículos, endotenônio, epitenônio, mesotenônio e paratenônio. Nos tendões, os fibroblastos são arranjados em fileiras alongadas e estas separadas por feixes de fibras de colágeno, sendo que as fileiras de fibroblastos apresentam processos horizontais que se estendem lateralmente em direção à outros processos que provêm de fileiras adjacentes (BENJAMIN & RALPHS, 1998).

Os processos laterais dos fibroblastos são ligados via junções *gap*. A junção comunicante do tipo *gap* permite a propagação de sinais gerados por estímulos de natureza mecânica (BOITANO *et al.*, 1992; BANES *et al.*, 1999). Desta maneira os fibroblastos criam um elaborado sistema de túneis segmentados através dos feixes de colágeno que estão dispostos longitudinalmente. Em virtude desses numerosos contatos, os fibroblastos formam uma rede de comunicação que se estende por todo tendão. A disposição dos fibroblastos é determinante na organização dos feixes de colágeno (BENJAMIN & RALPHS, 1999). Essas células são capazes de coordenar suas respostas às condições ambientais resultando em uma divisão celular ordenada e expressão de componentes da matriz (BANES *et al.*, 1999).

A forma e o arranjo dos fibroblastos no desenvolvimento dos tendões cria uma série de compartimentos distintos onde a matriz extracelular é depositada (BIRK & ZYCBAND, 1994; McNEILLY *et al.*, 1996). Nesses compartimentos ocorre a deposição de fibrilas de

colágeno e formação dos feixes de colágeno. Na matriz extracelular, as fibras de colágeno aumentam em espessura e predominantemente em comprimento (YOUNG *et al.*, 2000) e se fundem preferencialmente por associações laterais (BIRK *et al.*, 1995), promovendo uma continuidade ao longo da extensão do tendão garantindo assim integridade mecânica ao tecido (BIRK *et al.*, 1997). A associação entre as fibras de colágeno, promove o aumento da resistência do tendão (McBRIDE *et al.*, 1998) e está diretamente correlacionado com o aumento da tensão sobre essas fibras propiciando a formação de *crosslinks* adicionais entre as moléculas de colágeno (SILVER *et al.*, 2000).

Na interface com o músculo, o tendão apresenta um outro tipo de especialização denominada de junçãomiotendinosa. Essa junção ocorre na interação entre as fibras musculares e as fibras do tendão e é ampliada pela interface entre o músculo e o tecido conjuntivo ao longo da extensão do músculo. Assim a transmissão da força da contração muscular ao tendão ocorre ao longo de todo o comprimento da fibra muscular e não só pela própria junçãomiotendinosa (BENJAMIN & RALPHS, 2000).

A transmissão da força muscular depende em última análise das associações transmembrana entre os filamentos de actina e as fibras de colágeno do tipo I (TIDBALL, 1991). Na junçãomiotendinosa se encontra uma das maiores especializações estrutural e molecular das células e da matriz extracelular. Esta íntima associação entre os componentes fibrilares do tendão e a superfície das fibras musculares é promovida pela lâmina basal (JÓZSA *et al.*, 1997). As membranas das células musculares são altamente envolvidas pelo tecido conjuntivo, assim a área de superfície de contato com o tendão é aumentado de 10 a 50 vezes (OVALLE, 1987).

A velocidade e a duração da contração das fibras musculares podem influenciar relativamente no tamanho do ventre muscular como também no tendão. A diferenciação do tipo de contração, que depende do tipo de fibra muscular (tônica ou fásica), vai definir a

estrutura e composição celular da junção miotendinosa (BOZYCZKO *et al.*, 1989). Essa velocidade de contração intrínseca das fibras musculares está relacionada com a atividade específica de suas miosinas ATPase (GOLDSPINK *et al.*, 1991).

A reunião tecido-específica na matriz extracelular resulta em distintas propriedades estruturais e funcionais (EZURA *et al.*, 2000). Moléculas de diferentes naturezas são exportadas para o meio extracelular onde formam complexos macromoleculares. De acordo com a organização, quantidade e propriedades dessas macromoléculas na matriz, é possível obter uma diversidade de formas adaptadas às necessidades de cada tecido (CHIQUET, 1999).

Dois componentes principais são distinguidos na matriz extracelular. Os componentes fibrilares que são as fibras colágenas, as elásticas e as microfibrilas, e os não fibrilares que são representados pelos proteoglicanos e proteínas não colagênicas (VOGEL & MEYERS, 1999).

Pelo menos 30% do peso úmido do tendão é constituído por colágeno (SCHECHTMAN & BADER, 1997), representando de 65 a 80% do peso deste tecido (LIU *et al.*, 1995). A molécula de colágeno tem uma estrutura alongada e rígida. Possui três cadeias polipeptídicas, denominadas  $\alpha$ , ricas em prolina e glicina que formam uma fita tripla helicoidal (KADLER *et al.*, 1996; KER *et al.*, 1999).

As fibras de colágeno são estruturas heteropoliméricas, ou seja, contém mais de um tipo de colágeno fibrilar e macromoléculas associadas à superfície fibrilar (BIRK & LINSSENMAYER, 1994). As moléculas de colágeno são reunidas em um arranjo quaternário escalonado promovendo estriações nas fibrilas que possui uma periodicidade em torno de 67nm (EZURA *et al.*, 2000). A transição de zonas de tensão às zonas de compressão reflete também na periodicidade das estriações axiais, onde as zonas que suportam pressão possuem estriações fibrilares menores do que as zonas tensionais (MERRILEES & FLINT, 1980).

Atualmente são descritos vinte e três tipos de colágeno estruturalmente distintos (GORDON *et al.*, 2000), sendo que a diferença é baseada na composição de aminoácidos, nos domínios de cada molécula e nos diferentes arranjos estruturais (van der REST & GARRONE, 1991).

Os colágenos tipo I, II, III, V e XI são os mais abundantes nos tecidos conjuntivos, como por exemplo, no tendão, córnea e derme (KER, 1999). Especificamente, no tendão predomina o tipo I (BIRK *et al.*, 1996), porém os tipos V (JIMENEZ *et al.*, 1978), III (HERMANN *et al.*, 1980) e XIV (YOUNG *et al.*, 2000) também estão presentes. No tendão o colágeno tipo I é o maior responsável pela estabilidade estrutural e mecânica atribuída a esse tecido (EZURA *et al.*, 2000). O colágeno tipo II está presente tanto na cartilagem hialina como também é característico de enteses adultas (MESSNER, 1998). O tipo III está relacionado ao controle do diâmetro fibrilar e compõe fibrilas heterotípicas com os tipos I e V. O tipo VI é encontrado na parte mediana e na entese do tendão do calcâneo, como também, na inserção dos ossos sesamóides e fibrocartilagens periosteais (WAGGETT *et al.*, 1998). O tipo XIV participa na regulação do crescimento e associação fibrilar (YOUNG *et al.*, 2000).

Em tendão bovino, o conteúdo de colágeno nas regiões de tensão, está em torno de 82%, enquanto que nas regiões de compressão o conteúdo diminui a 69% do seu peso seco (KOOB & VOGEL, 1987). A maior quantidade de colágeno, em ambas regiões é do tipo I, entretanto o tipo II também está presente em regiões de compressão do tendão de boi. Os tipos de colágeno IX e X estão presentes tanto na cartilagem articular como em região de compressão dos tendões (VOGEL & KOOB, 1989).

Os proteoglicanos, outro componente da matriz extracelular dos tendões, são constituídos basicamente por um esqueleto protéico central ao qual estão ligados covalentemente uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. A variabilidade molecular observada, tanto no esqueleto protéico quanto nas diferentes classes de glicosaminoglicanos

ligados, permite que os proteoglicanos desempenhem diversas funções nos tecidos (IOZZO & MURDOCH, 1996). Os glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídicas não ramificadas, compostas de unidades repetidas de dissacarídeos. Nos dois açúcares do dissacarídeo repetido, um é sempre aminado e normalmente sulfatado e o outro é geralmente um ácido urônico com exceção do queratam sulfato que tem galactose em vez de ácido urônico. Devido aos grupos sulfato e carboxila, os glicosaminoglicanos são carregados negativamente (REID & FLINT, 1974; KOOB & VOGEL, 1987).

O colágeno fibrilar e os proteoglicanos estão associados formando as fibrilas e o colágeno tipo VI e as glicoproteínas podem interagir com o colágeno na matriz interfibrilar (BIRK *et al.*, 1996; van der REST & GARRONE, 1991). Esses componentes possuem o papel de estabilizar as fibras de colágeno e mediar interações com outros componentes da matriz, afim de assegurar o desenvolvimento e a maturação tecidual (BIRK & LINSSEN, 1994).

Os pequenos proteoglicanos estão envolvidos com a montagem das fibras de colágeno, podendo tanto influenciar na organização das fibras por alteração do padrão nas quais essas se formam, quanto no tamanho final da fibra de colágeno (KUC & SCOTT, 1997). Os proteoglicanos representam menos de 1% do peso seco nos tecidos fibrosos. Os grandes proteoglicanos são representados principalmente pelo agrecan e o versican e são uma pequena parcela do total de proteoglicanos presentes nos tendões (EVANKO & VOGEL, 1990). Nos pequenos proteoglicanos destaca-se o decorin, biglican, fibromodulin e o colágeno tipo IX.

O decorin está provavelmente presente em todos os tecidos conjuntivos fibrosos. No tendão flexor bovino adulto este pequeno proteoglicano representa 1% do peso de tecido seco (VOGEL & MEYERS, 1999). O decorin, *in vitro*, reduz o padrão de crescimento fibrilar e aumenta o diâmetro, de 27 a 66%, das fibras formadas. A interação do decorin com o

colágeno não depende das cadeias de glicosaminoglicanos mas do componente protéico e de uma conformação nativa estabilizada por pontes de dissulfeto (VOGEL *et al.*, 1984; SCOTT *et al.*, 1986). BIRK e colaboradores (1995) correlacionaram o crescimento das fibras tendíneas, *in situ*, com a diminuição do percentual de decorim. Assim, o decorim encontrado nos tecidos conjuntivos fibrosos pode aumentar o diâmetro das fibras de colágeno tipo I, resultando em um tecido mais adaptado em resistir às forças tensionais. A segregação desse proteoglicano é proporcional ao estímulo tensional que as células residentes recebem no tecido (KUC & SCOTT, 1997).

O decorim possui uma e o biglicam duas cadeias de glicosaminoglicanos que podem ser de condroitim ou dermatam sulfato dependendo da localização das moléculas; suas cadeias protéicas possuem grande homologia no conteúdo e na sequência de aminoácidos (HEINEGÅRD & PIMENTEL, 1992). Em tendão (SCOTT & ORFORD, 1981), pele (KUC & SCOTT, 1997), esclera (CÖSTER & FRANSSON, 1981) e cartilagem (ROSENBERG *et al.*, 1985) o glicosaminoglicano ligado à proteína central no decorim é o dermatam sulfato. O biglicam não faz associações com as fibrilas de colágeno (GALLAGHER, 1989) mas é encontrado na matriz extracelular de cartilagem, menisco e outros tecidos conjuntivos, entretanto sua função não é esclarecida (OLDBERG *et al.*, 1989).

O fibromodulim, que facilita a condução progressiva de crescimento das fibras de colágeno maduras (EZURA *et al.*, 2000), é membro de uma subfamília de proteoglicanos e possui um domínio estrutural de leucinas repetidas (IOZZO, 1999). O fibromodulim, na sua porção protéica, é homóloga ao decorim e biglicam (OLDBERG *et al.*, 1989), e sua interação com o colágeno não depende de glicosaminoglicanos uma vez que sua proteína central por si só é capaz de ligar-se ao colágeno e atuar na fibrilogênese (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989). O fibromodulim contém queratam sulfato sendo encontrado nos mais variados tecidos, incluindo tendões (OLDBERG *et al.*, 1989). Com a progressão da fibrilogênese a

concentração de fibromodulim cresce significativamente (SVENSSON *et al.*, 2000). Em tendões de ratos a quantidade de proteína central do fibromodulim aumenta de 30 a 40% do quarto dia ao primeiro mês de vida do animal (EZURA *et al.*, 2000). No tendão flexor bovino adulto este pequeno proteoglicano representa 0,6% do peso de tecido seco (VOGEL & MEYERS, 1999).

O colágeno tipo IX é considerado um pequeno proteoglicano, pois possui uma cadeia de condroitim sulfato ligado covalentemente à proteína central. Encontrado em cartilagens, pode interagir com o colágeno tipo II para modular a associação das fibrilas, além de estabilizar e de ligar diferentes fibrilas (SCOTT *et al.*, 1997; KNUDSON & KNUDSON, 2001).

A presença dos grandes proteoglicanos nos sítios que recebem forças de compressão é estimulada por essas próprias forças. Assim, a força de compressão estimula e mantém a síntese de grandes proteoglicanos em regiões especializadas do tendão e a força de tensão também pode desempenhar um papel regulatório na determinação do tipo de proteoglicanos produzido pelo tendão (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985, KOOB & VOGEL, 1987 e EVANKO & VOGEL, 1990).

As fibrocartilagens também são encontradas nas zonas de fixação de tendões e ligamentos aos ossos, fornecendo uma transição gradual das propriedades mecânicas entre eles e geralmente apresentam um acúmulo de glicosaminoglicanos que promove maior retenção de água na matriz contribuindo para elevar a resistência à compressão no tecido (WOO, 1988).

Em tendão flexor bovino, sujeito apenas às forças de tensão, os proteoglicanos perfazem menos de 1% do seu peso seco e predominantemente são os pequenos proteoglicanos contendo dermatam sulfato (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985, VOGEL *et al.*, 1986 e EVANKO & VOGEL, 1990). Ao passar próximo da articulação dos dedos, o tendão

fica exposto também às forças de compressão, nessa região o conteúdo de proteoglicanos é 3 a 5 vezes maior e mais de 50% são grandes proteoglicanos que contêm condroitim sulfato e queratam sulfato e esses ainda são capazes de interagir com ácido hialurônico.

As relações entre o diâmetro da fibra de colágeno e os vários tipos de forças que o tendão pode sofrer estão diretamente correlacionadas aos diferentes tipos de agregados de proteoglicanos. Em regiões de tensão, onde as fibras de colágeno são predominantemente mais espessas, o tendão contém menos de 0,2% de glicosaminoglicano do seu peso seco, dos quais 60% são dermatam sulfato. Em regiões de compressão, as fibras de colágeno são principalmente finas e o conteúdo de glicosaminoglicano é de 3,5%, dos quais 65% são condroitim sulfato (MERRILEES & FLINT, 1980). Em coelho, na região de tensão do tendão flexor digital profundo, os glicosaminoglicanos representam 0,05%, do peso seco, enquanto que 0,75% está presente nas regiões de compressão (GILLARD *et al.*, 1977). No tendão de cão, a região de tensão apresenta 0,1% de glicosaminoglicanos enquanto que a de compressão 1,5% do peso seco (OKUDA *et al.*, 1987). Esses dados corroboram com VOGEL e KOOB (1989) que afirmam que em regiões de compressão o conteúdo de glicosaminoglicanos é aproximadamente dez vezes maior do que em regiões de tensão.

Em regiões onde o tendão sofre forças de compressão e fricção além da força tensional, ocorre a presença de grandes proteoglicanos, os quais são similares aos das cartilagens em volume hidrodinâmico pela existência de queratam sulfato, condroitim sulfato e ácido hialurônico (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985). A manutenção do arranjo, em forma de rede, dos feixes de colágeno nessa região é diretamente relacionada à continuidade do estímulo compressivo (EVANKO & VOGEL, 1990). Na região de tensão, o colágeno forma feixes alinhados enquanto que na de compressão uma rede de fibrilas (VOGEL *et al.*, 1986). Em regiões de tensão, nos tendões, predominam os pequenos proteoglicanos, cerca de 90% do

total de proteoglicanos, em contrapartida, nas regiões de compressão, 68% são grandes proteoglicanos (VOGEL & KOOB, 1989).

Alguns tendões apresentam variações na composição da matriz extracelular ao longo de sua estrutura, algumas vezes sem caracterizar alterações morfológicas evidentes. Essas variações resultam de adaptações a diferentes situações biomecânicas que ocorrem ao longo de seu percurso desde a inserção miotendinosa a inserção óssea (CURWIN *et al.*, 1994; BENJAMIN & RALPHS, 2000). Essas variações foram observadas em diferentes animais. Em coelhos, MERRILEES e FLINT (1980) verificaram que o tendão *flexor digitorum profundus* está sujeito a forças de compressão e de fricção na região que está em contato com calcâneo e talus. Nesta área sujeita às forças de compressão, a matriz desenvolve uma organização fibrocartilaginosa, com maior concentração de glicosaminoglicanos. Características ultraestruturais das células, do arranjo dos feixes colágeno, e da matriz como um todo nessa área sob pressão e tração são diferentes da encontrada em regiões onde só existem forças de tensão. Esses dados suportaram o conceito de que as células nessas regiões são sensíveis e respondem às mudanças de forças biomecânicas (GILLARD *et al.*, 1979). Em cães, OKUDA e colaboradores (1987) estudaram a composição da matriz de seis regiões anatômicas do tendão *flexor digitorum profundus* e correlacionaram a atividade e composição da matriz com forças mecânicas que atuam em cada região, pois este tendão está sujeito a forças compressão e desenvolvem uma fibrocartilagem.

Durante a locomoção, o sistema músculo-esquelético está sujeito à uma constante carga, o peso corpóreo. O movimento é ativado pela contração muscular e conseqüentemente produção de torque em torno das articulações dos membros inferiores. Cada unidade músculo-tendinosa produz uma força cíclica com um valor máximo constante, que é proporcional à carga externa. Devido ao tônus muscular, uma pequena tensão está sempre presente requerendo que as unidades músculo-tendinosas estejam tensas mesmo quando o músculo está

relaxado (SCHECHTMAN & BADER, 1997). Entretanto, quando os tendões estão sujeitos a prolongadas cargas, quer constantes ou oscilatórias, ocorre um acúmulo de fadiga. Para cada tipo de estresse, o tendão, promove uma adaptação apropriada e proporcional ao estresse ocorrido (KER *et al.*, 2000). Nesse estudo, frangos da linhagem Hy-line foram submetidos à duas áreas para a deambulação, um grupo de animais foi criado em gaiolas de 0,5m<sup>2</sup>, enquanto outro foi criado em ambiente amplo de 40m<sup>2</sup>. Esse último grupo, além de suportar a carga do peso corpóreo que é idêntica ao grupo de ambiente restrito, também praticou atividades como ciscar e correr, porém o exercício ativo não forçado foi a diferença crucial entre os grupos estudados.

Nos galináceos, os tendões flexores digitais são dispostos em duas camadas, uma profunda e outra superficial. Ambas camadas tem como função flexionar os artelhos e a superficial também de estender o tarsometatarso (KING, 1981). Duas protuberâncias ósseas promovem força de compressão durante a excursão do tendão superficial, na região proximal quando o tendão cruza a articulação *tibiotarsus* ele é comprimido por um sesamóide do tendão do músculo *calcaneus communis* e na região intermédia existe uma protuberância óssea, o *hipotarsus*, que promove pressão sobre essa região do tendão. Porém a região distal do tendão superficial e a maior porção do tendão profundo recebem exclusivamente forças tracionais (KOCH, 1973; GHETIE *et al.*, 1981; KING, 1981).

Pouco se sabe sobre tendões de aves. As aves, animais bípedes, têm nos tendões um modelo biológico para se estudar a estrutura e organização das moléculas de matriz extracelular que apresentam propriedades mecanofisiológicas que dependem do grau de agregação e ordem molecular dos seus componentes (VIDAL, 1986). A simplicidade aparente de um tendão deve ser questionada dada a sua resistência e flexibilidade. Sua plasticidade frente às variações biomecânicas é de extrema importância no que tange a proteção do sistema ósteo-muscular.

## OBJETIVOS

A finalidade desse trabalho foi estudar os componentes bioquímicos da matriz extracelular das regiões de tração e compressão dos tendões flexores digitais profundos e superficiais de frangos da linhagem Hy-line que foram mantidos em dois ambientes distintos, um dos ambiente restringia a deambulação enquanto o outro propiciava uma ampla locomoção. Além de correlacionar a composição da matriz extracelular das diversas regiões dos tendões também foi analisado o comportamento sob tração para se averiguar a resistência e a deformação dos tendões superficiais.

## REFERÊNCIAS

- Alexander, R. McN. and Dimery, N. J. 1985. The significance of sesamoids and retroarticular processes for the mechanics of joints. *J. Zool., (A)* **205**:375-371.
- Banes, A. J., Weinhold, P., Yang, X., Tsuzaki, M. D. D. S., Bynum, Bottlang, M. and Brown, T. 1999. Gap junctions regulate responses of tendon cells ex vivo to mechanical loading. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **367S**: 356-370.
- Benjamin, M., Qin, S. and Ralphs, J. R. 1995. Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys. *J. Anat.*, **187**: 625-633.
- Benjamin, M. and Ralphs, J. R. 1998. Fibrocartilage in tendons and ligaments - an adaptation to compressive load. *J. Anat.*, **193**: 481-495.
- Benjamin, M. and Ralphs, J. R. 1999. The attachment of tendons and ligaments to bone. In: C. W. Archer, B. Caterson, M. Benjamin and J. R. Ralphs (eds.) *Biology of the synovial joint*. Gordon and Breach, Amsterdam, pp.361-371.
- Benjamin, M. and Ralphs, J. R. 2000. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.*, **196**: 85-130.
- Birk, D. E., Hahn, R. A., Linsenmayer, C. Y. and Zycband, E. I. 1996. Characterization of fibril segments from chicken embryo cornea, dermis and tendon. *Matrix Biol.*, **15**: 111-118.
- Birk, D. E. and Linsenmayer, T. F. 1994. Collagen fibril assembly, deposition, and organization into tissue-specific matrices. In: P. D. Yurchenco, D. E. Birk and R. P. Mecham (eds.) *Extracellular matrix assembly and structure*. Academic Press, Inc., New York, pp. 91-128.
- Birk, D. E., Nurminskaya, M. V. and Zycband, E. 1995. Collagen fibrillogenesis in situ: Fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev. Dyn.*, **202**: 229-243.
- Birk, D. E. and Trelstad, R. L. 1986. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle and macroaggregate formation. *Cell Biol.*, **103** (1): 231-240.
- Birk, D. E. and Zycband, E. 1994. Assembly of the tendon extracellular matrix during development. *J. Anat.*, **184**: 457-463.
- Birk, D. E., Zycband, E., Woodruff, S., Winkelmann, D. A. and Trelstad, R. L. 1997. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Dev. Dyn.*, **208**: 291-298.
- Bland, Y. S. & Ashhurst, D. E. 1997. Fetal and postnatal development of the patella, patellar tendon and suprapatella in the rabbit: changes in the distribution of the fibrillar collagens. *J. Anat.*, **190**: 327-342.

- Boitano, S., Dirksen, E. R. and Sanderson, M. J. 1992. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol triphosphate. *Science*, **258**: 292-295.
- Bozyczko, D., Decker, C., Muschler, J. and Horwitz, A. F. 1989. Integrin on developing and adult skeletal muscle. *Exp. Cell Res.*, **183**: 72-91.
- Carvalho, H. F. 1995. Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. *J. Theor. Biol.*, **172**: 293-297.
- Chiquet, M., 1999. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.*, **18**: 417-426.
- Chowdhury, P., Matyas, J. R. & Frank, C. B. 1991. The "epiligament" of the rabbit medial collateral ligament: A quantitative morphological study. *Connect. Tissue Res.*, **27**: 33-50.
- Cöster, L and Fransson, L-Å. 1981. Isolation and characterization of dermatan sulphate proteoglycans from bovine sclera. *Biochem. J.*, **193**: 143-153.
- Cowin, S. C. 1993. Nature's structural engineering of bone on a daily basis. In: Bodner, S. R., Singer, J., Solan, A. and Hashin, Z. (ed) *Theoretical and Applied Mechanics*. Amsterdam, Elsevier, pp. 145-160.
- Curwin, S. L., Roy, R. R. and Vailas, A. C. 1994. Regional and age variation in growing tendon. *J. Morphol.*, **221**: 309-320.
- Elliott, D. H. 1965. Structure and function of mammalian tendon. *Biol. Revs.*, **10**: 392-421.
- Evanko, S. P. and Vogel, K. G. 1990. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix.*, **10**: 420-436.
- Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I. & Birk, D. E. 2000. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *Cell Biol.*, **151** (4): 779-787.
- Frank, C., Woo, S., Andriacchi, T., Brand, R., Oakes, B. and Dahners, L. 1988. Normal ligament: structure, function and composition. In: Woo, S.L.-Y. (ed.) *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Buckwalter, JA, American Academy of Orthopaedic Surgery, pp. 45-101.
- Gallagher, J. T. 1989. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1**: 1201-1218.
- Ghetie, V., Chitescu, St., Cotofan, V. and Hillebrand, A. 1981. *Atlas de anatomía de las aves domésticas*. Acribia-Paraninfo, Zaragoza and Madrid, 294pp.
- Gillard, G. C., Merrilees, M. J., Bell-Booth, P. G., Reilly, H. C. and Flint M. H. 1977. The proteoglycan content and the axial periodicity of collagen in tendon. *Biochem.*, **173**: 145-151.

- Gillard, G. C., Reilly, H. C., Bell-Booth, P. G. and Flint M. H. 1979. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycans content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect. Tissue Res.*, **7**: 37-46.
- Goldspink, G., Scutt, A., Martindale, J., Jaenicke, T., Turay, L. and Gerlach, G.F. 1991. Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal-muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, **19** (2): 368-373.
- Gordon, M. K., Gerecke, D. R., Hahn, R. A., Bhatt, P., Goyal, M. and Koch, M. 2000. Cloning of a new collagen, type XXIII, expressed in cornea. *Invest. Ophthalmol.*, **41**(4): 3997.
- Hayashi, K. 1996. Biomechanical studies of the remodeling of knee joint tendons and Ligaments. *J. Biomech.*, **29** (6): 707-716.
- Hedbom, E. and Heinegård, D. 1989. Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6869-6905.
- Heinegård, D. and Oldberg, A. 1993. Glycosylated matrix proteins. In: P. M. Royce and B. Steinmann (eds.) *Connective tissue and its heritable disorders*. Wiley-Liss, New York, pp.189-209.
- Heinegård, D. and Pimentel, E. R. 1992. Cartilage Matrix Proteins. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. Küttner, K. et al. (eds) Raven Press, NY.
- Hermann, H., Dessau, W., Fessler, L. I. and von der Mark, K. 1980. Synthesis of types I, III and AB2 collagen by chicken tendon fibroblasts in vitro. *Eur. Biochem.*, **105**: 63-74.
- Iozzo, R. V. 1999. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**: 18843-18846.
- Iozzo, R. V. and Murdoch, A. D. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB.*, **10**: 598-614.
- Józsa, L. G. and Kannus, P. 1997. Human tendons. *Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaign, IL. Human Kinetics.
- Jimenez, S. A., Yankowski, R. and Bashey, R. I. 1978. Identification of two new collagen alpha chains in extracts of lathyric chick embryo tendons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**: 1298-1306.
- Kadler, K. E., Hlomes, D. F., Trotter, J. A. and Chapman, J. A. 1996. Collagen fibril formation. *Biochem.*, **316**: 1-11.
- Kainberger, F., Mittermaier, F., Seidl, G. Parth, E. and Weinstabl. 1997. Imaging of tendons - adaptation, degeneration, rupture. *Eur. Radiology*, **25**: 209-222.

- Ker, R. F., 1999. The design of soft collagenous load-bearing tissues. *J. Exp. Biol.*, **202**: 3315-3324.
- Ker, R. F., Wang, X. T. and Pike, A. V. L. 2000. Fatigue quality of mammalian tendons. *J. Exp. Biol.*, **203**: 1317-1327.
- King, A. S. 1981. Introdução às aves. In: S. Sisson and D. Grossman (ed) *Anatomia dos Animais Domésticos*. pp. 1678-1727.
- Knudson, C. B. and Knudson W. 2001. Cartilage proteoglycans. *Cell Dev. Biol.*, **12**: 69-78.
- Kock, T. 1973. Locomotion System. In: B. H. Skold and L. DeVries (ed.) *Anatomy of the Chicken and Domestic Birds*. Ames, Iowa, USA, The Iowa State University Press, pp. 6-60.
- Koob, T. J. and Vogel, K. G. 1987. Site related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J. Orthop. Res.*, **5**: 414-424.
- Kuc, I. M. and Scott, P. G. 1997. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect. Tissue Res.*, **36** (4): 287-296.
- Liu, S. H., Yang, R. S., Shaikh, R. and Lane, J. M. 1995. Collagen in tendon, ligament and bone healing. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **318**: 265-278.
- Matyas, J. R., Anton, M. G., Shrive, N. G. and Frank, C. B. 1995. Stress governs tissue phenotype at the femoral insertion of the rabbit MCL. *J. Biomechan.*, **28**: 147-157.
- Messner, K. 1998. The postnatal development of the cruciate ligament insertions in the rat knee. *Trans. Orthop. Res. Soc.*, **23**: 712.
- McBride, D. J., Trelstad, R. L. and Silver, F. H. 1998. Structural and mechanical assessment of developing chick tendon. *Int. Biol. Macromol.*, **10**: 194-200.
- McNeilly, C. M., Banes, A. J., Benjamin, M. and Ralphs, L. R. 1996. Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J. Anat.*, **189**: 593-600.
- Merrilees, M. J. and Flint, M. H. 1980. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am. Anat.*, **157**: 87-106.
- Okuda, Y., Gorski, J. P. and Amadio, P. C. 1987. Effect of postnatal age on the Ultrastructure of six anatomical areas of canine flexor digitorum profundus tendon. *J. Orthop. Res.*, **5**: 231-241.
- Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K. and Heinegård, D. 1989. A collagen-binding 59kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO.*, **8**: 2601-2604.

- Ovalle, W. K. 1987. The human muscle-tendon junction. *Anat. Embryol.*, **176**: 281-294.
- Patterson-Kane, J. C., Firth, E. C., Parry, A. D., Wilson, A. M. and Goodship, A. E. 1998. Effects of training on collagen fibril populations in the suspensory ligament and deep digital flexor tendon of young Thoroughbreds. *AJVR.*, **59**: 64-68.
- Ralphs, J. R., Tyers, R. N. S. & Benjamin, M. 1992. Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat: The suprapatella and the attachment to the patella. *Anat. Embryol.*, **185**: 181- 187.
- Reid, T. and Flint, M. H. 1974. Changes in glycosaminoglycan content of healing rabbit tendon. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **31**(2): 489-495.
- Rosenberg, L. C., Choi, H. U., Tang, L. H., Johnson, T. L., Pal, S., Webber, C., Reiner, A. and Poole, A. R. 1985. Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J. Biol. Chem.*, **260**: 6304-6313
- Schechtman, H. and Bader, D. L. 1997. In vitro fatigue of human tendons. *J. Biomech.*, **30** (8): 829-835.
- Scott, J. E. and Hughes, E. W. 1986. Proteoglycan-collagen relationships in developing chick and bovine tendons: Influence of the physiological environment. *Connect. Tissue Res.*, **14**: 267-378.
- Scott, J. E., Orford, C. R. and Hughes, E. W. 1981. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tails tendon. An electron-microscopical and biochemical investigation. *Biochem.*, **195**: 573-581.
- Scott, P. G., Nakano, T. and Dodd, C. M. 1997. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochem. Biophys. Acta Gen.*, **1336**: 254-262.
- Silver, F. H., Christiansen, D. L., Snowhill, P. B. and Chen, Y. 2000. Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. *Connect. Tissue Res.*, **41** (2): 155-164.
- Svensson, L., Narlid, I. and Oldberg, A. 2000. Fibromodulin and bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS.*, **470**: 178-182.
- Tidball, J. G. 1991. Force transmission across muscle cell membranes. *J. Biomech.*, **24** (suppl.): 43-52.
- Van Der Rest, M. and Garrone, R. 1991. Collagen family of proteins. *FASEB.*, **5**: 2814-2823.
- Vidal, B. C. 1986. Evaluation of carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell Mol. Biol.*, **32**: 527-535.
- Vogel, K. G. and Heinegård, D. 1985. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J. Biol. Chem.*, **260**: 9298-9306.

- Vogel, K. G., Keller, E. J., Lenhoff, R. J., Campbell, K. and Koob, T. J. 1986. Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Eur. Cell Biol.*, **41**: 102-112.
- Vogel, K. G. and Koob, T. J. 1989. Structural specialization in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.*, **115**: 267-293.
- Vogel, K. G. and Meyers, B. 1999. Proteins in the tensile region of adult bovine deep flexor tendon. *Clin. Orthop. Relate. Res.*, **367S**: 344-355.
- Vogel, K. G., Paulsson, M. and Heinegård, D. 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem.*, **223**: 587-597.
- Waggett, A. D., Ralphs, J. R., Kwan, A. P. L., Woodnutt, D. and Benjamin, M. 1998. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol.*, **16**: 457-470.
- Woo, S., Maynard, J., Butler, D., Lyon, R., Torzilli, P., Akeson, W., Cooper, R. and Oakes, B. 1988. Ligament, tendon and joint capsule insertions to bone. In: S. L.-Y. Woo and J. A. Buckwalter (eds.) *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Am. Acad. Orthop., Park Ridge, Illinois, pp.133-166.
- Woo, S. L.-Y., Wang, C. W., Newton, P. O. & Lyon, R. M. 1990. The response of ligaments to stress deprivation and stress enhancement - biomechanical studies. In: D. Daniel, W. H. Akeson, & J. J. O'conner, (eds) *Knee ligaments: Structure, Function, Injury and Repair*. New York, USA, Raven Press, pp. 337-350.
- Wren, T. A. L., Beaupré, G. S. and Carter, D. R. 1998. Adaptive metaplasia protects tendons from mechanical damage. *Trans. Orthop. Res. Soc.*, **23**: 632.
- Young, B. B., Gordon, M. K. and 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.

## **ARTIGO 1**

**A PRESENÇA DE FIBROMODULIM E DECORIM EM TENDÕES FLEXORES  
DIGITAIS PROFUNDOS E SUPERFICIAIS DE FRANGOS MANTIDOS EM  
AMBIENTE RESTRITO E AMPLO**

**RESUMO**

Diversos estudos têm relacionado diferenças bioquímicas na matriz extracelular de tendões em função de variados programas de treinamento físico ou de diferentes graus de imobilidade, porém raras são as pesquisas em que a interferência é meramente resultante da extensão da área onde os animais são alocados e o exercício é voluntário. A proposta desse estudo foi analisar os componentes da matriz extracelular de tendões de frangos mantidos em ambiente restrito e amplo. As regiões metatarsais (**P**) dos tendões flexores digitais profundos do frango recebem forças eminentemente tracionais, como também o tendão do músculo flexor digital superficial é sujeito a tais tipos de forças tracionais por toda sua extensão, porém em uma zona localizada, onde contorna a articulação *tibiotarsus* ele sofre forças compressivas adicionais às forças de tração. Nesse estudo foram analisadas as regiões; *proximal* (**Sp**), *intermédia* (**Si**) e *distal* (**Sd**) do tendão flexor digital superficial e a região metatarsal do tendão flexor digital profundo. As regiões **Sp** e **Si** se caracterizam por receberem forças de compressão além da tração, enquanto que as demais regiões estudadas só recebem forças de tração. Após extração com cloridrato de guanidina, os componentes da matriz extracelular dos dois tendões foram fracionados em cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica e analisados por eletroforese. Dois componentes com 60 e 70kDa foram identificados, a partir da análise da região N-terminal, como sendo os pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim, respectivamente. A presença destes pequenos proteoglicanos foi mais marcante nas regiões **Sp** e **Si** onde se concentram forças de compressão. Comparando os animais criados em ambiente amplo e restrito, a expressão de

fibromodulim e decorim foi mais acentuada nos animais de ambiente amplo, especialmente na região Si. Quantidades maiores de proteínas foram encontradas nos extratos dos tendões criados em ambiente amplo, exceto na região Si, onde curiosamente uma maior concentração de proteínas esteve presente no extrato dos animais de ambiente restrito. O conjunto dos resultados obtidos sugere que as variações regionais dos componentes da matriz extracelular do tendão podem ser causadas pelas diferentes situações anatômicas, biomecânicas, demandas funcionais e ambientais que o tendão sofre ao longo do seu percurso.

## INTRODUÇÃO

Os tendões exibem resistência à tração para desenvolverem sua função que é transmitir a força criada pela contração muscular ao osso promovendo assim o movimento das articulações (Viidik, 1996; Schechtman and Bader, 1997).

Os tendões possuem características dinâmicas, isto é, respondem homeostaticamente às demandas mecânicas (Hayashi, 1996). A remodelação tecidual do tendão pode ocorrer com o exercício, o desuso, a reparação de injúrias e a cicatrização (Frank et al., 1988; Woo et al., 1988; Cowin, 1993). Esse comportamento dinâmico sugere que os fibroblastos são sensíveis e respondem às mudanças mecânicas alterando a composição da sua matriz extracelular (Benjamin and Ralphs, 1998; Chiquet, 1999).

O tendão é um tecido conjuntivo uniaxial, composto predominantemente por moléculas de colágeno tipo I (Birk et al., 1996), ordenadas e arranjadas paralelamente em feixes de fibrilas e fibras altamente resistentes conferindo ao tendão sua principal característica: resistir às forças de tração. Também foram detectados, no tendão, colágeno tipo III (Hermann et al., 1980) e XIV (Young et al., 2000).

Os proteoglicanos são outros constituintes presentes nos tendões, participando na sua estabilidade estrutural (Scott, 1995), mantendo e regulando o diâmetro das fibrilas de colágeno além de participarem de outros eventos no tecido (Iozzo and Murdoch 1996). A presença de proteoglicanos de alto e baixo peso já foi demonstrada em tendões de boi (Vogel and Heinegård, 1985; Evanko and Vogel, 1990), de coelhos (Merrilees and Flint, 1980), de cães (Vogel and Koob, 1989) e de frangos (Curwin et al., 1988). Os proteoglicanos de baixo peso como fibromodulim e decorim participam como organizadores teciduais atuando na fibrilogênese do colágeno (Hedbom and Heinegård, 1989; Scott et al., 1997), durante o

desenvolvimento (Birk et al., 1995) e na maturação dos tecidos de animais adultos (Rosenberg et al., 1985; Oldberg et al., 1989).

O tendão, além de sua função inerente de suportar uma alta força tensional, também está sujeito, em determinadas situações, às forças compressivas e friccionais (Evanko and Vogel, 1990), as quais ocorrem quando o tendão passa por um sulco ósseo ou polia fibrosa (*wrap around*) e nas enteses (Alexander and Dimery, 1985; Benjamin and Ralphs, 1998). Nessas regiões, onde ocorre a presença de forças compressivas, o tendão desenvolve frequentemente uma fibrocartilagem (Vogel and Koob, 1989), sendo uma resposta adaptativa às potenciais injúrias traumáticas (Carvalho, 1994; Wren et al., 1998). Ainda, a entese fibrocartilaginosa promove a redução do desgaste do tendão pela dissipação do estresse ao longo da interface óssea (Benjamin and Ralphs, 1998). Nessas regiões o tendão apresenta as mesmas características de uma cartilagem, sintetizando grandes proteoglicanos e colágeno tipo II (Vogel and Koob, 1989). Diferenças organizacionais da matriz extracelular são observadas até mesmo dentro de uma região de compressão, quando se compara a porção mais próxima do osso, exibindo feixes de colágeno menos alinhados, ao contrário da porção mais distante onde estão mais alinhados, inclusive com estrutura de *crimp* melhor definida (Feitosa et al., 2002)

A interação entre proteoglicanos e colágeno de forma ordenada influencia também na integridade e na manutenção das propriedades inerentes de uma estrutura (Scott, 1988). As propriedades estruturais e mecânicas dos tendões de cauda ratos (Silver et al., 2000), de tendões digitais eqüinos (Gillis et al., 1997) e tendões de gastrocnêmio de frangos (Curwin et al., 1994) têm sido analisadas durante o desenvolvimento e envelhecimento, assim como na adaptação dos tendões digitais de frangos a prolongados exercícios, os quais ocasionaram alterações nas características morfológicas, bioquímicas e biomecânicas nessas estruturas (Curwin et al., 1988).

A proposta deste trabalho foi analisar a composição bioquímica de diferentes regiões de tendões de frangos que foram mantidos em duas situações ambientais diferentes, ambiente restrito e amplo.

Os frangos possuem no pé tendões flexores digitais superficiais e profundos. Os tendões flexores digitais profundos (Ghetie et al., 1981) foram analisados em conjunto pois foi notado a formação de anastomoses principalmente no grupo dos animais de ambiente restrito, impedindo a separação dos diversos tendões. Nos animais de ambiente restrito esta anastomose ocorreu no terço distal e nos animais de ambiente amplo na inserção com o calcâneo, como ocorre nas aves em geral (King, 1981). Desses tendões, flexores digitais profundos, foi estudada a região intermediária a qual é submetida somente à força de tração, uma vez que não existe nenhuma protuberância óssea ou superfície articular que pudesse modificar o traçado dos tendões e imprimir compressão sobre eles (Kock, 1973). Do tendão flexor superficial digital foram estudadas as regiões que sofrem compressão e tração.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1.- OBTENÇÃO DO MATERIAL

Frangos da linhagem Hy-line, com 1 dia de idade foram divididos em dois lotes. Um dos lotes permaneceu no biotério do Departamento de Biologia Celular – IB/UNICAMP em gaiolas de 0,5m<sup>2</sup>, enquanto que o outro grupo foi criado em ambiente amplo, 40m<sup>2</sup>. Ambos receberam o mesmo tipo de alimentação e os dois lotes foram sacrificados com 60 dias de vida.

Foram estudados: o **tendão flexor digital superficial** (TFDS) (Fig. 01A), que está inserido no músculo flexor digital superficial, sendo que a sua região *proximal* (Sp) repousa

sobre a tróclea da tibia e é comprimida pelo osso sesamóide do tendão *calcaneus communis*. Sob a sua porção *intermédia* (Si) existe uma protuberância óssea, o *hipotarsus*, a qual é localizada na região proximal do osso tarsometatarsal, por fim, a região *distal* (Sd) do tendão que está localizado sobre os dois terços finais do osso tarsometatarsal, o qual não apresenta nenhuma protuberância óssea, estando a região portanto só sob força de tração. Os **tendões flexores digitais profundos** (TFDP) (Fig. 01B) constituem um conjunto formado pelo: tendão do músculo flexor longo do hálux, tendão do músculo flexor *perforatus* do dígito II, tendão do músculo flexor *perforatus* do dígito III, tendão do músculo flexor *perforatus* do dígito IV, tendão do músculo flexor *perforans et perforatus* do dígito II e o tendão do músculo flexor *perforans et perforatus* do dígito III (Ghetie et al., 1981). As regiões intermediárias dos tendões profundos, analisada em conjunto único nesse trabalho, apresentam situação anatômica semelhante à região Sd do tendão superficial (Koch, 1973; Ghetie et al., 1981; King, 1981).

## 2.- ESTUDO BIOQUÍMICO

### 2.1- Extração dos constituintes da matriz

As amostras de cada região foram fragmentadas e tratadas separadamente com 25 volumes de cloridrato de guanidina (GuHCl) 4M em tampão acetato de sódio 50mM e pH 5,8 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 20mM, fluoreto de fenilmetil sulfonil (PMSF) 1mM. A extração durou 24h a 4°C sob agitação. O material obtido foi centrifugado em 18.000rpm (centrífuga Beckman J2-21 - rotor JA-20) durante 20min a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para análises bioquímicas.

## **2.2- Dosagem de proteínas solúveis**

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) para curva padrão. A leitura foi em 596nm em espectrofotômetro Hewlet Packard 8452A.

## **2.3- Fracionamento e análise dos componentes da matriz extracelular**

Os extratos das diferentes regiões dos tendões de ambos os grupos foram dialisados em tampão de acetato de sódio 50mM, pH 6,0 contendo uréia 7M e fracionados em coluna contendo resina de troca iônica de dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel) equilibrada com o mesmo tampão. As frações foram eluídas utilizando gradiente (0-1,5M) de cloreto de sódio (NaCl). Aliquotas de 2,8ml foram coletadas e monitoradas por absorbância em 280nm (espectrofotômetro Hewlet Packard 8452A) e a condutividade elétrica determinada em condutivímetro (HI 8819N). As frações ricas em proteoglicanos foram reunidas, dialisadas em tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,3 contendo 2M de GuHCl e submetidas a uma coluna de interação hidrofóbica contendo Octyl-Sepharose. A resina foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,3 contendo 2M de GuHCl e o fluxo da coluna foi de 1 ml/min. Um gradiente de GuHCl (2 - 6M) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 6,3 foi utilizado para eluição das frações com 2,8ml. Todas as frações de ambas cromatografias foram analisadas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) em gradiente de 4 a 16% (Zingales, 1984). Padrões de peso molecular foram analisados em paralelo. Para cada gel foram aplicados 30mA e os géis foram impregnados com prata (Blum et al., 1987).

## **2.4- Análise da sequência N-terminal**

O seqüenciamento direto da região N-terminal foi feito com as proteínas reduzidas e carboximetiladas usando um seqüenciador automático Applied Biosystem Procise f. Os

aminoácidos feniltioídantoínas (PTH) foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com os 20 aminoácidos PTH padrões.

### 3.- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diversas médias das dosagens e quantificações bioquímicas entre as diferentes regiões e grupos estudados foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) com distribuição de Fisher. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância (Beiguelman, 1991).

## RESULTADOS

Na figura 02 pode ser analisado o conteúdo de proteínas, em mg/g de tecido. As regiões de tração dos TFDS e TFDP dos animais de ambiente amplo apresentaram maiores conteúdos protéicos quando comparadas com as dos animais de ambiente restrito. Nas regiões de compressão do TFDS pode ser observado que a região Sp dos animais de ambiente amplo apresentou maior conteúdo do que a dos animais de ambiente restrito, porém em Si o resultado foi inverso.

O extrato total de cada região do TFDS e da região de tração do TFDP, de ambos os grupos, foi submetido à cromatografia de troca iônica (Fig. 03 A). Nessa cromatografia, após o gradiente com NaCl, todas as regiões apresentaram pelo menos um pico principal. O material foi eluído com uma concentração de NaCl que variou entre 0,14 até 0,6M. Todas as frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE (Fig. 03 B e C), no grupo dos animais criados em ambiente restrito, foi notado que na região Sp do TFDS havia presença de componentes com 60, 70 e 120kDa, sendo estes dois últimos polidispersos. Nas outras regiões

a presença da proteína com 60kDa foi sensivelmente diminuída, a de 70kDa, foi levemente impregnada pela prata e a de 120kDa só foi encontrada na região Sp. O componente de 60kDa aparece no gel sempre acompanhado de outro componente de peso molecular muito próximo ( $\cong$  55kDa). Quando se analisa o resultado do grupo dos animais criados em ambiente amplo, é notório a presença mais marcante, especialmente na região Si, dos componentes com 60 e 70kDa e também de 43kDa. Na região Sd a banda referente ao componente de 43kDa é menos expressiva. Com relação à região P do TFDP, se observa uma presença mais marcante da banda referente a 60kDa nos animais criados em ambiente amplo em relação aos animais mantidos em ambiente restrito. As frações ricas em componentes com 60 e 70kDa foram reunidas e aplicadas em coluna para cromatografia de interação hidrofóbica. A eluição foi feita com um gradiente de Gu-HCl de 2-6M. O monitoramento da eluição em 280nm não foi efetuado, pois nesse comprimento de onda ocorre absorbância de Gu-HCl interferindo na leitura. Sendo assim, a análise de todas as frações foi feita em SDS-PAGE (Fig. 04). Como todas as regiões analisadas apresentaram o mesmo perfil eletroforético, foi escolhida a região Si dos animais de ambiente amplo para representar os componentes de 60 e 70kDa, agora purificados. Esses componentes, quando submetidos à análise da sequência N-terminal (Fig. 05), corresponderam ao fibromodulim e decorim respectivamente.

## DISCUSSÃO

Os tendões são estruturas integrantes do sistema músculo-esquelético, sendo resistentes e de caráter fibroso, atuam como meio de ligação dos músculos aos ossos, transmitindo sua ação. A capacidade de resistir à tensão, torção, fricção e em casos especiais à compressão tem relação direta com a organização estrutural da matriz extracelular (Viidik 1980).

A adaptação funcional do tecido está associada com a presença de diversas forças mecânicas em diferentes regiões no tendão. Baseado na situação anatômica do TFDS é possível considerar que em determinadas porções do tendão, como a Sp e Si, a força de compressão se sobrepõe à de tração, porque ambas estão em contato com a tróclea da tíbia e o *hipotarsus*, respectivamente. Já na região de tensão (Sd) desse tendão não existe nenhuma protuberância óssea que pudesse interferir em sua ação. Analogia semelhante pode ser feita com a região estudada do TFDP que recebe eminentemente forças tracionais e está disposta paralelamente à região Sd do TFDS que também não recebe forças compressivas (Koch, 1973; Ghetie et al., 1981; King, 1981). Além da sua posição anatômica, outros aspectos devem ser levados em consideração para a análise das diferentes regiões dos tendões, como por exemplo, as suas próprias características estruturais e as atividades físicas exercidas ou não pelos diferentes grupos de animais. Esses fatores influenciam na composição da matriz extracelular.

A presença dos proteoglicanos está relacionada com as diferentes funções que eles desempenham nos tecidos (Iozzo and Murdock, 1996). Vários grupos de pesquisadores analisaram a síntese de proteoglicanos em cultura de explante de regiões de tendão bovino submetidos às diferentes forças mecânicas. Observaram que as forças de compressão estimulavam e mantinham a produção de proteoglicanos e que as forças de tensão poderiam desempenhar papel regulatório na expressão do tipo de proteoglicano a ser sintetizado pelo tendão (Vogel and Heinegård, 1985; Koob and Vogel 1987; Evanko and Vogel 1990).

Nos tendões, há predominância do colágeno tipo I que possui a capacidade de auto-agregação lateral das suas moléculas para formar as fibrilas. Essa capacidade depende das características da molécula de colágeno, assim como a sua estrutura semelhante a um bastão rígido e a presença de sítios de interação intermolecular com espaços regulares (Miller 1985). Esta última é resultado da sequência primária dos aminoácidos com sítios ricos em resíduos

polares e hidrofóbicos (Hofmann et al. 1978). Kuc e Scott (1997), Silver e colaboradores (2000) e Torres e colaboradores (2000) relataram que o aumento de "crosslinks" entre as moléculas de colágeno é proporcional ao aumento da força tensional ao longo das fibras.

As fibrilas de colágeno do tipo I variam em diâmetro dependendo do tecido (Piez, 1984), mas nos tendões estes valores são bem proeminentes e apresentam distribuição heterogênea (Parry et al., 1978a; Brodsky and Eikenberry, 1985). Há variações freqüentes em tendões em diferentes estados fisiológicos (Parry et al., 1978) e dentro do mesmo tendão submetido a diferentes forças mecânicas ao longo da sua extensão (Merrilees and Flint, 1980).

O arranjo estrutural das fibrilas e fibras de colágeno e sua associação com outros elementos da matriz têm reflexo nas propriedades biomecânicas dos tendões (Birk et al., 1989). Estas são influenciadas pelo diâmetro, o estado de agregação molecular e o espaço ocupado pelas fibras. Desta forma, as fibrilas são os elementos responsáveis pela resistência de um tendão, e a eficiência deste mecanismo depende do direcionamento paralelo destes elementos com a direção das forças de tensão a que estão sujeitos (Hukins and Aspden, 1985).

A presença dos proteoglicanos já foi relatada em tendões de ratos (Scott et al., 1981), bovinos (Vogel and Heinegård, 1985), rãs (Carvalho and Vidal, 1994) e camundongos (Ezura et al., 2000). Experimentos utilizando explantes de tendões bovinos (Vogel et al., 1986) e de pintinhos (Slack et al., 1984) mostraram que havia uma maior síntese de proteoglicanos de baixo peso molecular quando os tendões eram submetidos à forças de tensão, enquanto uma maior síntese de proteoglicanos de alto peso molecular era observada quando recebiam forças de compressão. No tendão flexor bovino o decorim representa 1% do peso seco do tecido enquanto que o fibromodulim 0,6% (Vogel and Meyers, 1999). Esses dois pequenos proteoglicanos interagem com as fibrilas de colágeno e parecem regular sua fibrilogênese "in vitro" (Hedbom and Heinegård, 1989), influenciando a integridade e a manutenção das propriedades inerentes da estrutura colagênica (Scott, 1988).

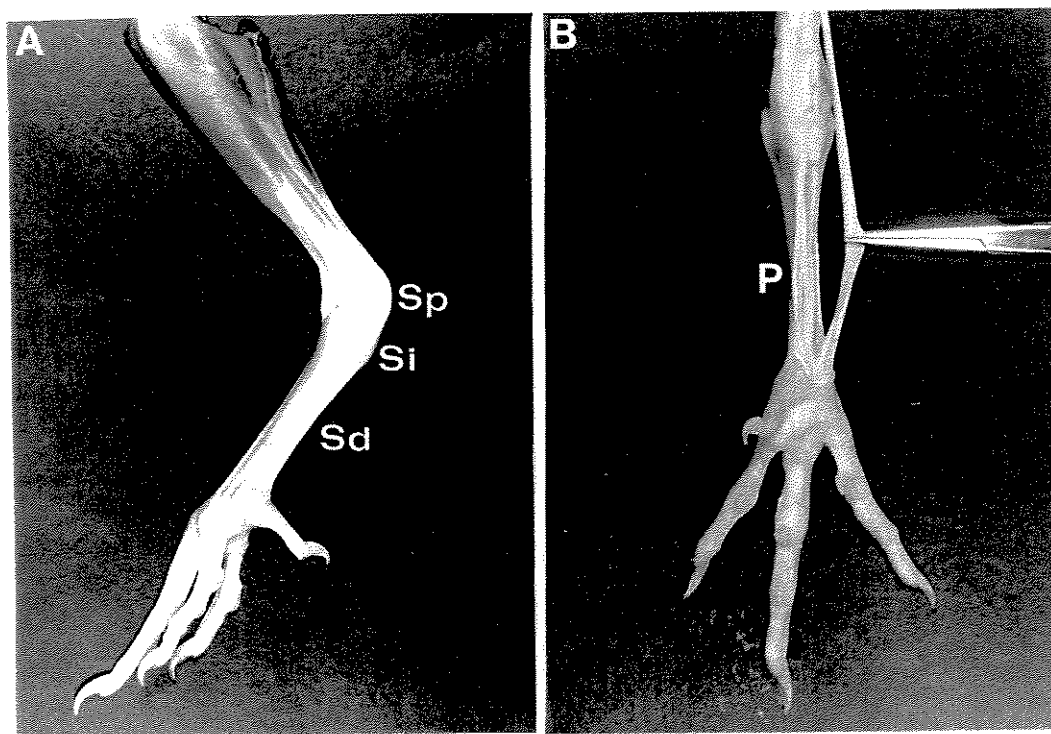
Curwin e colaboradores (1988) observaram alterações nas propriedades estruturais e bioquímicas dos tendões que sofreram prolongados exercícios. Em nosso estudo também verificamos mudanças bioquímicas contundentes entre os dois grupos de animais, porém tais alterações não foram às custas de exercícios estrênuos e sim apenas de um exercício ativo não forçado. Com essa observação se deduz que a matriz é capaz de detectar as alterações físicas resultantes do exercício, possibilitadas pela maior área de deambulação, e de transmitir estas informações para as células, responsáveis pela expressão e síntese das macromoléculas da matriz extracelular. Nossos resultados de quantificação de proteínas são confirmados por resultados descritos por Slack e colaboradores (1984) que mostram uma maior atividade sintética de componentes da matriz extracelular de tendões de animais que desenvolveram mais atividade física do que outros que foram mantidos confinados a espaços mais restrito.

A presença predominante do componente de 70kDa em regiões sujeitas à compressão (**Sp** e **Si**) e do componente de 60kDa presente tanto nas regiões de compressão como também na de tração (**Sd** e **P**) indica a existência de dois pequenos proteoglicanos confirmada pela análise da sequência N-terminal como sendo o fibromodulim (60 kDa) e decorim (70 kDa) (Li et al. 1992; Nurminskaya and Birk 1996; Dunlevy et al. 1998). A concentração desses pequenos proteoglicanos principalmente fibromodulim está aumentada no tendão dos animais de ambiente amplo, observação feita após aplicação do mesmo volume da amostra em SDS-PAGE de cada fração proveniente das cromatografias. A presença mais acentuada de fibromodulim parece estar relacionada com a resposta adaptativa dos fibroblastos às exigências funcionais do tecido (Nurminskaya and Birk, 1996) modificando as propriedades biomecânicas do tendão (Vilarta and Vidal, 1989). Nossos dados estão de acordo com os da literatura onde a presença de decorim já foi descrita em regiões de compressão e tensão, em tendões de boi (Vogel and Trotter, 1987; Evanko and Vogel, 1990; Kuc and Scott, 1997) e rã, (Carvalho, 1993) e fibromodulim em regiões de tensão de tendões de frango (Nurminskaya

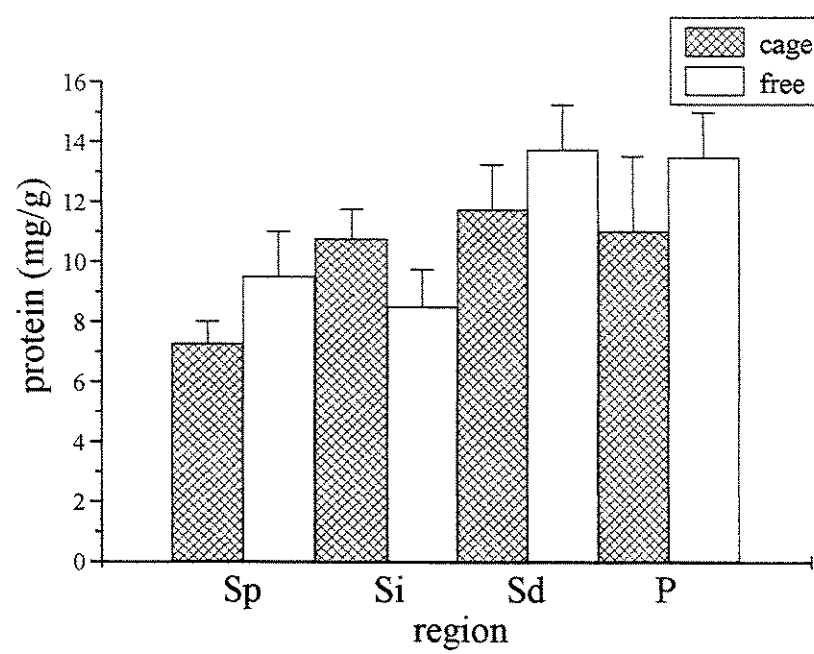
and Birk, 1996), de boi (Vogel and Meyers, 1999) e de camundongo (Ezura et al., 2000). A presença tanto de fibromodulim como de decorim está relacionada com uma ação moduladora e reguladora da fibrilogênese do colágeno atuando no comportamento das fibrilas (Vogel et al., 1984; Hedbom and Heinegård, 1989; Kuc and Scott, 1997; Hocking et al., 1998; Neame et al., 2000; Silver et al., 2000). O fibromodulim participa na regulação do crescimento da fibrila de colágeno (Nurminskaya and Birck, 1996) enquanto que o decorim parece estar relacionado com fibrilas de maior diâmetro, em resposta a uma maior força tensional (Kuc and Scott, 1997). Ambos proteoglicanos parecem estar relacionando com a regulação da agregação fibrilar (Young 2000).

Pelos dados observados neste trabalho e na literatura fica cada vez mais evidente que ocorre variação no conteúdo e diversidade dos componentes da matriz extracelular frente às diferentes forças biomecânicas as quais os tendões estão sujeito, sejam elas compressivas ou tracionais. Aliada à situação anatômica do tendão, a própria demanda funcional oriunda do ambiente externo, ou seja, o exercício ativo não forçado, também influencia na concentração dos componentes da matriz extracelular.

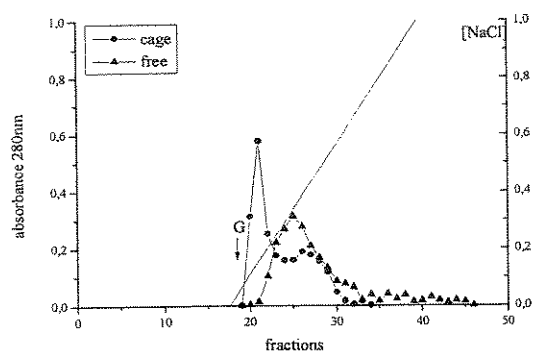
**Figura 01.** Aspectos anatômicos dos TFDS e TFDP do pé de frangos. A: Vista lateral do TFDS que foi dividido em três regiões: proximal (Sp) que contorna a tróclea da tíbia; intermédia (Si) que corresponde ao terço proximal do osso tarsometatarsal e a distal (Sd) que está sobre os outros dois terços distais do osso tarsometatarsal. B: Vista posterior do TFDP do membro inferior direito de frango. O TFDS foi desviado a fim de se observar a região intermediária (P) de estudo.



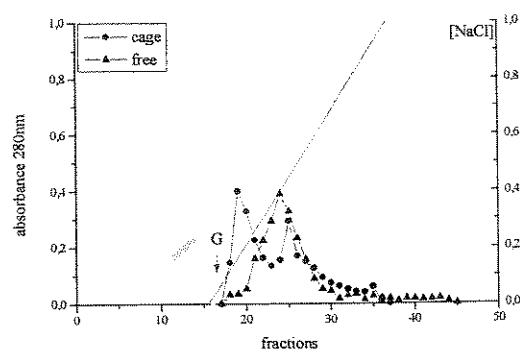
**Figura 02.** Dosagem de proteínas presentes no TFDS e no TFDP de frangos mantidos em ambiente restrito e amplo. As regiões Sp e Si do TFDS sofre forças compressivas e a região Sd recebe forças tensionais, assim como a região intermediária (P) do TFDP. Os dados são expressos em mg/g de tecido  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística foi utilizado ANOVA com 5% de significância.



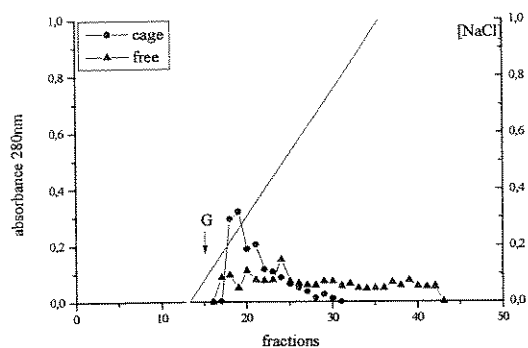
**Figura. 03.** Cromatogramas e SDS-PAGE com gradiente de 4 a 16% das diferentes regiões do TFDS (Sp, Si e Sd) e do TFDP (P) de frangos de ambiente amplo e restrito. Em (A) estão representados os cromatogramas das quatro regiões analisadas dos animais de ambiente restrito (●) e dos animais de ambiente amplo (▲). Absorbâncias em 280nm e concentração de NaCl (—). O início do gradiente de NaCl (0 - 1,5M) está indicado por G. Amostras provenientes da coluna de troca iônica de animais de ambiente restrito (B) e amplo (C) analisadas em SDS-PAGE. A **seta** indica fibromodulim e a **cabeça de seta** decorim. Padrões de peso molecular foram analisados em paralelo e estão apontados nos géis. Os géis foram impregnados com prata.

A  
Sp

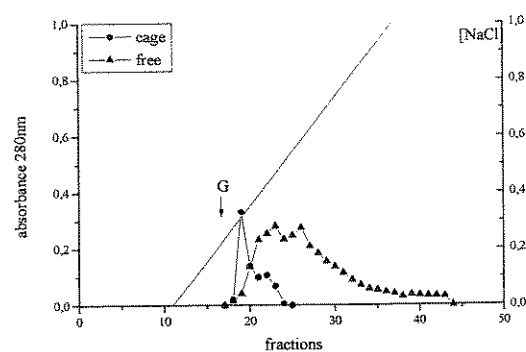
Si



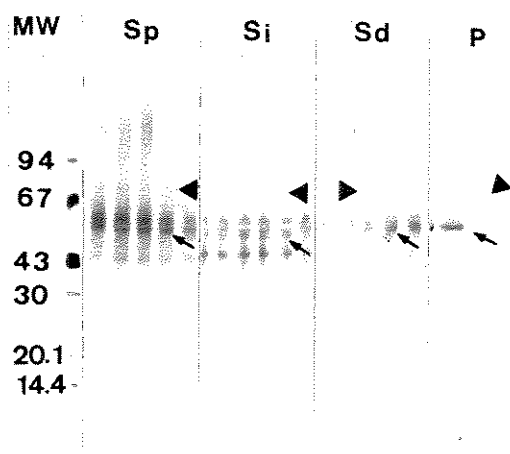
Sd



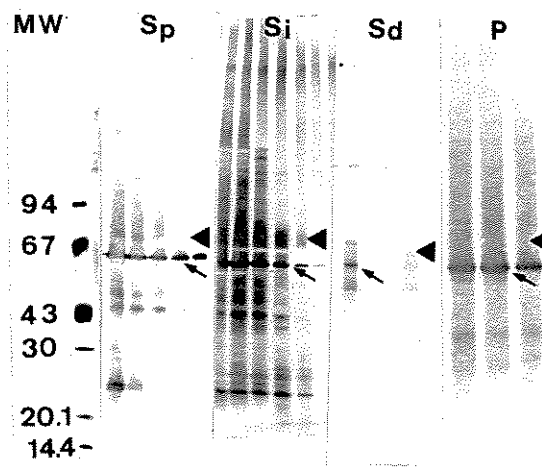
P



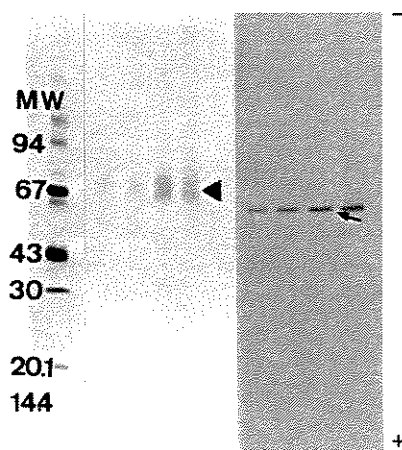
B



C



**Figura. 04.** SDS-PAGE com gradiente de 4 a 16% da região Si dos animais de ambiente amplo proveniente da coluna de interação hidrofóbica representando o padrão eletroforético de todas as amostras obtidas de ambas regiões e grupos de animais. A **seta** indica fibromodulim e a **cabeça de seta** decorim. Padrões de peso molecular foram analisados em paralelo e estão apontados nos géis. Os géis foram impregnados com prata.



**Figura. 05.** O seqüenciamento N-terminal de fibromodulim (FM) e decorim (DEC) presentes no TFDS e TFDP de frango. Na primeira tabela é mostrada a seqüência da amostra de fibromodulim comparada com as seqüências de pintinho (chick) (Nurminskaya et al. 1996), boi (bovin) (Lauder et al. 1996), humana (human) (Antonsson et al. 1993), camundongo (mouse) (Kurita et al. 1996) e rato (rat) (Krull and Gressner 1992). Na segunda tabela é mostrada a seqüência da amostra de decorim comparada com as seqüências de pintinho (chick) (Li et al. 1992), boi (bovin) (Day et al. 1987), humana (human) (Fisher et al. 1987), camundongo (mouse) (Scholzen et al. 1994) e rato (rat) (Kokenyesi et al. 1989). As letras realçadas são resíduos idênticos.

## I

|          | 1                                    | 10 | 20 | 30 |
|----------|--------------------------------------|----|----|----|
| AMOSTRA  | QYNEESDLAWLQYYMNNQSTSSYNYMPYYE...    |    |    |    |
| FM CHICK | QYNEEEDLAWLQYYMRQSRMSSYNYMPYYE...    |    |    |    |
| FM BOVIN | QYEEDSH -WWFQFLR NQQSTYDDP YDPYPY... |    |    |    |
| FM HUMAN | QYEDDP -HWWFHYLRSQ QSTYYDPYD PYPY... |    |    |    |
| FM MOUSE | QYDEDSH -WW IQYLRNQQSTYYDPYD PYPY... |    |    |    |
| FM RAT   | QYE ED\$H -WWLQYLRNQQSTYYDPYDTYPY... |    |    |    |

## II

|           | 1                                         | 10 | 20 | 30 |
|-----------|-------------------------------------------|----|----|----|
| AMOSTRA   | DEASADMAPTDDPVFSSFGPV --- CPFRCQCHL...    |    |    |    |
| DEC CHICK | DEGSADMAPTDDPVI SGFGPV --- CPFRCQCHL...   |    |    |    |
| DEC BOVIN | DEASG I GPEEHF PEVPE I EPMGPVCPFRCQCHL... |    |    |    |
| DEC HUMAN | DEASG I GPEVPDDRDFEPSL - GPVCPFRCQCHL...  |    |    |    |
| DEC MOUSE | DEASG I I PYDPDNPL ISM ----- CPYRCQCHL... |    |    |    |
| DEC RAT   | DEASG I I PYDPDNPL ISM ----- CPYRCQCHL... |    |    |    |

## REFERÊNCIAS

- Alexander, R. McN. and Dimery, N. J. 1985. The significance of sesamoids and retroarticular processes for the mechanics of joints. *J. Zool., (A)* **205**:375-371.
- Antonsson, P., Heinegaard, D. and Oldberg, A. 1993. Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulin gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1174**: 204-206.
- Beiguelman, B. 1991. Curso prático de bioestatística. 2<sup>a</sup> ed. Sociedade Brasileira de Genética, 231 pp.
- Benjamin, M. and Ralphs, J. R. 1998. Fibrocartilage in tendons and ligaments - an adaptation to compressive load. *J. Anat.*, **193**: 481-495.
- Benjamin, M. and Ralphs, J. R. 2000. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.*, **196**: 85-130.
- Birk, D. E., Hahn, R. A., Linsenmayer, C. Y. and Zycband, E. I. 1996. Characterization of fibril segments from chicken embryo cornea, dermis and tendon. *Matrix Biol.*, **15**: 111-118.
- Birk, D. E., Southern, J. F., Zycband, E. I., Fallon, J. T. and Trelstad, R. L. 1989. Collagen fibril bundles: a branching assembly unit in tendon morphogenesis. *Dev.*, **107**: 437-443.
- Birk, D. E., Nurminskaya, M. V. and Zycband, E. 1995. Collagen fibrillogenesis in situ: Fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev. Dyn.*, **202**: 229-243.
- Blum, B., Beier, H. and Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-99.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Brodsky, B. and Eikenberry, E. 1985. Supramolecular collagen assemblies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **460**: 74-84.
- Carvalho, H. F. 1993. Estrutura e composição de um tendão sujeito a forças de compressão. 89 pp. (Doutorado-IB-UNICAMP).
- Carvalho, H. F. and Vidal, B. C. 1994. Structure and histochemistry of a pressure-bearing tendon of the frog. *Ann. Anat.*, **176**: 161-170.
- Chiquet, M. , 1999. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.*, **18**: 417-426.

- Cowin, S. C. 1993. Nature's structural engineering of bone on a daily basis. In: Bodner, S. R., Singer, J., Solan, A. and Hashin, Z. (ed) *Theoretical and Applied Mechanics*. Amsterdam, Elsevier, pp. 145-160.
- Curwin, S. L., Roy, R. R. and Vailas, A. C. 1994. Regional and age variation in growing tendon. *J. Morphol.*, **221**: 309-320.
- Curwin, S. L., Vailas, A. C. & Wood, J. 1988. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.*, **65** (5): 2297-2301.
- Day, A. A., McQuillan, C. I., Termine, J. D. and Young, M. R. 1987. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for small proteoglycan II of bovine bone. *Biochem.*, **248**: 801-805.
- Dunlevy, J. R., Neame, P. J., Vergnes, J. and Hassell, J. R. 1997. Identification of the N-Linked Oligosaccharide Sites in Chick Corneal Lumican and Keratan That Receive Keratan Sulfate. *J. Biol. Chem.*, **273**: 9615-9621.
- Evanko, S. P. and Vogel, K. G. 1990. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix*, **10**: 420-436.
- Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I. & Birk, D. E. 2000. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *Cell Biol.*, **151** (4): 779-787.
- Feitosa, V. L. C., Benedicto, C. V. and Pimentel, E. R. 2002. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. *J. Anat.*, **200**: 105-111.
- Fisher, L. W., Hawkins, G. R., Tuross, N. and Termine, J. D. 1987. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9702-9708.
- Frank, C., Woo, S., Andriacchi, T., Brand, R., Oakes, B. and Dahners, L. 1988. Normal ligament: structure, function and composition. In: Woo, S.L.-Y. (ed.) *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Buckwalter, JA, American Academy of Orthopaedic Surgery, pp. 45-101.
- Ghetie, V., Chitescu, St., Cotofan, V. and Hillebrand, A. 1981. *Atlas de anatomía de las aves domésticas*. Acribia-Paraninfo, Zaragoza and Madrid, 294pp.
- Gillis, C., Pool, R. R., Meagher, D. M., Stover, S. M., Reiser, K. and Willits, N. 1997. Effect of maturation and aging on the histomorphometric and biochemical characteristics of equine superficial digital flexor tendon. *AJVR*, **58** (4): 425-430.
- Hayashi, K. 1996. Biomechanical studies of the remodeling of knee joint tendons and Ligaments. *J. Biomech.*, **29** (6): 707-716.
- Hedbom, E. and Heinegård, D. 1989. Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6869-6905.

- Hermann, H., Dessau, W., Fessler, L. I. and von der Mark, K. 1980. Synthesis of types I, III and AB2 collagen by chicken tendon fibroblasts in vitro. *Eur. J. Biochem.*, **105**: 63-74.
- Hocking, A. M., Shinomura, T. and Mcquillan, D. J. 1998. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.*, **17**: 1-19.
- Hofmann, H., Fietzek, P. P. and Kühn, K. 1978. The role of polar and hydrophobic interactions for the molecular packing of type I collagen: a three-dimensional evaluation of the amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, **125**: 137-165.
- Hukins, D. W. L. and Aspen, R. M. 1985. Composition and properties of connective tissues. *TIBS.*, **10**: 260-264.
- Iozzo, R. V. and Murdoch, A. D. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB.*, **10**: 598-614.
- King, A. S. 1981. Introdução às aves. In: S. Sisson and D. Grossman (ed) *Anatomia dos Animais Domésticos*. pp. 1678-1727.
- Kock, T. 1973. Locomotion System. In: B. H. Skold & L. DeVRIES (ed.) *Anatomy of the Chicken and Domestic Birds*. Ames, Iowa, USA, The Iowa State University Press, pp. 6-60.
- Kokenyesi, R. and Woessner, J. F. 1989. Purification and characterization of a small dermatan sulphate proteoglycan implicated in the dilatation of the rat uterine cervix. *Biochem.*, **260**: 413-419.
- Koob, T. J. and Vogel, K. G. 1987. Site related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J. Orthop. Res.*, **5**: 414-424.
- Krull, N. B. and Gressner, A. M. 1992. Differential expression of keratan sulfate proteoglycans fibromodulin, lumican and aggrecan in normal and fibrotic rat-liver. *FEBS.*, **312**: 47-52.
- Kuc, I. M. and Scott, P. G. 1997. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect. Tissue Res.*, **36** (4): 287-296.
- Kurita, K., Shinomura, T., Ujita, M., Zako, D., Iwata, H. and Kimata, K. 1996. Occurrence of PG-Lb, a leucine-rich small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycan in mammalian epiphyseal cartilage: Molecular cloning and sequence analysis of the mouse cDNA. *Biochem.*, **318**: 909-914.
- Lauder, R. M., Huckerby, T. N. and Nieduszynski, I. A. 1996. The structure of the keratan sulphate chains attached to fibromodulin isolated from articular cartilage. *Eur. J. Biochem.*, **242**: 402-409.

- Li, W., Vergnes, J., Cornuet, P. K. and Hassell, J. R. 1992. cDNA clone to chick corneal chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan reveals identity to decorin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**: 190-197.
- Miller, E. J. 1985. The structure of fibril-forming collagens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **460**: 1-13.
- Merrilees, M. J. and Flint, M. H. 1980. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am. Anat.* **157**: 87-106.
- Neame, P. J., Kay, C. J., McQuillan, D. J., Beales, M. P. and Hassell, J. R. 2000. Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**: 859-863.
- Nurminskaya, M. V. and Birk, D. E. 1996. Differential expression of fibromodulin mRNA associated with tendon fibril growth: isolation and characterization of a chicken fibromodulin cDNA. *Biochem.*, **317**: 785-789.
- Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K. and Heinegård, D. 1989. A collagen-binding 59kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO.*, **8**: 2601-2604.
- Parry, D. A. D., Barnes, G. R. G. and Craig, A. S. 1978a. A comparison of the size and distribution of collagen fibrils in connective tissue as a function of age and a possible relation between fibrils size distribution and mechanical function. *Proc. R. Soc. Lond.*, **203B**: 305-321.
- Piez, K. A. 1984. Molecular and aggregate structures of collagen. In: Piez, K. A. and Reddi, A. H. (ed.) *Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier, NY.
- Rosenberg, L. C., Choi, H. U., Tang, L. H., Johnson, T. L., Pal, S., Webber, C., Reiner, A. and Poole, A. R. 1985. Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J. Biol. Chem.*, **260**: 6304-6313.
- Scholzen, T., Solursh, M., Suzuki, S., Reiter, R., Morgan, J. L., Buchberg, A. M., Siracusa, L. D. and Iozzo, R. V. 1994. The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and differentiation. *J. Biol. Chem.*, **269**: 28270-28281.
- Schechtman, H. and Bader, D. L. 1997. In vitro fatigue of human tendons. *J. Biomech.*, **30** (8): 829-835.
- Scott, J. E. 1988. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem.*, **252**: 313-323.
- Scott, J. E., Orford, C. R. and Hughes, E. W. 1981. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tails tendon. An electron-microscopical and biochemical investigation. *Biochem.*, **195**: 573-581.
- Scott, P. G., Nakano, T. and Dodd, C. M. 1995. Small proteoglycans from different regions of the fibrocartilaginous temporomandibular joint disc. *Biochim. Biophys. Acta. Gen.*, **1244**: 121-128.

- Scott, P. G., Nakano, T. and Dodd, C. M. 1997. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim Biophys. Acta Gen.*, **1336**: 254-262.
- Silver, F. H., Christiansen, D. L., Snowhill, P. B. and Chen, Y. 2000. Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. *Connect. Tissue Res.*, **41** (2): 155-164.
- Slack, C., Flint, M. H. and Thompson, B. M. 1984. The effect of tensional load on isolated embryonic chick tendons in organ culture. *Connect. Tissue Res.*, **12**: 229-247.
- Torres, D. S., Freyman, T. M., Yannas, I. V. and Spector M. 2000. Tendon cell contraction of collagen-GAG matrices in vitro: effect of cross-linking. *Biomater.*, **21** (15): 1607-1619.
- Viidik, A. 1980. Mechanical properties of parallel-fibred collagenous tissues. In: A, Viidik & J. Vuust. (ed) *Biology of Collagen*. Academic Press, New York.
- Viidik, A. 1996. In: W. D., Comper (ed) *Tendons and Ligaments. Extracellular Matrix. Tissue Function*. University of Aarhus, Denmark, Melbourne, Australia, Harwood Academic Publishers, pp. 303-327.
- Vilarta, R. and Vidal, B. C. 1989. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*, **9**: 55-61.
- Vogel, K. G. and Heinegård, D. 1985. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J. Biol. Chem.*, **260**: 9298-9306.
- Vogel, K. G., Keller, E. J., Lenhoff, R. J., Campbell, K. and Koob, T. J. 1986. Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Eur. Cell Biol.*, **41**: 102-112.
- Vogel, K. G. and Koob, T. J. 1989. Structural specialization in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.*, **115**: 267-293.
- Vogel, K. G. & Meyers, B. 1999. Proteins in the tensile region of adult bovine deep flexor tendon. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **367S**: 344-355.
- Vogel, K. G., Paulsson, M. and Heinegård, D. 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem.*, **223**: 587-597.
- Vogel, K. G. and Thonar, E. J. 1988. Keratan sulfate is a component of proteoglycans in the compressed regions of adult bovine flexor tendon. *J. Orthop. Res.*, **6**: 434-442.
- Vogel, K. G. and Trotter, J. A. 1987. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Collagen Relat. Res.*, **7**: 105-114.

- Woo, S., Mayanard, J., Butler, D., Lyon, R., Torzilli, P., Akeson, W., Cooper, R. and Oakes, B. 1988. Ligament, tendon and joint capsule insertions to bone. In: S. L.-Y. Woo & J. A. Buckwalter (eds.) Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Am. Acad. Orthop., Park Ridge, Illinois, pp.133-166.
- Wren, T. A. L., Beaupré, G. S. and Carter, D. R. 1998. Adaptive metaplasia protects tendons from mechanocal damage. Trans. Orthop. Res. Soc., **23**: 632.
- Young, B. B., Gordon, M. K. and 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.
- Zingales, B. 1984. Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: Morel, C. M. (ed.) Genes and antigens of parasites. Fiocruz, RJ.

## **ARTIGO 2**

## **ANÁLISE BIOMECÂNICA E BIOQUÍMICA DO TENDÃO DE FRANGOS MANTIDOS EM AMBIENTE RESTRITO E AMPLO**

### **RESUMO**

Os tendões têm a capacidade de responder homeostaticamente às demandas biomecânicas internas como também às alterações mecânicas provenientes do meio externo. Frangos da linhagem Hy-line foram divididos em dois grupos. Um grupo foi confinado em ambiente restrito, enquanto o outro, foi mantido em ambiente amplo. Os tendões do músculo flexor digital superficial, de ambos grupos, foram submetidos a teste de ensaio mecânico de deformação sob tração. Os tendões dos animais mantidos em ambiente amplo apresentaram maior resistência à tração, atingindo uma maior deformação antes da ruptura. O tendão do músculo flexor digital superficial apresenta, ao longo do seu percurso, duas regiões que sofrem compressão por acidentes ósseos e uma região predominantemente de tração. A região de tração dos tendões dos animais mantidos em ambiente amplo apresentou intumescência em ácido acético e concentração de hidroxiprolina maiores, demonstrando a presença de grandes quantidades de colágeno. Dessas regiões também foram quantificados os glicosaminoglicanos sulfatados, constatando que as regiões de compressão dos tendões de ambos os grupos apresentaram maiores concentrações de glicosaminoglicanos e a região de tração dos animais de ambiente restrito apresentou a menor concentração. O glicosaminoglicano predominante na região de compressão foi o condroitim sulfato e na região de tração o dermatam sulfato nos dois grupos analisados. Essas análises indicam que uma condição externa, nesse caso a área para deambulação, pode influenciar a síntese dos componentes da matriz extracelular e as propriedades mecânicas do tendão flexor digital superficial de frangos.

## INTRODUÇÃO

Tecidos e órgãos são dinâmicos, mudam suas propriedades mecânicas e estruturais em resposta às alterações de forças como um fenômeno de adaptação funcional e otimização operacional. Assim, mudanças mecânicas significativas do meio ambiente afetam as propriedades mecânicas do tendão (WOO *et al.*, 1990) com conseqüente adaptação de sua matriz extracelular às novas situações biomecânicas (BENJAMIN & RALPHS, 1998; CHIQUET, 1999).

Durante a locomoção, o sistema músculo-esquelético está sujeito a uma constante carga, o peso corpóreo. O movimento é ativado pela contração muscular com conseqüente produção de torque em torno das articulações dos membros inferiores. Cada unidade músculo-tendinosa produz uma força cíclica com um valor máximo constante, que é proporcional à carga. Mesmo no músculo relaxado uma pequena tensão está sempre presente, devido ao tônus muscular, requerendo que as unidades músculo-tendinosas estejam constantemente tensas (SCHECHTMAN & BADER, 1997).

Os tendões atuam como elementos de ligação conectando os músculos aos ossos e desta maneira transmitem a contração muscular a estes últimos (SCHECHTMAN & BADER, 1997). O tendão geralmente é uniaxial, composto predominantemente por fibras de colágeno tipo I (BIRK *et al.*, 1996) altamente ordenadas e agrupadas paralelamente em feixes (BIRK & TRELSTAD, 1986). O arranjo estrutural das fibrilas de colágeno, sua associação com outros elementos da matriz, assim como os diâmetros dessas fibrilas e seu estado de agregação molecular, têm reflexo nas propriedades biomecânicas do tendão. As fibrilas de colágeno são responsáveis pela resistência do tendão. A eficiência deste mecanismo depende do direcionamento paralelo das fibras com a direção das forças às quais estão sujeitas (HUKINS & ASPDEN, 1985), determinando a orientação dessas fibras em relação ao seu eixo (O'BRIEN, 1997). Durante o seu percurso, em determinadas situações, o tendão além de

sofrer forças tensionais também está sujeito às forças de compressão e fricção (EVANKO & VOGEL, 1990). Essas forças adicionais ocorrem quando o tendão passa sobre um sulco ósseo ou polia fibrosa "wrap around" e nas enteses (ALEXANDER & DIMERY, 1985; BENJAMIN & RALPHS, 1998). Nessas regiões são freqüentemente observadas formações fibrocartilaginosas (VOGEL & KOOB, 1989).

A matriz extracelular do tendão é constituída principalmente por colágeno tipo I, proteoglicanos e proteínas não colagênicas. As fibras de colágeno são consideradas estruturas resistentes à força tensional enquanto que aos proteoglicanos são atribuídas as propriedades de resistência à compressão (SCOTT *et al.*, 1997).

Os proteoglicanos são constituídos por cadeias de glicosaminoglicanos as quais estão covalentemente ligadas a uma proteína central. Durante o desenvolvimento do tendão, além do colágeno, têm sido observadas mudanças na síntese de glicosaminoglicanos. Nos indivíduos jovens os glicosaminoglicanos aparecem em altas concentrações (CURWIN *et al.*, 1994), diminuindo com o passar da idade (SCOTT & HUGHES, 1986).

Com relação à presença de glicosaminoglicanos, tipo e quantidade, frente a diferentes forças mecânicas, tem sido observado dermatam sulfato em regiões dos tendões sujeitos à força de tensão e condroitim sulfato em regiões sujeitas tanto à tensão quanto à compressão (MERRILEES & FLINT, 1980; VOGEL & KOOB, 1989 e SELL & MONNIER, 1995). Nas regiões onde o tendão apenas sofre forças de tensão, o conteúdo de glicosaminoglicanos é baixo, porém esse conteúdo é maior em regiões onde o tendão está sujeito às forças compressivas e friccionais em adição às forças de tensão. Os glicosaminoglicanos exercem uma pressão de intumescimento na matriz colagênica e provê resistência osmótica às forças compressivas em função da sua alta concentração de cargas negativas (GILLARD *et al.*, 1979; KOOB & VOGEL, 1987). Esses glicosaminoglicanos podem fazer parte dos grandes ou pequenos proteoglicanos (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; VOGEL *et al.*, 1994). Os

pequenos proteoglicanos pertencem a uma classe que tem como característica a proteína central rica em leucina (IOZZO & MURDOCH, 1996). Fibromodulim e decorim são os pequenos proteoglicanos presente nos tendões, sendo que o decorim apresenta uma única cadeia de glicosaminoglicano, que no caso de tendão é dermatam sulfato (KUC & SCOTT, 1997), enquanto que o fibromodulim contém quatro cadeias de queratam sulfato (OLDBERG *et al.*, 1989; KNUDSON & KNUDSON, 2001). Esses dois proteoglicanos podem ser encontrados associados com fibrilas de colágeno e parecem regular a fibrilogênese do colágeno (EZURA *et al.*, 2000; NEAME *et al.*, 2000).

Várias pesquisas usando tendões de bovinos (EVANKO & VOGEL, 1990; PEREZ-CASTRO & VOGEL, 1999; VOGEL & MEYERS, 1999), coelhos (REID & FLINT, 1974; GILLARD *et al.*, 1979; MERRILEES & FLINT, 1980), suínos (WOO *et al.*, 1980), cães (VOGEL & KOOB, 1989) e frangos (CURWIN *et al.*, 1994; 1988) têm relacionado as suas condições biomecânicas com a composição da sua matriz extracelular. Porém poucos estudos foram feitos com aves. Neste trabalho, o objetivo foi analisar a composição da matriz extracelular de um tendão flexor de frango considerando as regiões deste tendão que experimentam diferentes tipos de forças biomecânicas. Também foram avaliados os efeitos do confinamento e de uma maior atividade física sobre a composição da matriz extracelular e as propriedades mecânicas deste tendão.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.- OBTENÇÃO DO MATERIAL**

Frangos da linhagem Hy-line, com 1 dia de idade foram divididos em dois lotes. Um dos lotes permaneceu confinado em gaiolas de 0,5 m<sup>2</sup> no biotério do Departamento de Biologia Celular – IB/UNICAMP, enquanto, o outro foi criado em ambiente amplo (40 m<sup>2</sup>), mas ambos receberam o mesmo tipo de alimentação. Os dois lotes de animais, aos 60 dias de

vida, foram anestesiados com pentobarbital (40mg/kg) e posteriormente sacrificados com 1 ml de KCl 4M (MATSUDA *et al.*, 1986) e pesados. Para o teste de tensão x deformação sob tração os tendões foram retirados em peça única. Tanto para o teste de intumescimento quanto para a obtenção e análise dos glicosaminoglicanos sulfatados os tendões dos músculos flexores digitais superficiais foram divididos em três regiões: *proximal* (Sp) que contorna a tróclea da tíbia; *intermédia* (Si) que corresponde a região do terço proximal do osso tarsometatarsal e a *distal* (Sd) que está sobre os outros dois terços distais do osso tarsometatarsal (KOCH, 1973 e GHETIE *et al.*, 1981) (Fig. 01).

## 2.- ENSAIO MECÂNICO DE DEFORMAÇÃO SOB TRAÇÃO

Após o sacrifício dos animais os músculos flexores digitais superficiais, os tendões e as falanges, nas quais eles se inserem, foram retirados em peça única. Dez tendões de cada um dos dois grupos de animais foram utilizados para o ensaio mecânico de tensão x deformação sob tração. Antes do início do teste, com auxílio de um paquímetro, de cada tendão foram determinados o comprimento ( $L_i$ ) e a área de secção transversa ( $\text{mm}^2$ ). A fixação dos espécimes ao anteparo mecânico foi através de garras que prenderam o músculo em uma extremidade e em outra as falanges (Fig. 02). O aparelho utilizado é da marca MTS, modelo TESTSTAR II, alocado no Laboratório de Propriedades Mecânicas, Departamento de Engenharia de Materiais na Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP. Cada tendão foi submetido a um aumento gradual de carga em uma velocidade de deslocamento constante de 20 mm/min (FUJII, 1993), com célula de carga de 1KN (TOHYAMA & YASUDA, 2000). Para cada amostra foi obtida uma curva de tensão x deformação ( $\Delta L = L_f - L_i / L_i$ , onde  $L_f$  é o comprimento no qual houve a ruptura do tendão e  $L_i$  é o comprimento inicial do tendão), um valor de ruptura do tendão (carga máxima) e a tensão de ruptura, onde  $T = \text{carga máxima} / \text{área de secção transversa}$ . Todo o procedimento foi feito em temperatura ambiente utilizando

solução fisiológica para evitar o ressecamento das fibras (SCHECHTMAN & BADER, 1997; CARPENTER *et al.*, 1998).

### **3.- TESTE DE INTUMESCIMENTO**

Seis amostras das regiões Sp, Si e Sd, de cada grupo, foram medidas com o auxílio de um paquímetro (comprimento, largura e espessura), pesadas e imersas em PBS durante 1h. Posteriormente foram colocadas em água por 1h e a seguir mais 1h em ácido acético 3%. Em cada passo o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e as amostras pesadas (KOOB & VOGEL, 1987). O grau de intumescimento foi avaliado pelo percentual de variação do peso.

### **4.- QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA**

Amostras de cada região do tendão dos dois grupos estudados foram hidrolisadas em HCl 6N (1ml/10mg de tecido) por 16h a 107°C. A seguir foi acrescentado 1,41g de cloramina-T, 10ml de água, 10ml de n-propanol e 80ml de tampão (50g de ácido cítrico, 12ml de ácido acético, 120g de acetato de sódio e 34g de hidróxido de sódio, pH6,0) e após 20min foi adicionado 1ml de solução de ácido perclórico/aldeído (15g de p-dimetilamino benzaldeído, 60ml de n-propanol, 26ml de ácido perclórico a 60% e n-propanol para completar 100ml). O material foi incubado por 15min em 60°C, resfriado e lido em espectrofotômetro em  $\lambda = 550\text{nm}$  (STEGEMANN & KARLHEINZ, 1967).

### **5.- GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS: OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO**

Amostras de cada região e grupo foram tratadas com acetona por 24h para desidratação, secadas a 37°C durante 24h e pesadas. Os glicosaminoglicanos sulfatados foram obtidos após tratamento dessas amostras com papaína (40mg/g de tecido) em tampão citrato

de sódio 30mM pH3,5 contendo EDTA 40mM e 2-mercaptoetanol (2-Me) 80mM por 24h a 50°C. O digesto foi centrifugado a 15.000rpm por 20min (centrífuga Beckman J2-21 - rotor JA-21). Ao sobrenadante obtido foram adicionados dois volumes de etanol e deixados por 24h a 4°C. Após centrifugação, ao precipitado obtido, foram adicionados dois volumes de etanol 80%, esse material foi centrifugado e o precipitado foi colocado em estufa a 37°C para secagem; a seguir foi ressuspenso em água destilada (MICHELACCI & HORTON, 1989). O conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados, foi determinado em espectrofotômetro (Hewlet Packard 8452A) em 526nm, pelo método de azul de dimetilmetileno (DMMB) (FARNDAL *et al.*, 1986), utilizando condroitim sulfato (CS) para curva padrão.

## 6.- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os glicosaminoglicanos obtidos, após digestão, foram analisados em gel de agarose (DIETRICH & DIETRICH, 1976). Padrões conhecidos de glicosaminoglicanos contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foram analisados paralelamente. O tampão utilizado foi o propileno diamino 50 mM, pH 9,0. As condições de corrida foram 0,1A e 100V. A seguir os géis foram fixados em Cetavlon (brometo de cetiltrimetilamonio) 0,1% e corados com azul de Toluidina 0,1% em etanol 50% e ácido acético 1%.

## RESULTADOS

Os animais mantidos confinados pesaram em média 350,07±20,46g, enquanto que os mantidos em ambiente amplo pesaram 382,94±37,68g.

Os tendões analisados, dos dois grupos de animais, apresentaram resultados diferentes com relação à tensão (*stress*), força (*load*) e deslocamento (*displacement*) durante o teste de tensão x deformação sob tração, assim como a área de secção transversa (*cross sectional*

area). A força máxima (Fig. 03a) observada nos tendões dos animais de ambiente amplo, assim como a tensão máxima (Fig. 03b) e o deslocamento máximo (Fig. 03d) foram significativamente maiores quando comparadas com o grupo de ambiente restrito. A área de secção transversa dos tendões (Fig. 03c) foi maior nos animais de ambiente restrito quando comparado com os animais de ambiente amplo.

A figura 04 mostra que a tensão e deformação observadas na figura 05 se referem a uma força máxima aparente de  $31,26 \pm 11,50\text{N}$  com um deslocamento de  $12,16 \pm 0,04\text{mm}$  para os animais de ambiente restrito e  $36,69 \pm 12,26\text{N}$  com um deslocamento de  $9,00 \pm 0,03\text{mm}$  para os animais de ambiente amplo. Ambos grupos, após receberem essa força máxima, apresentaram um maior deslocamento com menor aplicação de força.

A curva de tensão x deformação (*stress x strain*) (Fig. 05) mostra que em seu primeiro terço houve um aumento abrupto da tensão frente a uma pequena deformação para ambos os grupos. Porém os tendões dos animais de ambiente restrito apresentaram uma tensão máxima aparente em torno de  $7,40\text{ N/mm}^2$  com uma deformação de  $14,98\%$ , enquanto que, os tendões dos animais de ambiente amplo alcançaram quase o dobro da tensão aparente  $13,20\text{ N/mm}^2$  com uma deformação de  $12,22\%$ . Após atingir a tensão máxima, pode ser observada uma região de declínio onde ocorreu uma diminuição gradual de tensão e um aumento no padrão de deformação. A deformação atingiu  $56,49\%$  e  $66,28\%$  para os animais de ambiente restrito e ambiente amplo, respectivamente.

As propriedades de intumescimento (*swelling*) das diferentes regiões estão apresentadas na figura 06. Tomando-se como parâmetro o peso das amostras pós tratamento com PBS, todas as regiões dos dois grupos analisados obtiveram valores crescentes de peso frente às diferentes soluções. Na presença de água, todas as regiões do grupo de ambiente restrito apresentaram um aumento insignificante de intumescimento em relação às mesmas regiões do grupo de ambiente amplo e ambos os grupos apresentaram maiores valores na

região Sd. As diferenças mais significativas foram observadas no tratamento com ácido acético para os dois grupos de animais assim como para as diferentes regiões analisadas. Para ambos grupos de animais foi observado um padrão onde  $Sp < Si < Sd$ , porém as diferentes regiões dos tendões dos animais de ambiente amplo intumesceram em média uma vez mais em ácido acético que as mesmas regiões dos animais de ambiente restrito.

Para estimar o conteúdo colagênico, das diversas regiões, foi determinado a concentração de hidroxiprolina (Fig. 07). Os tendões dos animais de ambiente amplo apresentaram concentrações maiores em todas as regiões e as diferenças mais significativas foram as das regiões Si e Sd.

A quantificação dos glicosaminoglicanos está representada na figura 08. Em cada grupo o conteúdo de glicosaminoglicanos foi maior na região Sp seguido da Si e Sd. Tanto a região Sp como a Si, quando comparadas entre os grupos, apresentaram concentrações semelhantes, enquanto que a região Sd dos animais de ambiente amplo apresentou um discreto aumento em relação a mesma região do grupo de ambiente restrito.

Na eletroforese em gel de agarose (Fig. 09) foi observada, em ambos os grupos, a predominância do glicosaminoglicano condroitim sulfato (CS) nas regiões Sp e Si e de dermatam sulfato (DS) na região Sd.

## DISCUSSÃO

Todos os tendões transferem forças entre músculos e ossos. Entretanto, o estresse que o tendão está sujeito varia de acordo com a sua posição anatômica (KER *et al.*, 1988) assim como mudanças no ambiente mecânico (WOO *et al.*, 1990). Em resposta à essas demandas mecânicas o tendão responde homeostaticamente mudando suas propriedades estruturais (HAYASHI, 1996).

O exercício físico não tem somente um efeito local sobre os tendões, os quais estão constantemente sujeitos à força de tensão, compressão ou ambas durante o treinamento ou atividade física, mas também um efeito sistêmico (VIIDIK, 1996). As variações na intensidade e programas de exercício induzem mudanças na circulação hormonal que podem alterar o metabolismo dos componentes da matriz extracelular dos tendões (CURWIN *et al.*, 1988). Com relação ao peso corpóreo dos animais estudados não houve diferenças significativas que pudessem ser atribuídas ao tipo de local em que permaneceram durante os 60 dias, assim a tensão muscular gerada em resposta ao peso dos animais foi praticamente a mesma nos dois grupos. Esse aspecto parece ter sido irrelevante para os resultados obtidos, porém um ponto a ser considerado foi a maior atividade física dos animais de ambiente amplo.

Os dados sobre biomecânica de tendões na literatura são contraditórios. Não há evidências de um padrão consistente para o efeito do movimento ativo em tendões e ligamentos. Enquanto alguns autores sugerem um aumento da resistência após o exercício, outros dizem que esse fato não ocorre (TIPTON *et al.*, 1986). BARFRED (1971) averiguou que a força máxima de tensão era significativamente maior em tendões de ratos livres do que em ratos domésticos e VIIDIK (1969) chegou a resultados semelhantes onde a força máxima aplicada em tendões de coelhos treinados era maior.

As fibras tendíneas possuem uma forma ondulada durante o repouso, porém precisam de uma pequena força para se perfilarem, uma vez nessa condição, a força de resistência ao estiramento dessas fibras é aumentada. Por essa razão que a inclinação da curva tensão x deformação aumenta bruscamente e se torna não linear (WOO *et al.*, 1980). No teste de tensão x deformação sob tração, nossos dados mostram que os tendões dos animais de ambiente amplo suportam o dobro de tensão e deformaram quase 10% mais quando comparados com os tendões dos animais criados em ambiente restrito. As fibras de colágeno

são consideradas as provedoras da força tensional (SCOTT *et al.*, 1997) e a resistência à tensão está diretamente correlacionada com a quantidade de *cross-links* colagênicos (VIIDIK 1978). O declínio na curva de tensão x deformação ocorreu quando a resistência oferecida pelo tendão diminuiu pela falência desses *cross-links* e a deformação consequentemente aumentou pelo sucessivos rompimentos das fibras até o completo colapso dos tendões.

WOO e colaboradores (1980; 1981) estudaram as propriedades mecânicas de tendões de suínos e verificaram que o treinamento resultava em um aumento da resistência à tensão e um menor deslocamento sob força máxima. Em nossos estudos os tendões dos animais de ambiente amplo deslocaram um comprimento menor quando o pico de força (N) era máximo e maior em relação aos de ambiente restrito.

Devemos lembrar que os animais desse estudo são bípedes e portanto possuem características anatômicas e biomecânicas diferentes dos membros dos quadrúpedes. WOO e colaboradores (1980; 1981; 1982) mostraram que em porcos as propriedades mecânicas dos tendões extensores se modificaram quando foram submetidos à exercícios físicos, enquanto que os flexores não foram afetados. Uma explicação para este fato seria a atividade normal "de treino" que os flexores possuem, mesmo quando não submetidos à um protocolo de exercício, sendo portanto uma atividade rotineira e espontânea. Esses dados corroboram com a observação de que a força máxima de contração tetânica é maior nos flexores do que nos extensores (ELLIOTT & CRAWFORD, 1965).

O tendão do músculo flexor digital superficial, estudado neste trabalho, tem a região proximal (Sp) comprimida pelo osso sesamóide do tendão *calcaneus communis* contra a tróclea da tíbia, assim essa região Sp sofre, além da força de tração inerente a todo tendão, forças compressivas. A região epifisária proximal do osso tarsometatarsal possui uma proeminência óssea, o *hipotarso*, sobre a qual está a região intermediária (Si) que recebe também forças compressivas porém provavelmente em menor grau quando comparada com a

região Sp. Sob a região distal (Sd), desse tendão, não é notado nenhum acidente ósseo, assim essa parte do tendão sofre preponderantemente forças de tração (KOCH, 1973 e GHETIE *et al.*, 1981). Essa divisão foi necessária para avaliar as propriedades físicas assim como o conteúdo e o tipo de glicosaminoglicano presente em cada região.

O teste de intumescimento, descrito por KOOB & VOGEL (1987), avalia a presença de glicosaminoglicano e colágeno presente nas regiões de compressão e tensão. Os resultados obtidos neste estudo mostram que no tratamento com ácido acético, as regiões que receberam só força de tração (Sd) intumesceram mais, que as regiões que receberam forças de compressão (Sp e Si) para ambos grupos de animais. Porém, quando confrontamos os dois grupos, pode ser observado que os animais de ambiente amplo tiveram maior intumescimento em todas as regiões. Esses resultados estão de acordo com a dosagem de hidroxiprolina, mostrando que os tendões dos animais de ambiente amplo possuem uma maior quantidade de colágeno, principalmente na região Sd, quando comparados com os animais de ambiente restrito. A maior ou menor permeabilidade da trama do tecido à ação de PBS, água e ácido acético, utilizados no teste de intumescimento, pode ser explicado pela presença de diferentes graus de compactação ou agregação das fibrilas de colágeno, assim como, a sua organização e tamanho e ainda a frequência das ligações intermoleculares e a possível influência da interação entre as fibrilas de colágeno e proteoglicanos (GRODZINKY, 1983).

O exercício ativo não forçado aumentou a concentração de colágeno nos tendões e seu efeito foi mais pronunciado nas regiões que sofrem tração. Esses resultados sugerem que o tendão exercitado altera a produção de colágeno promovendo mudanças microscópicas e macroscópicas para se fortalecer (WOO *et al.*, 1980).

O conteúdo de glicosaminoglicanos, em ambos os grupos, foi maior na região Sp seguida da Si e Sd. Quando comparamos cada região especificamente, considerando-se a área em que foram mantidos, a única que apresentou diferença significativa foi a Sd, mostrando

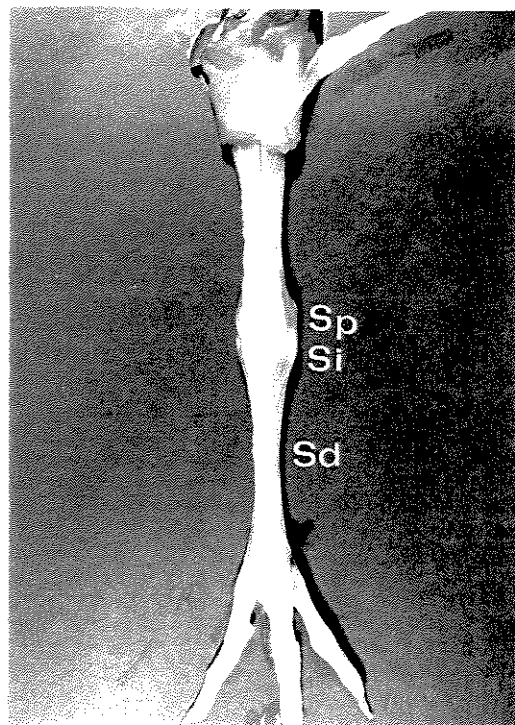
uma maior quantidade de glicosaminoglicanos nos tendões dos animais mantidos em ambiente amplo em relação aos mantidos em ambiente restrito. O fato das concentrações de glicosaminoglicanos nas regiões de compressão terem sido praticamente as mesmas, independente dos animais serem de ambiente amplo ou restrito, pode ser devido à força aplicada sobre essas regiões ter sido de intensidade semelhante e não ter sido suficiente para alterar o padrão de expressão dos glicosaminoglicanos. Porém, a força de tração aplicada nos tendões de ambiente amplo foi muito provavelmente maior devido à própria atividade física e a frequência dessa atividade o que resultou uma maior quantidade de glicosaminoglicanos especialmente na região tipicamente de tração. Resultados semelhantes foram descritas por GILLARD e colaboradores (1979). A diferença quantitativa de glicosaminoglicanos entre os dois grupos de animais na região de tração é um indicativo de uma maior quantidade de pequenos proteoglicanos presente nessa região dos tendões dos animais de ambiente amplo. Esses proteoglicanos parecem atuar na organização da fibra de colágeno habilitando o tecido à resistir forças tencionais (VOGEL & MEYERS, 1999).

Proteoglicanos e glicosaminoglicanos têm sido descritos em tendões, tanto em região de compressão como de tração. SCOTT e colaboradores (1981) demonstraram a presença de ácido hialurônico em animais jovens enquanto que nos indivíduos idosos o dermatam sulfato aparece em regiões de tensão e o condroitim sulfato em regiões que suportam compressão (VOGEL & KOOB, 1989 e SELL & MONNIER, 1995). Nos tendões calcâneo e flexor digital profundo de ratos também foi observada a presença de condroitim sulfato em regiões que receberam compressão e dermatam sulfato nas regiões de tensão (COVIZI *et al.*, 2001). Nossos dados estão de acordo com os da literatura onde Sp e Si, regiões de compressão, apresentam condroitim sulfato e na região de tração, Sd, o dermatam sulfato para ambos grupos analisados.

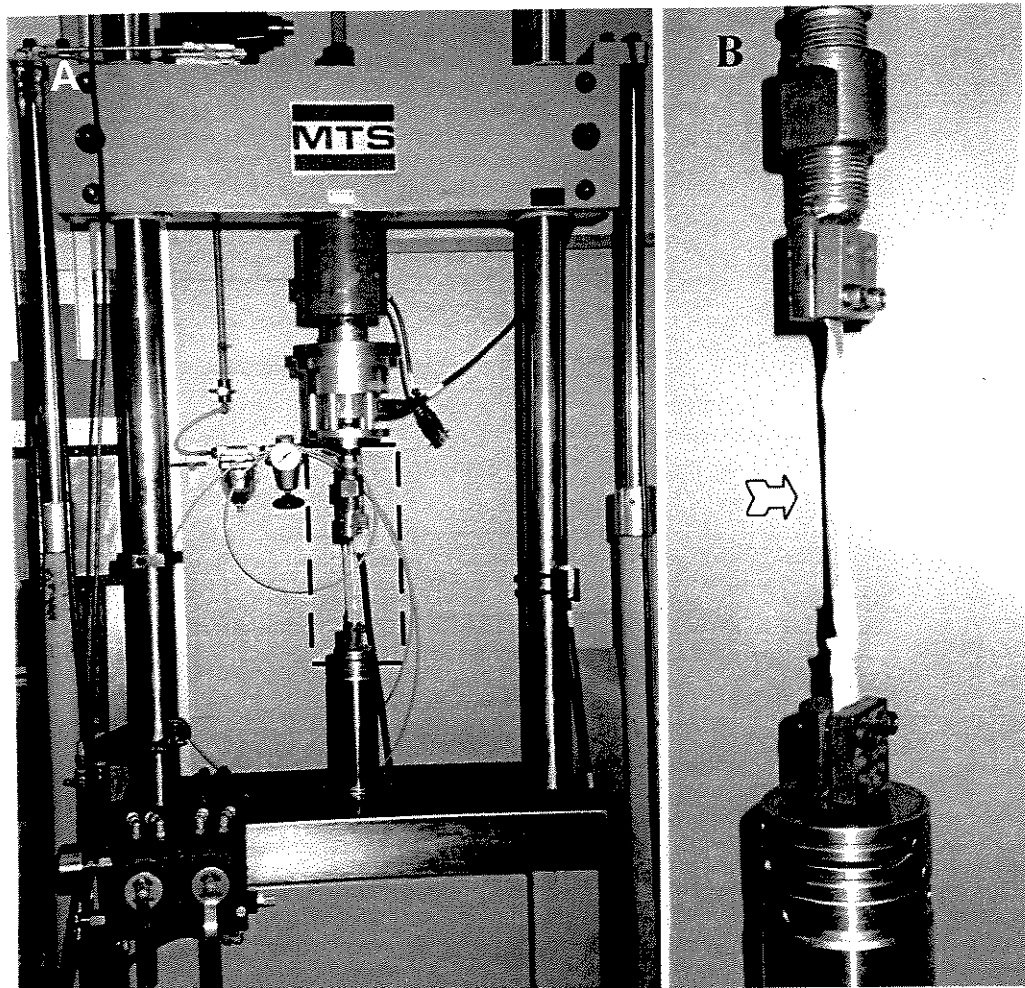
Os resultados biomecânicos obtidos mostram os efeitos positivos do exercício ativo não forçado nas propriedades estruturais e mecânicas dos tendões de animais que foram criados em ambiente livre. A verticalização da curva tensão x deformação e a força de resistência são maiores com o exercício. Esses resultados são sustentados pelos estudos bioquímicos. O conteúdo de colágeno aumentado nos tendões dos animais criados em ambiente amplo também é resultado do exercício praticado.

Com os dados obtidos neste trabalho, foi possível observar que os animais submetidos ao exercício físico ativo não forçado, porém com liberdade de movimentação, apresentaram tendões mais resistentes à ruptura e com maior concentração de colágeno do que os animais confinados. Esses resultados dão subsídios para futuras discussões relacionadas com o exercício físico, tendão e constituintes de matriz através de outros tipos de análises.

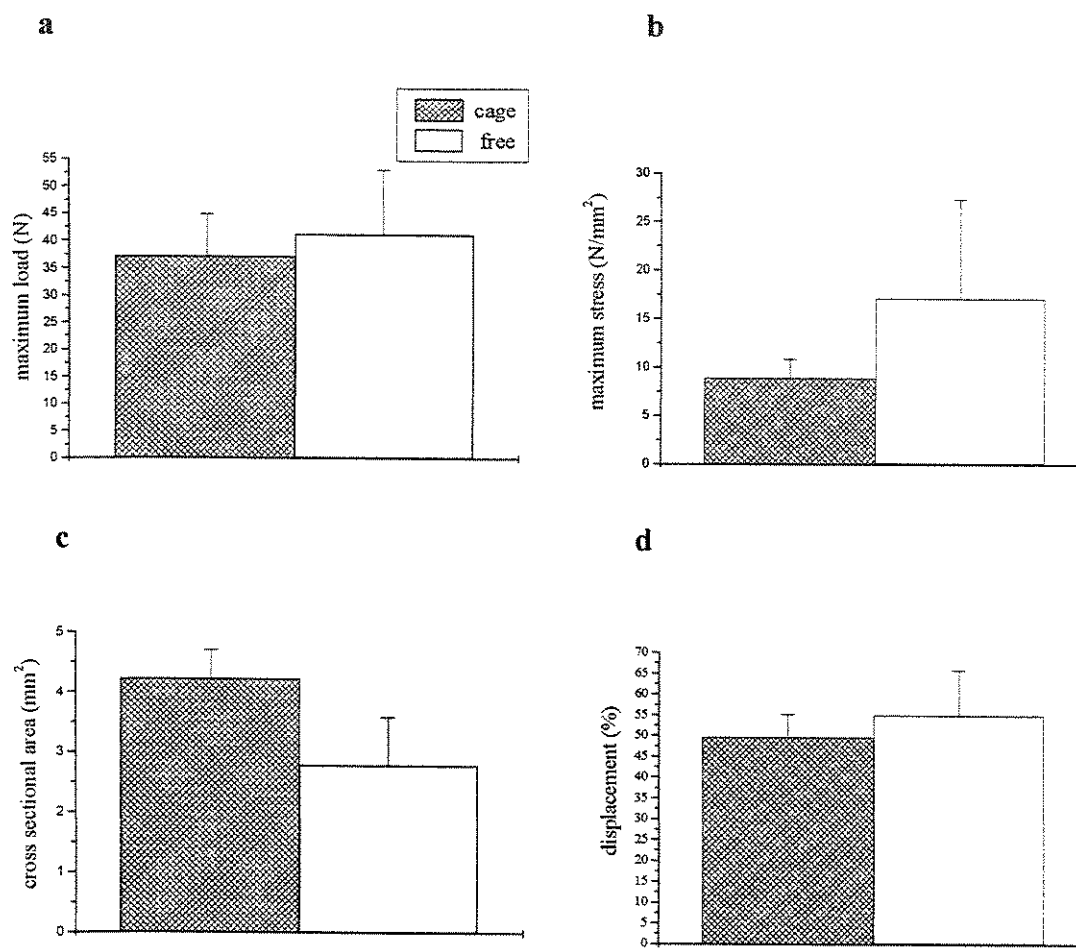
**Fig. 01.** Vista posterior do tendão do músculo flexor digital superficial de frango. O tendão em estudo foi dividido em três regiões: proximal (Sp) que contorna a tróclea da tíbia; intermédia (Si) que corresponde ao terço proximal do osso metatarsal e a distal (Sd) que está sobre os outros dois terços distais do osso metatarsal.



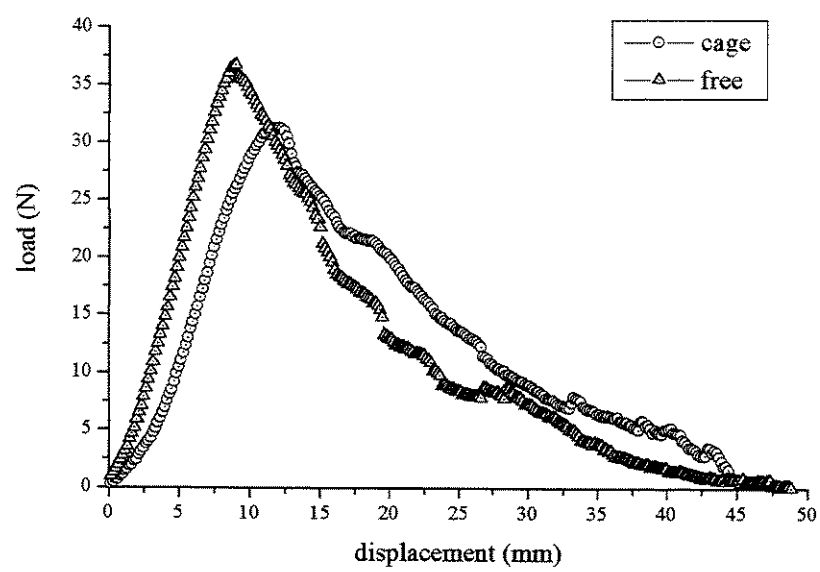
**Fig. 02.** Equipamento TESTSTAR II, MTS (A) e a fixação do tendão flexor superficial digital (seta) ao anteparo mecânico (B) para a realização do teste mecânico de deformação sob tração.



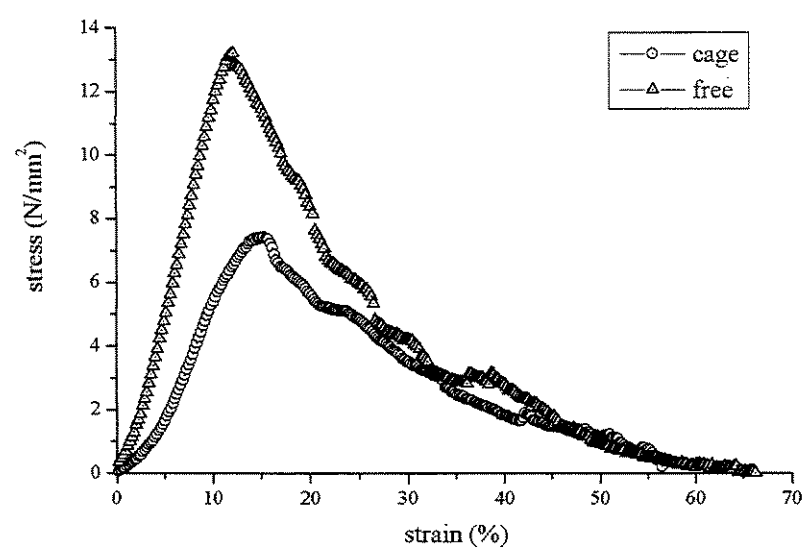
**Fig. 03.** Propriedades mecânicas do tendão do músculo flexor digital superficial de frango. Os tendões dos animais mantidos em ambiente amplo exibiram maiores carga máxima (a), tensão máxima (b) e deslocamento final (d). A área de secção transversa dos tendões dos animais de ambiente restrito foi entretanto maior do que a média dos animais criados em ambiente amplo (c). A média e o desvio padrão são expressados para  $n = 10$  para cada grupo.



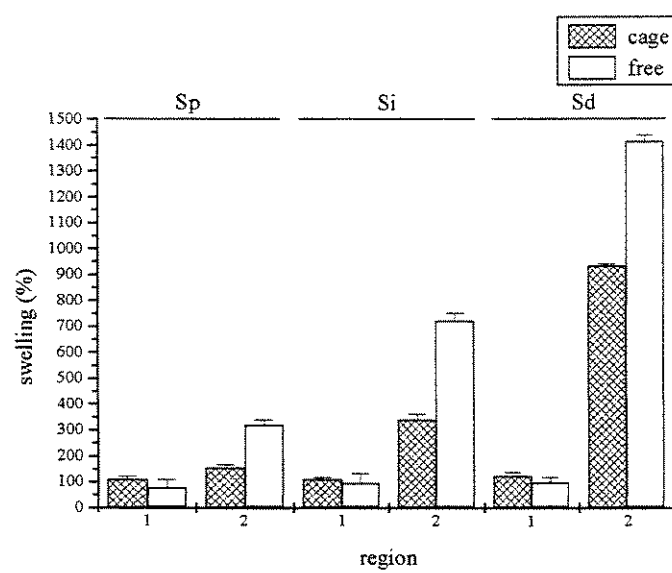
**Fig. 04.** Curva força x deslocamento do tendão do músculo flexor digital superficial de frango. A força máxima aparente foi de  $36,69 \pm 12,22\text{N}$  para os tendões do grupo de ambiente amplo ( $-\Delta-$ ) e  $31,26 \pm 11,50\text{N}$  para o grupo de ambiente restrito ( $-\square-$ ). O deslocamento no pico de força foi maior para o grupo de ambiente restrito  $12,16 \pm 0,04\text{mm}$  quando comparado com o grupo de ambiente amplo  $9 \pm 0,03\text{mm}$ . Observar que houve um deslocamento máximo de  $44,59\text{mm}$  e  $48,84\text{mm}$  para os tendões dos animais de ambiente restrito e amplo, respectivamente.



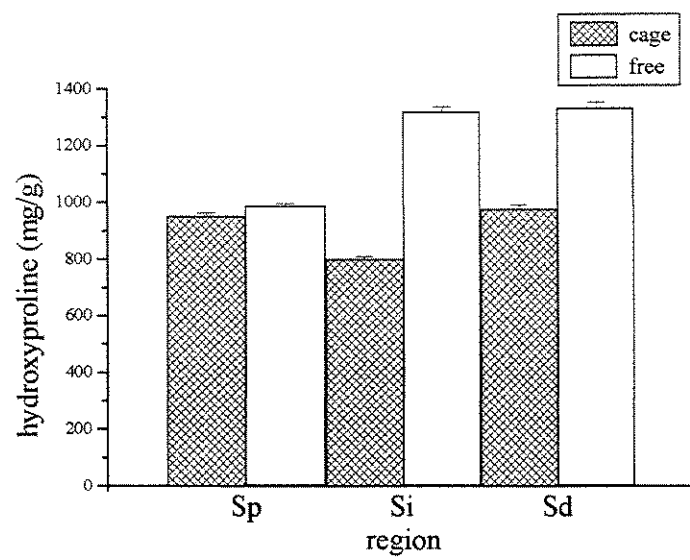
**Fig. 05.** Curva tensão x deformação do tendão do músculo flexor digital superficial de frango. Os tendões dos animais de ambiente amplo (—△—) apresentaram uma tensão máxima aparente de 13,20MPa e os tendões dos animais de ambiente restrito (—□—) 7,40MPa, porém para esta tensão máxima a deformação foi 14,98% para o grupo restrito e de 12,22% para o grupo amplo. Os tendões atingiram o máximo de deformação de 56,49% e 66,28% para os animais de ambiente restrito e amplo respectivamente.



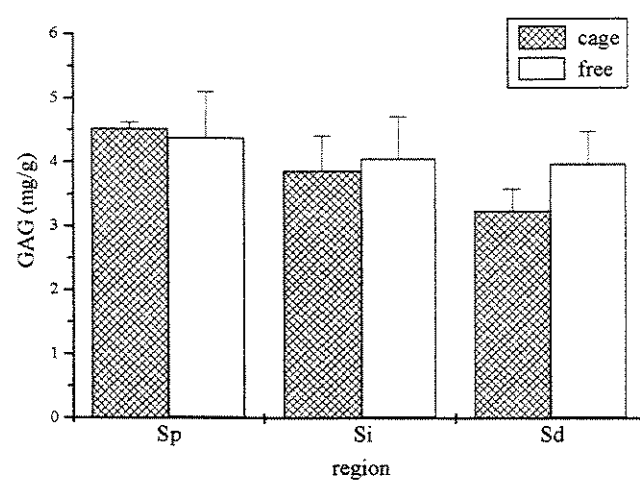
**Fig. 06.** Teste de intumescimento do tendão do músculo flexor digital superficial de frango. Os números na abscissa se referem ao tratamento com água (1) e tratamento com ácido acético (2). Os dados percentuais (média  $\pm$  desvio padrão) de cada tratamento correspondem ao valor obtido das amostras dos tendões dos animais mantidos em ambiente restrito e amplo.



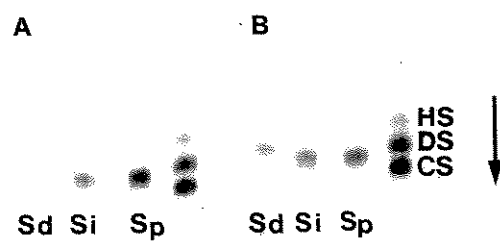
**Fig. 07.** Concentração de hidroxiprolina (mg/g de tecido) das diferentes regiões dos tendões dos animais mantidos em ambiente restrito e amplo. Um maior conteúdo de hidroxiprolina é observado nos tendões dos animais de ambiente amplo, especialmente nas porções Si e Sd destes tendões.



**Fig. 08.** Concentrações de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG mg/g de tecido) das diferentes regiões dos tendões dos animais mantidos em ambiente restrito e amplo. As regiões Sp e Si apresentaram maior conteúdo de GAG para o grupo de animais de ambiente amplo quando comparado com os animais de ambiente restrito, porém na região Sd ocorreu o inverso.



**Fig. 09.** Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos das diferentes regiões dos tendões dos animais mantidos em ambiente restrito (A) e amplo (B). As regiões de compressão, Sp e Si, apresentaram predominantemente condroitim sulfato enquanto que Sd, região de tensão, apresentou dermatam sulfato para ambos grupos analisados. Padrões de condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foram analisados em paralelo.



## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, R. McN. & DIMERY, N. J. 1985. The significance of sesamoids and retroarticular processes for the mechanics of joints. *J. Zool., (A)* 205:375-371.
- BARFRED, T. 1971. Experimental rupture of the achilles tendon. *Acta Orthop. Scand.* 42: 406-428.
- BENJAMIN, M. & RALPHS, J. R. 1998. Fibrocartilage in tendons and ligaments - an adaptation to compressive load. *J. Anat.*, 193: 481-495.
- BIRK, D. E., HAHN, R. A., LINSENMAYER, C. Y. & ZYCBAND, E. I. 1996. Characterization of fibril segments from chicken embryo cornea, dermis and tendon. *Matrix Biol.*, 15: 111-118.
- BIRK, D. E. & TRELSTAD, R. L. 1986. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle and macroaggregate formation. *Cell Biol.*, 103 (1): 231-240.
- CARPENTER, J. E., FLANAGAN, C. L., STAVROS, T., YIAN, E. H. & SOSLOWSKY, L. J. 1998. The effects of overuse combined with intrinsic or extrinsic alterations in an animal model of rotator cuff tendinosis. *Am. Sports Med.*, 26 (6): 801-807.
- CHIQUET, M. , 1999. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.*, 18: 417-426.
- 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.
- CURWIN, S. L., VAILAS, A. C. & WOOD, J. 1988. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* 65 (5): 2297-2301.
- CURWIN, S. L., ROY, R. R. & VAILAS, A. C. 1994. Regional and age variation in growing tendon. *J. Morphol.* 221: 309-320
- DIETRICH, C. P. & DIETRICH, S. M. C. 1976. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffer. *Anal. Biochem.*, 70: 645-647.
- ELLIOTT, D. H. & CRAWFORD, G. N. C. 1965. The thickness and collagen content of tendon relative to the strength and cross-sectional area of muscle. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 162: 137-146.
- EVANKO, S. P. & VOGEL, K. G. 1990. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix*, 10: 420-436.
- EZURA, Y., CHAKRAVARTI, S., OLDBERG, A., CHERVONEVA, I. & BIRK, D. E. 2000. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *Cell Biol.*, 151 (4): 779-787.

- FARNDALE, R. W., BUTTLE, D. J. & BARRET, A. J. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 883: 173-177.
- FUJII, T. 1993. Effects of environment on the biomechanical properties of patellar tendons. MS thesis, Hokkaido University Graduate School of Engineering, Sapporo.
- GHETIE, V., CHITESCU, St., COTOFAN, V. & HILLEBRAND, A. 1981. *Atlas de anatomía de las aves domésticas*. Acribia-Paraninfo, Zaragoza and Madrid, 294pp.
- GILLARD, G. C., REILLY, H. C., BELL-BOOTH, P. G. & FLINT M. H. 1979. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycans content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect. Tissue Res.*, 7: 37-46.
- GRODZINKY, A. J. 1983. Electrochemical and physicochemical properties of connective tissue. *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 9: 133-139.
- HAYASHI, K. 1996. Biomechanical studies of the remodeling of knee joint tendons and Ligaments. *J. Biomech.*, 29 (6): 707-716.
- HUKINS, D. W. L. & ASPDEN, R. M. 1985. Composition and properties of tissues. *TIBS.*, 10: 260-264.
- IOZZO, R. V. & MURDOCH, A. D. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB.*, 10: 598-614.
- KER, R. F., 1999. The design of soft collagenous load-bearing tissues. *J. Exp. Biol.*, 202: 3315-3324.
- KER, R. F., ALEXANDER, R. McN. & BENNETT, M. B. 1988. Why are mammalian tendons so thick? *Zool. Lond.*, 216: 309-324.
- KNUDSON, C. B. & KNUDSON W. 2001. Cartilage proteoglycans. *Cell Dev. Biol.*, 12: 69-78.
- KOCK, T. 1973. Locomotion System. In: B. H. Skold & L. DeVRIES (ed.) *Anatomy of the Chicken and Domestic Birds*. Ames, Iowa, USA, The Iowa State University Press, pp. 6-60.
- KOOB, T. J. & VOGEL, K. G. 1987. Site related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J. Orthop. Res.*, 5: 414-424.
- KUC, I. M. & SCOTT, P. G. 1987. Increase diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissue. *Connect. Tissue Res.*, 36 (4): 287-296.
- MATSUDA, J. J., ZERNICKE, R. F., VAILAS, A. C. PEDRINI, V. A., PEDRINI-MILLE, A. & MAYNARD, J. A. 1986. Structural and mechanical adaptation of immature bone to strenuous exercise. *J. Appl. Phys.*, 60: 2028-2034.

- MERRILEES, M. J. & FLINT, M. H. 1980. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am. Anat.*, 157: 87-106.
- MICHELACCI, Y. M. & HORTON, D. S. P. O. 1989. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Copm. Biochem. Physiol.* 96B: 651-658.
- NEAME, P. J., McQUILLAN, D. J., BEALES, M. P. & HASSELL, J. R. 2000. Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57: (5) 859-863.
- O'BRIEN, M., 1997. Structure and metabolism of tendons. *Scand. Med. Sci. Sports*, 7: 55-61.
- OLDBERG, A., ANTONSSON, P., LINDBLOM, K. & HEINEGÅRD, D. 1989. A collagen-binding 59kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO.*, 8: 2601-2604.
- PEREZ-CASTRO, A. V. & VOGEL K. V. 1999. In situ expression of collagen and proteoglycan genes during development of fibrocartilage in bovine deep flexor tendon. *Bone Res. Soc.*, 17: 139-148.
- REID, T. & FLINT, M. H. 1974. Changes in glycosaminoglycan content of healing rabbit tendon. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 31(2): 489-495.
- ROSENBERG, L. C., CHOI, H. U., TANG, L. H., JOHNSON, T. L., PAL, S., WEBBER, C., REINER, A. & POOLE, A. R. 1985. Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J. Biol. Chem.*, 260: 6304-6313.
- SCHECHTMAN, H. & BADER, D. L. 1997. In vitro fatigue of human tendons. *J. Biomech.*, 30 (8): 829-835.
- SCOTT, J. E. & HUGHES, E. W. 1986. Proteoglycan-collagen relationships in developing chick and bovine tendons: Influence of the physiological environment. *Connect. Tissue Res.*, 14: 267-278.
- SCOTT, J. E., ORFORD, C. R. & HUGHES, E. W. 1981. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tails tendon. An electron-microscopical and biochemical investigation. *Biochem.*, 195: 573-581.
- SCOTT, P. G., NAKANO, T. & DODD, C., M. 1997. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochem. Biophys. Acta*, 1336: 254-262.
- SELL, D. R. & MONNIER, V. M. 1995. Aging of long-lived proteins: extracellular matrix (collagens, elastins and proteoglycans). In: E. J. MASORO (ed) *Handbook of physiology Section 11: Aging*. Oxford University Press, NY.
- STEGEMANN, H. & STALDER, K. 1967. Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta*, 18: 267-273.

- TIPTON, C. M., VAILAS, A. C. & MATTHES, R. D. 1986. Experimental studies on the influences of physical activity on ligaments, tendons and joints: A brief review. *Acta Med. Scand., Suppl. 711*: 157-168.
- TOHYAMA, H. & YASUDA, K. 2000. The effects of stress enhancement on the extracellular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J. Biomech.*, 33: 559-565.
- VIIDIK, A. 1969. Tensile strength properties of achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. *Acta Orthop. Scand.*, 40: 261-272.
- VIIDIK, A. 1978. On the correlation between structure and mechanical function of soft connective tissues. *Verh. Anat. Ges.*, 72: 75-89.
- VIIDIK, A. 1996. In: W. D., COMPER (ed) Tendons and Ligaments. *Extracellular Matrix. Tissue Function*. University of Aarhus, Denmark, Melbourne, Australia, Harwood Academic Publishers, pp. 303-327.
- VOGEL, K. G. & HEINEGÅRD, D. 1985. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J. Biol. Chem.*, 260: 9298-9306.
- VOGEL, K. G. & MEYERS, B. 1999. Proteins in the tensile region of adult bovine deep flexor tendon. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 367S: 344-355.
- VOGEL, K. G., SANDY, J. D., PAGONY, G. & ROBBINS, J. R. 1994. Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol.*, 14: 171-179.
- VOGEL, K. G. & KOOB, T. J. 1989. Structural specialization in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.*, 115: 267-293.
- WOO, S. L.-Y. 1982. Mechanical properties of tendons and ligaments. I. Quasi-static and nonlinear viscoelastic properties. *Biorheology*, 19: 385-396.
- WOO, S. L.-Y., RITTER, M. A., AMIEL, D., SANDERS, T. M., GOMEZ, M. A., KUEL, S. C., GARFIN, S. R. & AKESON, W. H. 1980. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons - long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect. Tissue Res.* 7: 177-183.
- WOO, S. L.-Y., GOMEZ, M. A., AMIEL, D., RITTER, M. A., GELBERMAN, R. H. & AKESON, W. H. 1981. The effects of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. *J. Biomech. Eng.* 103: 51-56
- WOO, S. L.-Y., WANG, C. W., NEWTON, P. O. & LYON, R. M. 1990. The response of ligaments to stress deprivation and stress enhancement - biomechanical studies. In: D. DANIEL, W. H. AKESON, & J. J. O'CONNER, (eds) *Knee ligaments : Structure, Function, Injury and Repair*. New York, USA, Raven Press, pp. 337-350.

## CONCLUSÕES GERAIS

As análises bioquímicas demonstraram que existem diferenças contundentes, principalmente na concentração colágeno e glicosaminoglicanos, entre as regiões de tração e compressão dos tendões flexores digitais e entre os dois grupos de animais. O sequenciamento da região N-Terminal dos proteoglicanos comprovou a presença de decorim e fibromodulim em todas as regiões analisadas.

Os testes de tensão x deformação sob tração estão de acordo com os achados bioquímicos. Os tendões dos animais mantidos em ambiente amplo apresentaram maior resistência a tração, menor deformação em tensão máxima e maior deformação antes da ruptura.

Com esse estudo se conclui que a situação anatômica do tendão e principalmente o exercício ativo não forçado influenciam a composição da matriz extracelular nos tendões flexores digitais de frangos.