


ROBERTO VILARTA ^{7.}

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo Sr. Roberto Vilarta e aprovada pela Comissão Julgadora.

Campinas, 09/10/86


Modificações das propriedades anisotrópicas e de resistência à tração de tendões calcaneares de ratos submetidos ao exercício físico e à denervação.

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

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Campinas, 1986

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico este trabalho à

Angelo , meu pai

Maria Aurora , minha mãe

e Marcelina, minha companheira

que durante todos estes anos apoiaram
e participaram, com amor, deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a participação e apoio de diversas pessoas e entidades, às quais, agradeço:

Angelo e Maria Aurora, pelo amor e compreensão em todos os momentos. Marcelina, pelo estímulo, amizade, presença, companheirismo, dedicação e, sobretudo, pelo amor.

Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, que soube entender, estimular, participar, orientar e compartilhar, com amizade, humanidade e espírito científico, deste trabalho.

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela análise crítica desta tese, rigor científico frente à atividade de pesquisa e eficiência administrativa frente à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e à Secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Profa. Dra. Antonia Dalla Pria Bankoff, pelo entusiasmo, apoio e pela valiosa análise e sugestões para o presente trabalho.

Prof. Dr. João Francisco Marques Neto, pelas críticas e sugestões durante a leitura do manuscrito.

Dna. Luiza P. Burghi, pelos valiosos ensinamentos das técnicas de laboratório, alegria e amizade.

Aos amigos do Depto. de Biologia Celular, Dulce, Cida, Prof. Angelo, Profa. Dra. Shirley, Prof. Dr. Edson e Profa. Dra. Lúcia pelas sugestões, amizade e auxílio.

Aos amigos Gilson, Marco e Dean pela ajuda nas horas de "desespero" frente ao uso do microcomputador e pelas sugestões e redação do ABSTRACT.

Sra. Ana Gagliardi, bibliotecária chefe do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas sugestões e correção das REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Alzido de Oliveira e também ao Prof. Dr. Walter Antonio Fernandes, ambos da UFSCar, que me iniciaram nesta carreira mostrando trabalho científico, dedicação ao ensino, apoio e amizade.

Ao Depto. de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, onde o presente trabalho foi realizado.

Ao CNPq., Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa de estudos durante a participação deste curso.

A Reitoria da UNICAMP, pela concessão da Bolsa de Incentivo à Pesquisa que recebi durante parte deste curso.

Esta tese também é fruto daqueles que, de modo indireto, contribuem com seu trabalho, sofrimento e amor para o engrandecimento da humanidade.

INDICE

	Pag.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Animais e Condições Experimentais.....	16
2.2. Experimento Biomecânico.....	19
2.3. Experimento Biofísico.....	21
2.4. Análise Estatística.....	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Alterações Morfológicas.....	23
3.2. Modificações das Propriedades Biomecânicas.....	25
3.3. Modificações das Propriedades Biofísicas.....	29
4. DISCUSSÃO.....	36
4.1. Considerações Gerais.....	36
4.2. Tensão de Ruptura Modificada pelo Exercício Físico.....	36
4.3. Birrefringência de Forma Modificada pelo Exercício.....	38
4.4. Relação com os Fenômenos de Reparo e Envelhecimento.....	39
4.5. Comportamento Biomecânico Influenciado por GAGA.....	40
4.6. Comportamento Biofísico Influenciado por GAGA.....	41
4.7. Rigidez Elástica Modificada pelo Exercício Físico.....	43
4.8. Níveis de Cristalinidade dos Tendões.....	46
4.8.1. Birrefringência Intrínseca.....	46

4.8.2. Birrefringência Intrínseca Relativa.....	47
4.9. Modificações das Características Hidrofóbicas dos Feixes...	49
4.10. Mecanismos de Controle do Processo de Adaptação.....	50
4.10.1. Mecanismos que Envolvem uma Ação Preferencialmente Celular.....	51
4.10.2. Mecanismos que Envolvem uma Ação Preferencialmente Extracelular.....	53
4.11. Adaptação dos Tendões à Denervação.....	56
4.12. Considerações Finais.....	58
5. CONCLUSÕES.....	59
6. RESUMO.....	61
7. ABSTRACT.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO:

O papel da Fisioterapia no tratamento de pacientes ortopédicos e reumáticos tem sido de importância fundamental quando se considera a limitação dos recursos cirúrgicos e farmacológicos durante o processo de reabilitação funcional do sistema locomotor.

A aplicação de recursos fisioterápicos ao longo do processo de recuperação funcional visa, principalmente, a atenuação da dor, o aumento da amplitude dos movimentos articulares e o restabelecimento da função do segmento anatômico afetado.

A maioria dos recursos fisioterápicos utilizados tem por objetivo preparar os tecidos do organismo para uma solicitação funcional ativa que se caracteriza, neste caso, pelo exercício físico.

Ao longo do processo de reabilitação, o que se observa, na maioria dos casos, é uma resposta favorável do organismo à recuperação funcional, notando-se um aumento do nível de trofismo muscular e a reestruturação do equilíbrio articular, que é função da integridade mecânica de tecidos fibrosos, como a cápsula articular, ligamentos e tendões.

Durante a estimulação funcional do sistema locomotor, seja pelo exercício físico ativo ou pela manipulação passiva dos segmentos articulados, os tendões são estruturas intensamente solicitadas sob o ponto de vista biomecânico, sendo, inclusive, responsáveis pela transmissão do trabalho muscular aos ossos onde têm inserção.

Considerando o aspecto estrutural, o tendão consiste de um arranjo hierarquizado de macromoléculas que associadas dão origem a

fibrilas, fibras e feixes de fibras dispostos em paralelo ao seu eixo maior e está constituído principalmente por uma proteína denominada colágeno que lhe confere flexibilidade, grande resistência à tração e uma relativa inextensibilidade (ELLIOTT, 1965a).

Em associação ao esqueleto protéico formado pelos feixes de colágeno, ocorrem as glicosaminoglicanas ácidas (GAGA), predominantemente o dermatosulfato em tendões de animais adultos, além da elastina e glicoproteínas estruturais (GPE) (ELLIOTT, 1965a; CHVAPIL, 1967; JACKSON & BENTLEY, 1968; MERRILEES & FLINT, 1980).

Este quadro estrutural, dada a aparente simplicidade de número e arranjo de seus componentes, torna os tendões do sistema locomotor verdadeiro "modelo experimental" para o estudo das adaptações que um sistema biológico pode desenvolver quando solicitado por alterações das exigências mecânicas.

O desenvolvimento de uma plasticidade ao longo do processo de adaptação a diferentes níveis de exigência funcional tem sido creditado às interações entre os elementos da matriz extracelular e as glicoproteínas de superfície presentes na membrana plasmática dos fibroblastos do tendão (MERRILEES & FLINT, 1980).

Alguns mecanismos têm sido propostos para elucidar a questão da adaptação funcional dos feixes de colágeno, que no entender de alguns autores, frente à solicitação mecânica, dariam origem a potenciais eletroquímicos determinantes de alterações no metabolismo celular e do nível organizacional dos elementos da matriz extracelular (VIDAL, 1966, 1969; PARRY et alii, 1982; ROTH & FREUND, 1982).

A adaptação funcional induzida pelo aumento da carga sobre o tendão parece alterar de maneira pouco significativa o quadro morfo-

lógico quando se utilizam nos experimentos animais que já atingiram níveis superiores de maturidade esquelética (INGELMARK, 1948).

Já o exercício físico em animais jovens determina um acréscimo de 25% na área de secção transversal do tendão, a elevação do número de células na cartilagem articular e do nível de trofismo de tendões e ligamentos, além de um aumento do número de núcleos de fibroblastos e no diâmetro dos feixes de colágeno, quando comparados aos animais controle (INGELMARK, 1945, 1948; TIPTON et alii, 1970; WOO, 1980; PAUKKONEN et alii, 1985). Análises ultraestruturais, desenvolvidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão, dão conta de um aumento de 29% do número de fibras por unidade de área, queda do diâmetro médio, além de um acréscimo do diâmetro de fibras grossas determinando assim uma distribuição bimodal do número de fibras, com a predominância de fibras espessas (OAKES et alii, 1982; MICHNA, 1984).

Estes dados morfológicos encontram correlação positiva aos achados bioquímicos e biomecânicos obtidos em experimentos similares, nos quais foram utilizados animais submetidos a treinamento físico.

O estudo do metabolismo dos fibroblastos e dos componentes da matriz extracelular tem evidenciado a ocorrência de uma elevação da taxa de síntese e degradação do colágeno e de outras proteínas no tendão de animais treinados e um decréscimo desta taxa em animais sujeitos à inatividade física (ANDERSON et alii, 1971; HEIKKINEN & VUORI, 1972). O conteúdo total de colágeno, o peso seco dos tendões e a incorporação de hidroxiprolina são também parâmetros bioquímicos de importância fundamental na análise das modificações que ocorrem ao longo do treinamento físico e neste caso vários autores têm encontrado valo-

res superiores destes parâmetros em animais exercitados (TIPTON et alii, 1970; KIISKINEN, 1977; SUOMINEN et alii, 1980; WOO et alii, 1980; VAILAS et alii, 1981).

As observações de que a atividade física acelera o "turnover" de minerais e de substâncias orgânicas e também aumenta a vascularização em ossos longos, deixam claro que além dos tendões, os demais componentes do sistema locomotor podem ter alteradas algumas de suas características bioquímicas no processo de adaptação a uma nova realidade funcional (ANDERSON et alii, 1971; HEIKKINEN & VUORI, 1972; CHVAPIL, 1973; KIISKINEN & SUOMINEN, 1975).

Alguns autores acreditam e têm evidenciado que a presença de fibras de colágeno de grosso calibre guarda relação com o aumento da síntese de colágeno observado em tendões submetidos a uma elevação da solicitação funcional ou em regiões do tendão sujeitas apenas a força de tração (TIPTON et alii, 1970; KIISKINEN & HEIKKINEN, 1978; MERRILEES & FLINT, 1980; MICHNA, 1984).

Os levantamentos efetuados por PARRY et alii (1978) em diferentes animais demonstram que o diâmetro médio das fibras de colágeno em tendões, aumenta da época do nascimento até a maturidade quando então apresentam uma distribuição com a predominância de fibras espessas. Da mesma forma, SCOTT et alii (1981) determinaram que, ao longo do processo de maturação dos elementos da matriz extracelular "in vivo", ocorre um aumento superior a dez vezes no diâmetro das fibras em tendões de rato. Os primeiros autores, baseados em dados experimentais (BAILEY et alii, 1970), sugerem que a quantidade de ligações cruzadas intrafibrilares é maior em fibras de grosso calibre do que na massa correspondente de colágeno em fibras de menor espessura. A presença de

fibras de grosso calibre é uma característica de tendões que em condições normais de uso suportam grandes esforços de tração e este tem sido um dos argumentos favoráveis à tese de que em função da elevada quantidade de ligações cruzadas intrafibrilares, as fibras de colágeno de diâmetro elevado possuem altos níveis de resistência à tração.

Em paralelo, deve ser destacada a importância dos experimentos "in vitro" no reconhecimento de altas taxas de aumento da resistência à tração em fibras reconstituídas de colágeno solubilizado, sendo que valores superiores ocorrem nas fases iniciais do processo de maturação (DANIELSEN, 1981). Além disso, outros trabalhos têm evidenciado uma correlação positiva entre os valores de resistência à tração (kg/mm^2) e o diâmetro das fibras de colágeno (nm), respectivamente em tendão (6,0 ; 150-500), pele (1,2 ; 100-200) e cartilagem (0,1 ; 40-100) (PARRY et alii, 1978).

Parece haver assim uma estrita relação entre a presença de fibras de grosso calibre, o estabelecimento de ligações cruzadas intrafibrilares e a ocorrência de propriedades biomecânicas superiores em tendões sujeitos aos processos de maturação ou de adaptação à sobrecarga.

Por outro lado, além das modificações morfológicas e bioquímicas dos feixes de colágeno, têm sido investigadas as alterações quantitativas dos demais elementos da matriz extracelular, principalmente as GAGs, frente à adaptação a uma diferente condição funcional ou ao processo de envelhecimento. A quantificação da concentração de hexosamina em tendões de animais treinados, no entanto, revelou alterações não significativas, o que leva a considerar uma diferença na resposta entre os componentes da matriz extracelular frente à solici-

tação mecânica (TIPTON et alii, 1970; HEIKKINEN & VUORI, 1971; SUOMINEN et alii, 1980).

Avaliações do papel das GAGs e sua importância nas modificações das propriedades biomecânicas dos tendões são levadas a efeito por meio da degradação enzimática tecidual seguida da aplicação de testes de resistência à tração e deformação frente à carga. PARTINGTON & WOOD (1963) usando hialuronidase testicular para atacar a matriz interfibrilar do tendão obtiveram valores inferiores das propriedades biomecânicas após a aplicação da enzima, o que se contrapõe à afirmação que "o ácido hialurônico parece não desempenhar papel de importância nas propriedades mecânicas de pele e aorta de acordo com a presente metodologia" (OXLUND & ANDREASSEN, 1980).

Outros autores têm afirmado que a remoção da substância fundamental de tendão e aorta, fazendo uso de agentes quelantes e alfa amilase, induz a um decréscimo nos níveis de tensão de ruptura e rigidez elástica nestes tecidos, em função de uma mudança das interações das fibras de colágeno com as glicoproteínas da matriz (MINNS, SODEN & JACKSON, 1973). Este trabalho, no entanto, é contestado por OXLUND & ANDREASSEN (1980) que, com a aplicação da degradação enzimática por alfa amilase em filmes reconstituídos a partir de extrato purificado de colágeno de pele, mostraram ter esta enzima a capacidade de alterar as propriedades mecânicas neste tipo de preparação.

Este quadro controverso que se instala quando da análise da participação dos componentes da matriz extracelular nas propriedades biomecânicas dos tecidos, além de outros fatores, é resultado da inespecificidade e nível de pureza de algumas enzimas e também da variabilidade em número e dificuldade de acesso enzimático aos elementos da matriz extracelular.

O fato de não ocorrer alteração na concentração de GAGA em tendões de animais exercitados associado à constatação que o ácido hialurônico não influencia as propriedades biomecânicas em pele e aorta não impede que se levante a hipótese de modificações de ordem qualitativa destes elementos durante o processo de adaptação funcional.

Dados experimentais levantados acerca da distribuição de diâmetro das fibras de colágeno e o tipo e quantidade de GAGA em tendões têm indicado prováveis mecanismos nos quais o diâmetro das fibras pode ser alterado em eventos de modificação das forças externas.

O tendão flexor profundo dos dedos de coelhos, em função do ângulo formado quando passa pelo calcâneo e tálus, caracteriza-se por possuir uma biomecânica e morfologia especiais. Na região sujeita a forças de compressão e naquela que apenas resiste à tração observa-se que a razão condroitino sulfato ; dermato sulfato equivale a 3.0 e 0.5 respectivamente (GILLARD et alii, 1977). A zona de tensão mostra-se com fibras altamente agregadas, com diâmetro que varia de 15 a 330 nm e uma distribuição bimodal, enquanto na região que sofre compressão encontram-se fibras frouxamente empacotadas com diâmetro de 15 a 270 nm e uma distribuição unimodal com a predominância de fibras finas (MERRILEES & FLINT, 1980).

Estas evidências têm levado alguns autores a sugerir que o crescimento lateral das fibrilas seria regulado pelas variações da concentração das GAGA e a postular que altas concentrações de condroitino sulfato inibiriam o crescimento da fibrila até o diâmetro médio de 150 nm, sendo este processo alterado por um aumento da concentração de dermato sulfato, resultando no crescimento em diâmetro das fibrilas (PARRY et alii, 1982).

Em paralelo às alterações bioquímicas, as pesquisas que se detêm principalmente na análise das modificações das propriedades biomecânicas têm caracterizado o tendão como um tecido de fibras paralelas de colágeno com uma elevada resistência e flexibilidade, considerável inextensibilidade e quase perfeita elasticidade (ELLIOTT, 1965a; VIIDIK, 1973; RUNDGREN, 1974).

O comportamento dos tendões, durante a aplicação de carga até que ocorra a ruptura das fibras, tem sido analisado através de curvas de tensão de tração-deformação que são representações gráficas dos pontos correspondentes aos valores de aumento do comprimento linear do tendão (deformação) e o respectivo aumento da carga aplicada em função da área de secção transversal (tensão de tração) do espécime.

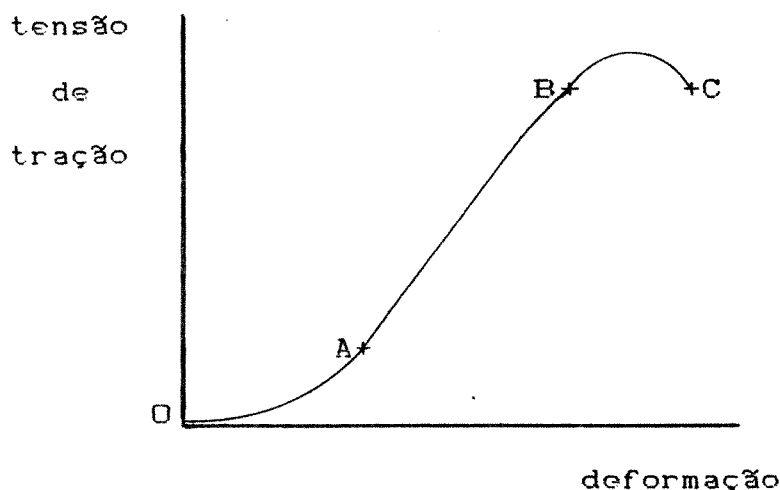


Figura 1 - Padrão de curva tensão de tração-deformação para tendões (VIIDIK, 1973).

A Figura 1 representa o aspecto sigmóide padrão para curva de tensão de tração-deformação de tendões. A porção inicial O-A cor-

responde ao desaparecimento das ondulações observadas em feixes de colágeno quando não sujeitos à carga. O segmento A-B é a porção linear da curva que corresponde à rigidez elástica do tendão numericamente representado pela tangente do ângulo entre o eixo de deformação e a inclinação desta porção linear. O último segmento, a porção B-C, corresponde à fase plástica onde ocorre a ruptura da maioria das fibras dos feixes de colágeno (VIIDIK, 1973).

O desenvolvimento de propriedades biomecânicas superiores tem sido notado em tendões de animais treinados inclusive com independência do nível de maturação do animal (jovem ou adulto) e tipo de exercício aplicado (corrida ou natação) (INGELMARK, 1945; ROLLHAUSER, 1954a; TIPTON et alii, 1967; VIIDIK, 1967, 1969; ZUCKERMAN & STULL, 1969; WOO, 1980).

O valor de resistência à tração tende a ser superior em tendões e ligamentos de animais treinados (RASCH et alii, 1960; VIIDIK, 1967; TIPTON et alii, 1970; WOO, 1980). No entanto, quando consideradas as preparações totais do sistema osso-tendão-músculo-tendão-osso, o treinamento físico é pouco eficaz em alterar este parâmetro biomecânico uma vez que, comumente, a ruptura ocorre no ponto de inserção tendinosa na cortical óssea (VIIDIK, 1969). Este fato é aqui salientado com o objetivo de caracterizar a importância do estudo das propriedades biomecânicas dos tendões isolados, não do ponto de vista fisiológico do organismo como um todo, mas da validade deste "modelo" para avaliações das alterações de ordem estrutural e biomecânica.

Além de ser influenciada pelo aumento da demanda funcional, a resistência à tração do tendão é também elevada à medida que progride o processo de maturação do animal até a idade adulta e o mesmo

ocorre em fibras reconstituídas de colágeno nas fases iniciais do processo de maturação "in vitro" (VIIDIK, 1973; DANIELSEN, 1981).

Outras propriedades biomecânicas podem ser alteradas pelo exercício ou pelo processo de maturação. VIIDIK (1967) demonstrou que o treinamento físico conduz a uma elevação do valor de rigidez elástica do tendão tibial posterior de coelho representada por um aumento do ângulo da porção linear da curva de tensão de tração-deformação. Ele conclui que esta modificação deve ocorrer em função de alterações qualitativas da matriz extracelular do tendão. Um aumento da rigidez elástica é também observado à medida em que avança o processo de envelhecimento dos feixes de colágeno "in vivo" e "in vitro" (DIAMANT e alii, 1972; DANIELSEN, 1981).

Diferenças nas propriedades biomecânicas podem ser observadas em tendões de diferentes músculos ou grupos musculares. GILLAR et alii (1977) relatam que os tendões flexores do pé mostram curvas de tensão de tração-deformação diferentes daquelas de tendões extensores. ELLIOTT (1965c) reporta diferenças significativas na resistência à tração dos tendões de músculos fusiformes ($2,5 \text{ kg/mm}^2$) e de músculos peniformes ($1,5 \text{ kg/mm}^2$). Considerando o fato que a espessura dos tendões de músculos de prolongada atividade postural (peniformes) tende a ser superior aquela de tendões de músculos que promovem amplos e rápidos movimentos, ELLIOTT (1965 b) sugere que o aumento em espessura do tendão pode ser influenciado mais pela duração e frequência da ação muscular do que pela intensidade da força aplicada. Os músculos peniformes, responsáveis pela manutenção de prolongada atividade postural tendem a ter elevados também os valores de rigidez elástica de seus tendões em animais treinados (VIIDIK, 1967, 1969).

Se por um lado o aumento da demanda funcional é capaz de modificar muitas características morfológicas e biomecânicas do tecido conjuntivo, o mesmo reage estruturalmente à privação da atividade de movimento imposta pela imobilização ou denervação. Em animais imobilizados é observada, em associação a uma atrofia tecidual ligamentar e a um aumento da razão de "turnover" do colágeno, uma redução da rigidez elástica e da máxima carga de ruptura do complexo ósteo-ligamentar (NOYES et alii, 1974; AMIEL et alii, 1982).

Já a denervação de um grupo muscular do sistema locomotor pode induzir alterações de ordem biomecânica que em parte se assemelham às que ocorrem durante o processo de imobilização. Apesar de ser observada uma redução no valor de resistência à tração em tendões e ligamentos (NOYES et alii, 1974) e um aumento da razão de "turnover" do colágeno (KLEIN et alii, 1977) é constatado por ELLIOTT (1965b), após a denervação de grupos musculares de animais em desenvolvimento, um aumento da espessura do tendão denervado de aproximadamente 75% em comparação ao tendão controle.

Tem-se observado também que ao longo do processo de reparo de tendões seccionados experimentalmente, o aumento da solicitação funcional, seja pelo treinamento físico ou pela mobilização passiva dos segmentos, é capaz de elevar o nível de resistência à tração destes tendões expressando assim a importância deste tipo de estímulo durante a fibrillogênese (ELLIOTT, 1965a; VAILAS et alii, 1981; WOO et alii, 1981).

Pelo que foi até então descrito a respeito das modificações morfológicas, bioquímicas e biomecânicas dos tendões sujeitos a diferentes condições de funcionalidade, é possível avaliar a importância

do estímulo mecânico nas atividades de síntese, maturação e reparo dos feixes de fibras paralelas da matriz extracelular.

Em função do arranjo hierarquizado de agregados fibrilares de cadeias polipeptídicas de colágeno, proteoglicanas e GPE, os tendões apresentam características biofísicas de ordem molecular que lhes conferem a qualidade de estrutura anisotrópica por exibir mais de um índice de refração para direções determinadas e diferentes de propagação da luz (VIDAL, 1964, 1980, 1984).

O estudo das propriedades anisotrópicas (dicroísmo e birrefringência) permite que sejam detectadas e quantificadas as modificações do nível de ordenação molecular e o estado de agregação dos biopolímeros altamente organizados, como aqueles encontrados na matriz extracelular dos tendões, ligamentos, cartilagem articular e tecido ósseo. As avaliações qualitativas e quantitativas destas propriedades dos tendões, têm permitido a alguns pesquisadores uma interpretação das bases moleculares e arranjo dos componentes da matriz extracelular envolvidos nos processos de fibrilogênese, ossificação, inflamação e envelhecimento. Assim, a análise do dicroísmo dos feixes de colágeno corados com azul de toluidina a pH 4.0 e o estudo das variações de birrefringência de forma em cortes de tendão sob a ação da hialuronidase testicular mostraram, respectivamente, a orientação macromolecular das GAGA e a íntima participação destas nas propriedades biofísicas dos feixes de colágeno (VIDAL, 1963, 1964).

No processo de reparo do tecido conjuntivo nota-se, após a lesão, uma desordem estrutural e perda da orientação molecular das GAGA que precedem a desagregação dos feixes de colágeno. No decorrer da fibrilogênese aumenta o nível de orientação das moléculas de GAGA

uma vez que aumenta o dicroísmo seguido pelos primeiros sinais de birrefringência, os quais evidenciam a estruturação e agregação dos feixes de colágeno (VIDAL, 1966).

Já a análise das propriedades anisotrópicas de tendões em processo de envelhecimento revela um aumento da agregação e uma elevação dos níveis de cristalinidade dos feixes de colágeno além de modificações do conteúdo, reatividade ao corante e orientação das GAGA, dados que podem ser associados a uma diminuição da água tecidual durante este processo (ENGEL & ZERLOTTI, 1967; MELLO et alii, 1979).

Também durante o desenvolvimento de ossos longos, uma vez que a matriz extracelular do tecido cartilaginoso serve de substrato para a deposição de minerais, observa-se que as GAGA possuem um alinhamento altamente organizado principalmente nas zonas de vacuolização e calcificação, sendo encontradas exibindo um arranjo helicoidal (VIDAL, 1977).

Além disso, a análise das propriedades anisotrópicas tem permitido que se estabeleçam a contribuição das GPE na orientação macromolecular dos elementos da matriz extracelular, o papel dos carboidratos na agregação dos feixes de colágeno e os padrões de curvas de birrefringência de forma de regiões da cartilagem articular (VIDAL 1980, 1986 ; VIDAL & VILARTA, 1986).

No entanto, poucos trabalhos experimentais têm relacionado as alterações da demanda funcional impostas ao tecido conjuntivo e as modificações das propriedades anisotrópicas dos feixes de colágeno demais elementos da matriz extracelular.

ROLLHÄUSER (1954a), utilizando cortes espessos obtidos por microtomia de congelamento, detectou uma elevação de 20% no valores d

birrefringência de forma em tendões de animais treinados. A metodologia empregada para estudar o assunto, no entanto, pode ser criticada sob vários aspectos, sendo que os tendões considerados como controle eram extirpados no início do experimento, estando o tendão contralateral remanescente sujeito ao processo de envelhecimento e a um aumento desproporcional da sobrecarga .

Todas estas modificações até aqui relatadas tornam evidente o fato que as alterações no nível de atividade funcional são capazes de modificar vários parâmetros da estrutura, composição e arranjo dos componentes do tecido conjuntivo. Tem-se procurado explicar, neste caso, os mecanismos de regulação da atividade celular e sua relação com os elementos que desempenham o papel de sustentação mecânica.

Alterações do ambiente bioquímico influenciadas pela ação de forças mecânicas são demonstradas no arranjo de cadeias moleculares em tendões tensionados (RIGBY et alii, 1959; MOSLER et alii, 1985), formação de radicais e valências livres (FLINT, 1972; REID & FLINT, 1974) e nas modificações das propriedades tintoriais dos feixes de colágeno submetidos à tensão (FLINT & MERRILEES, 1977).

Além disso, várias modificações da quantidade, tipo e estado de orientação das GAGA são notadas durante o desenvolvimento embrionário dos feixes de colágeno em tendão (ELLIOTT, 1965a), durante a fibrillogênese no processo de maturação (WOOD, 1960) e no processo de reparo após lesão (VIDAL, 1966).

Desta forma, VIDAL (1966, 1969) propõe que os feixes de colágeno, quando submetidos à tensão, sofram deslocamentos intra e intermoleculares o que daria origem a uma mensagem aos elementos fibroblásticos sendo, portanto, considerados transdutores da informação mecânica para a informação química.

De fato, alguns autores têm considerado que as variações de carga de superfície nos feixes de colágeno em diferentes estados funcionais seriam a base para a transformação do estímulo mecânico em eventos químicos, sendo este um dos fatores de regulação de síntese para manter o nível de GAGA na matriz extracelular (GILLARD et alii, 1979a; MERRILEES & FLINT, 1980).

Parece assim apropriado que se trace um estudo paralelo das propriedades biofísicas e biomecânicas dos feixes de colágeno em condições de animais submetidos a diferentes condições de funcionalidade como o exercício e a denervação, o que permitirá uma interpretação da relação estrutura-função baseada na organização molecular dos componentes da matriz extracelular.

Assim, constitui-se o objetivo deste trabalho a detecção de modificações do estado de agregação, orientação macromolecular e nível de cristalinidade dos feixes de colágeno decorrentes do processo de adaptação funcional além do estabelecimento de uma correlação com as modificações biomecânicas induzidas por estas alterações estruturais.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1 - Animais e Condições Experimentais:

Foram utilizados 90 ratos machos Wistar com idade de 100(\pm 7) dias e peso de 282(\pm 18) gramas no início do período em que foi desenvolvido o experimento.

Os ratos foram separados ao acaso em três grupos de 30 animais e submetidos aos seguintes procedimentos experimentais:

GRUPO CONTROLE - Os animais deste grupo, durante o período experimental, estiveram sujeitos às condições normais de um biotério em gaiolas que permitiam a atividade física sem restrições.

GRUPO EXERCÍCIO - Neste grupo os animais a serem treinados passaram por um processo gradual de adaptação à corrida em uma esteira rolante durante um período de três dias até atingirem o limite médio de sua capacidade máxima a esse exercício. Após o período de adaptação foram submetidos a exercício diário durante 60 minutos, 5 dias por semana, em uma esteira rolante inclinada com 20 graus de aclive em relação à horizontal a uma velocidade de 13 centímetros por segundo. Esta esteira rolante (Figura 2) foi por nós projetada e construída de forma a permitir o treinamento físico de pequenos animais. Constitui-se de dois cilindros de borracha dispostos em paralelo que dão apoio a uma esteira de tecido impermeável. Os eixos dos cilindros estão apoiados em rolamentos fixos a uma estrutura de madeira e um deles faz conexão com um conjunto

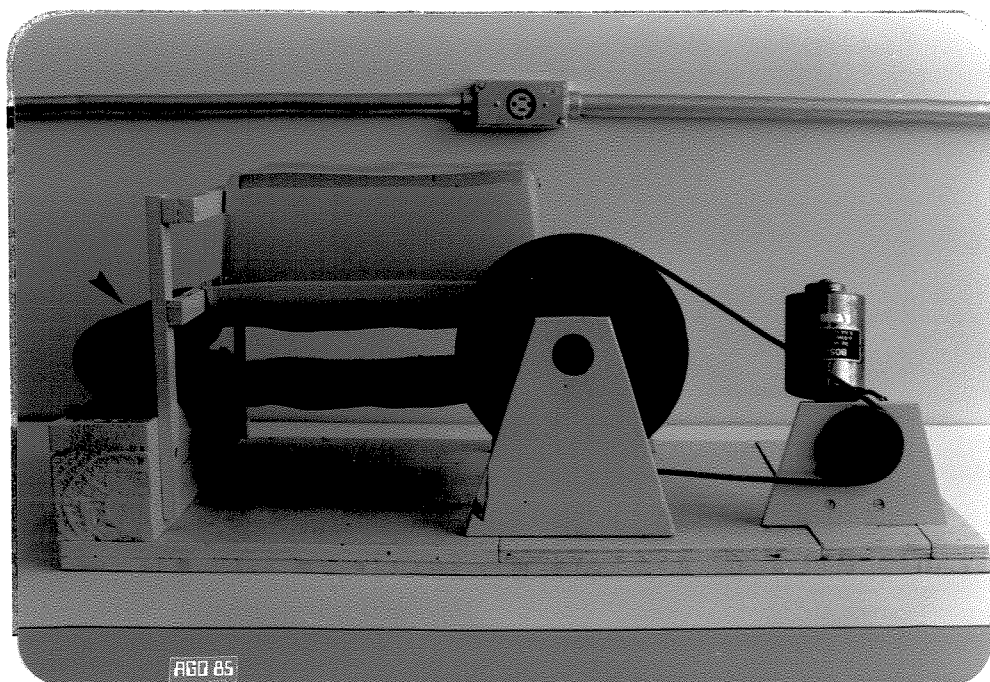


Figura 2 - Fotografia do aparelho em que se observa a esteira rolante (▲) utilizada para o treinamento físico dos animais do **GRUPO EXERCÍCIO**.

roldana-correia-roldana que lhe transmite o movimento de rotação de um motor elétrico de corrente contínua de 6/12 volts. Sobre a esteira está posicionada uma caixa de plástico com fundo falso e com dois compartimentos o que permite o exercício simultâneo de dois animais.

GRUPO DENERVADO - No início do período experimental os ratos deste grupo sofreram a denervação dos músculos da perna com o objetivo de inativar a ação do músculo tríceps sural que atua sobre o tendão de Aquiles. O procedimento de denervação deu-se através de uma incisão cirúrgica asséptica ao nível femoral em ambos os membros posteriores. Identificado o nervo ciático, procedeu-se à secção e extirpação de um segmento de 10 (dez) milímetros do trajeto do nervo para evitar o processo de regeneração. Após sutura da pele, os animais foram colocados em gaiolas individuais por um período de três dias para evitar a dilaceração da ferida cirúrgica e em seguida voltaram às condições normais do biotério.

Aos animais dos três grupos foi fornecida ração e água sem nenhuma restrição quanto a quantidade e volume. Após um período experimental de 30 (trinta) dias, durante os quais ficaram sujeitos às condições descritas, os animais foram sacrificados e por meio da dissecação dos membros posteriores foram isolados os tendões calcaneares limpos em solução fisiológica e submetidos a avaliações de suas propriedades biomecânicas e biofísicas.

2.2 - Experimento Biomecânico:

Uma vez isolado, um tendão de cada animal foi submetido à quantificação de suas características morfológicas e biomecânicas. O comprimento do tendão de Aquiles é de aproximadamente 12 milímetros. Usando um paquímetro com precisão de 0,05 milímetros, a largura e a espessura do tendão foram determinadas para os cálculos da área de secção cruzada. Durante estes procedimentos, para que não houvesse o ressecamento das fibras, os tendões foram banhados, gota a gota, com solução fisiológica. Cada tendão foi fixado entre duas garras metálicas que fazem parte de um conjunto mecânico usado para determinar suas propriedades biomecânicas (Figura 3). A seguir, um aumento gradual da carga foi aplicado sobre o tendão que tende à deformação até a ruptura das fibras. Durante este procedimento de ruptura foram anotados os valores de deformação ($\mu\text{m}/\text{mm}$) correspondentes aos valores de tensão de tração (kg/mm^2) sendo elaborada, em seguida, a curva de tensão de tração-deformação de cada tendão a partir da qual foram analisados os seguintes parâmetros biomecânicos:

TENSAO DE RUPTURA - Máximo valor de força (N) normalizado pela área de secção cruzada (mm^2) obtido no momento em que ocorreu a ruptura do tendão o que corresponde à resistência máxima à tração.

TANGENTE DE ALFA - é o coeficiente de inclinação da porção linear da curva de tensão de tração-deformação, o que corresponde à rigidez elástica do tendão.

O valor de TANGENTE DE ALFA foi calculado por computador através da equação de regressão dos pontos da porção linear de cada curva.



Figura 3 - Fotografia do conjunto mecânico usado na avaliação das propriedades de resistência máxima à tração e de rigidez elástica dos tendões calcaneares dos animais dos diferentes grupos experimentais. Uma das garras metálicas é móvel (▲) e está conectada a um recipiente ao qual é adicionada a carga de maneira gradual. Associada à garra móvel encontra-se uma alavanca micrométrica de proporção 1:100 (não apresentada), que permite a leitura dos valores de deformação à medida que ocorre a adição da carga.

2.3 - Experimento Biofísico:

O tendão remanescente de cada animal foi usado para uma avaliação quantitativa da propriedade anisotrópica de birrefringência.

Para isso, o material foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M a pH 7,4 e glutaraldeído a 5% durante 24 horas em temperatura aproximada de 5° C. Seguida à fixação, os tendões foram lavados em água destilada por 30 minutos, desidratados em concentração crescente de etanol (70% até 100%) e diafanizados em óleo de cedro. Após banhos sucessivos em parafina à temperatura de 60° C o material foi incluído em bloco para a obtenção de cortes longitudinais de 10 (dez) μ m de espessura em micrótomo apropriado (R. JUNG-HEIDELBERG).

Os cortes foram então desparafinizados em banhos de xilol e em mistura de metanol-clorofórmio 1:1, sendo em seguida hidratados.

Tem sido demonstrado que os feixes de colágeno de tendões processados pela técnica descrita acima permanecem com suas características anisotrópicas inalteradas (VIDAL et alii, 1975).

As medições dos retardos ópticos induzidos por estes cortes na luz polarizada foram efetuadas fazendo uso de um microscópio de polarização Zeiss com luz monocromática ($\lambda=546$ nm) e compensadores de Sénarmont ($\lambda/4$) e Bräce-Köhler ($\lambda/10$ e $\lambda/20$), após embebição por duas horas em meios fluidos com diferentes índices de refração, a começar pela água ($n=1,333$), soluções aquosas de glicerol a 20% ($n=1,360$), 40% ($n=1,386$), 60% ($n=1,413$), 80% ($n=1,435$), glicerol ($n=1,471$) e nujol ($n=1,479$), como sugerido por VIDAL et alii (1975).

Em cada meio de embebição foram tomadas 30 medidas em diferentes pontos de cada corte considerando assim a heterogeneidade de distribuição dos feixes de colágeno dentro de um mesmo tendão.

As curvas de birrefringência de forma foram determinadas plotando-se os valores médios de retardo óptico (nm) de todos os tendões de um mesmo grupo em função do índice de refração (n) dos diferentes meios de embebição.

2.4 - Análise Estatística:

Os dados obtidos nos experimentos biomecânico e biofísico foram comparados através da análise mono-fatorial das variâncias pelos microcomputadores do Centro de Informática do Instituto de Biologia da UNICAMP, aplicando-se o pacote estatístico MICROSTAT, versão 4.1, desenvolvido por ECOSOFT, INC.

3. RESULTADOS:

3.1 - Alterações Morfológicas:

A nível macroscópico, o período de 30 dias em que os animais dos grupos experimentais estiveram sujeitos às condições descritas foi suficiente para determinar o aparecimento de um intenso quadro atrófico tanto da pele como do tecido muscular nos espécimes do grupo DENERVADO (Figura 4). Não foi notado em nenhum dos animais uma regeneração das extremidades do nervo ciático que levasse à recuperação dos movimentos dos músculos afetados. Durante a dissecação pode-se notar diferenças no comprimento e largura do tendão calcanear dos ratos denervados em relação à mesma estrutura dos animais do grupo CONTROLE sendo um provável resultado do processo de atrofia do ventre muscular. A pele por sua vez apresentou aspecto atrófico, ressecado e um excesso de aderência aos planos musculares em todo o segmento posterior.

Já os animais do grupo EXERCÍCIO, durante o período de 30 dias de treinamento físico, desenvolveram um quadro hipertrófico do tecido muscular o que pode ser notado com evidência ao se observar a Figura 4, que permite a comparação visual do aspecto anatómico do membro posterior dissecado de animais dos grupos EXERCÍCIO e CONTROLE assegurando que, neste caso, as estruturas tendíneas passaram por um processo de acentuação dos esforços de tração a que normalmente estão submetidas. O aspecto macroscópico da pele e tendão calcanear dos animais destes dois grupos manteve-se praticamente o mesmo após o período experimental de 30 dias.

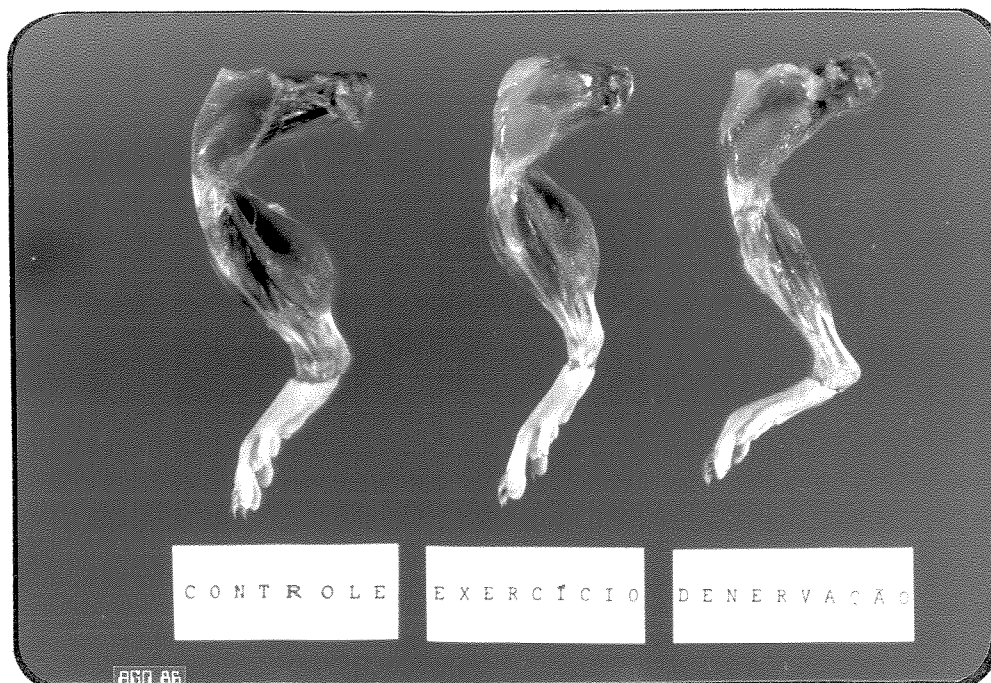


Figura 4 - Preparações totais de membro posterior direito de ratos dos diferentes grupos após serem submetidos às condições experimentais descritas. Nota-se uma discreta hipertrofia dos músculos das lojas anterior e posterior da perna do animal do grupo EXERCÍCIO. Já no animal submetido à denervação observa-se o aspecto atrófico da pele que recobre a pata e a atrofia dos grupos musculares da perna podendo-se notar, inclusive, um aumento em comprimento do tendão calcanear.

3.2 - Modificações das Propriedades Biomecânicas:

A Figura 5 mostra curvas de tensão de tração-deformação de tendões de animais dos diferentes grupos. Estas curvas demonstram um comportamento não-linear que é característico para este tipo de material biológico. A rigidez do tecido tendinoso é pequena quando este suporta pequenas tensões e eleva-se gradualmente com o aumento da deformação. Nota-se a elevada rigidez do tendão de um animal do grupo EXERCÍCIO e também o valor de tensão de ruptura superior para o tendão do animal do grupo DENERVADO.

RESISTÊNCIA A TRAÇÃO: O resultado da análise de variância do parâmetro de **TENSÃO DE RUPTURA** que caracteriza a resistência à tração é mostrado juntamente com as médias e o desvio padrão dos grupos na Tabela 1. O período experimental a que estiveram sujeitos os animais foi suficiente para conferir aos tendões dos espécimes do grupo EXERCÍCIO um aumento significativo da resistência à tração (Tabela 2).

Da mesma forma e com uma tendência a apresentar valores de resistência à tração ainda superiores, os tendões dos animais do grupo DENERVADO apresentaram valores significativos bastante elevados de **TENSÃO DE RUPTURA**, ocorrendo um aumento superior a 90% em relação aos mesmos valores do grupo CONTROLE, quando considerada a média de todos os casos.

RIGIDEZ ELÁSTICA: As médias dos valores de **TANGENTE DE ALFA** obtidas no experimento biomecânico dos tendões são apresentadas na Tabela 3.

Uma diferença significativa entre os grupos EXERCÍCIO e CONTROLE e entre os grupos DENERVADO e CONTROLE (Tabela 4) pode ser obser

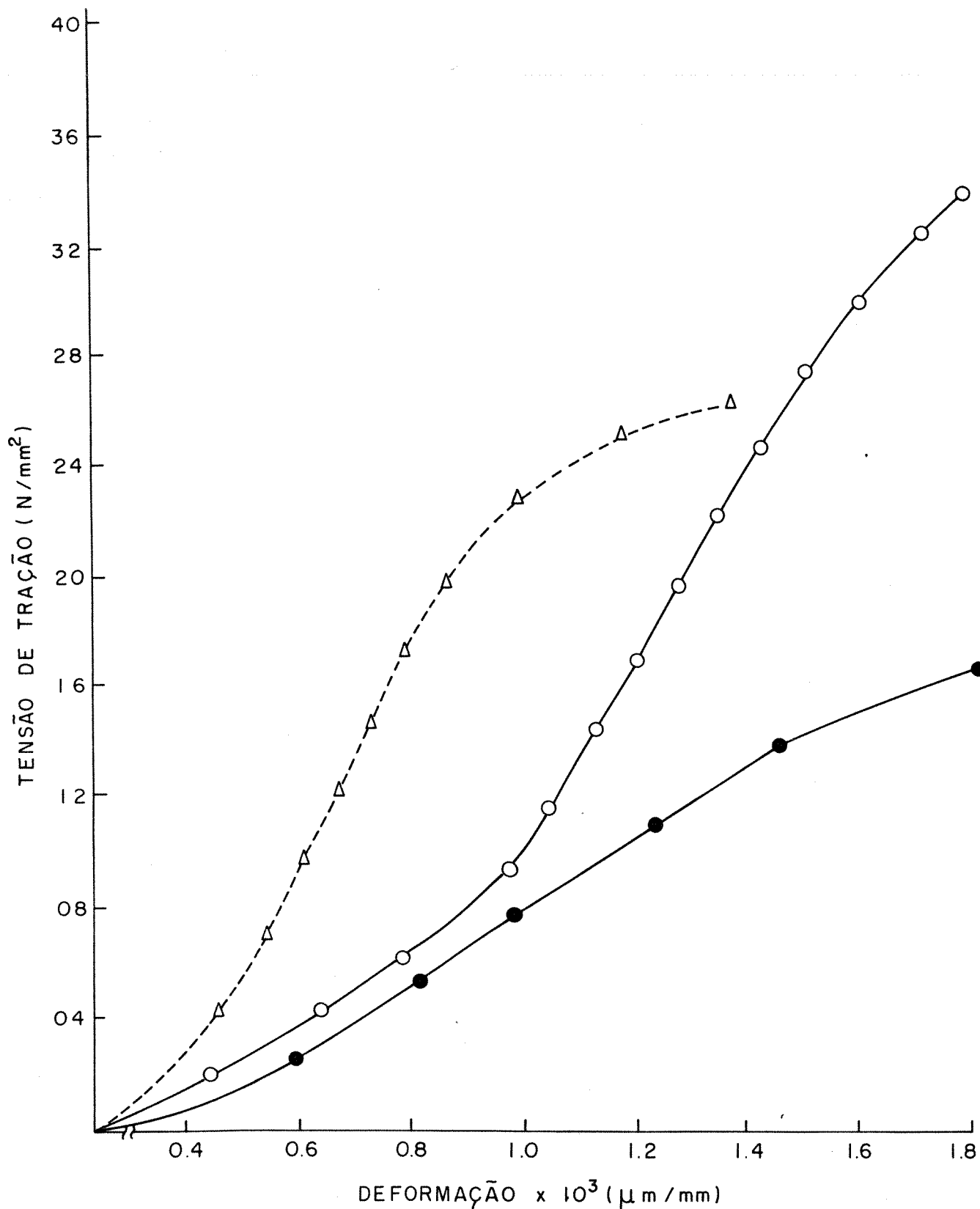


Figura 5 - Curvas tensão de tração-deformação de tendões de animais dos grupos experimentais **CONTROLE** (C14) (●—●), **EXERCÍCIO** (E5) (Δ---Δ) e **DENERVADO** (D8) (○—○). As curvas apresentam o aspecto sigmóide (não-linear) característico para tendões. Frente a um dado valor de tensão de tração observam-se diferentes valores de deformação para cada animal. Nota-se o último ponto de cada curva representando o valor de TENSÃO DE RUPTURA.

Tabela 1 - Valores de **TENSAO DE RUPTURA (N)** (valor médio e desvio padrão) correspondentes à propriedade mecânica de resistência à tração de tendões calcaneares de ratos dos grupos experimentais.

GRUPO	TENSAO DE RUPTURA (N)	
	\bar{X}	$\pm S$
CONTROLE	18,92	$\pm 3,26$
EXERCÍCIO	28,72	$\pm 1,86$
DENERVADO	34,36	$\pm 3,14$

Tabela 2 - Análise de variância dos valores de **TENSAO DE RUPTURA (N)** de tendões de animais dos grupos experimentais. São comparados os grupos EXERCÍCIO (E) e DENERVADO (D) com o grupo CONTROLE (C).

GRUPOS	F	G L E/D
C x E	204,145 **	1;58
C x D	348,221 **	1;58

** significativo ao nível de 1%

Tabela 3 - Valores de **TANGENTE DE ALFA** (valor médio e desvio padrão) correspondentes à propriedade mecânica de rigidez elástica de tendões calcaneares de ratos dos grupos experimentais.

GRUPO	TANGENTE DE ALFA	
	\bar{X}	$\pm S$
CONTROLE	2,294	$\pm 0,961$
EXERCÍCIO	3,740	$\pm 0,823$
DENERVADO	3,441	$\pm 0,458$

Tabela 4 - Análise de variância dos valores de **TANGENTE DE ALFA** dos tendões dos animais dos grupos experimentais. São comparados os grupos EXERCÍCIO (E) e DENERVADO (D) com o grupo CONTROLE.

GRUPOS	F	G L E/D
C x E	39,111 **	1;58
C x D	34,732 **	1;58

** significativo ao nível de 1%

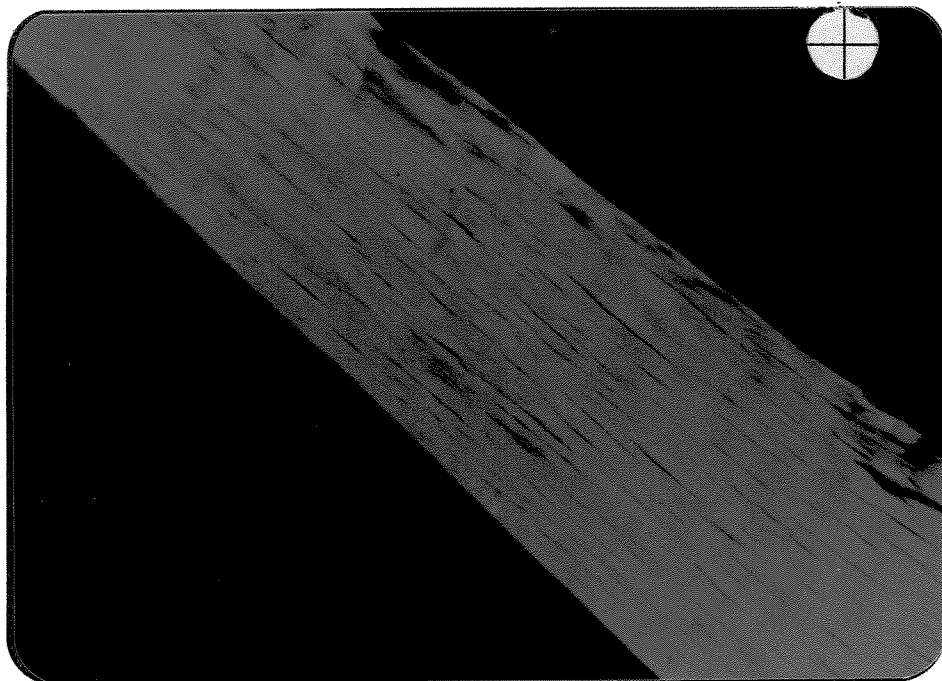


Figura 6 - Birrefringência dos feixes de colágeno presente em corte longitudinal de tendão calcâneo de animal do grupo CONTROLE. As barras cruzadas representam a posição relativa do analisador e polarizador no microscópio de polarização. Luz monocromática de $\lambda = 546 \text{ nm}$. Aumento : 115x.

TABELA 5 : Valores de retardos ópticos dos tendões dos grupos experimentais medidos em diferentes meios de embebição.

grupo	n	1,333	1,360	1,386	1,413	1,435	1,471	1,479
		ÁGUA	GOH20%	GOH40%	GOH60%	GOH80%	GOH100%	NUJOL
CONTROLE		50,42±3,63	36,49±1,86	27,88±1,28	19,54±1,15	11,71±0,95	7,15±0,95	31,70±3,01
		100,0%	73,5%	56,0%	39,2%	23,5%	14,3%	63,3%
EXERCÍCIO		57,97±3,36	46,15±2,75	32,57±2,55	24,80±1,68	15,08±1,11	7,56±0,89	37,50±3,85
		100,0%	79,6%	56,1%	42,7%	25,9%	13,0%	64,6%
DENERVADO		64,87±4,92	51,49±4,10	37,20±3,05	26,21±2,04	15,62±1,63	7,21±1,23	42,45±4,00
		100,0%	79,3%	57,4%	40,4%	24,0%	11,1%	65,5%

Obs. Os valores de retardo óptico são dados em nm e seguidos pelo valor do desvio padrão da média de 30 animais de cada grupo. O segundo valor de cada coluna representa a percentagem do retardo óptico em relação ao retardo óptico máximo observado em n= 1,333. A análise das variâncias identificou diferenças significativas ao nível de 1% ($p < 0.001$) para todos os valores de RO com exceção daqueles obtidos em n=1,471 tanto para o grupo EXERCÍCIO ($p > 0.05$) como para o grupo DENERVADO ($p > 0.1$). (GOH = glicerol)

Quando imersos em meio de embebição com $n=1,333$ (água) os feixes de colágeno apresentaram os valores mais elevados de birrefringência positiva. Este parâmetro é considerado a birrefringência textural do material e está relacionado com as diferenças entre o volume e o índice de refração dos feixes de colágeno e do meio de embebição que os envolve (VIDAL, 1984).

Corroborando os resultados de trabalhos anteriores de investigação da ordem macromolecular dos feixes de colágeno (MELLO et alii, 1975; PIMENTEL, 1981; VIDAL, 1980, 1985a), os menores valores de retardo óptico detectados nos tendões dos 3 grupos foram obtidos em meio de embebição com $n=1,471$ (glicerol) correspondendo à birrefringência positiva intrínseca própria do material e independente do meio de embebição.

O perfil das CBF observado para os diferentes grupos experimentais (Figura 7) também se mostrou semelhante àqueles obtidos em investigações acerca da ordem macromolecular e do estado de agregação de tendões quando submetidos aos processos de reparo e envelhecimento (MELLO et alii, 1975, 1979), ocorrendo a repetição dos pontos máximos ($n=1,333$), dos pontos mínimos ($n=1,471$) e a mesma proporcionalidade para os pontos de RO em meio hidrofóbico ($n=1,479$) em relação aos pontos máximo e mínimo.

A análise estatística dos valores de RO para cada meio de embebição revelou diferenças significativas para todos os casos dos grupos EXERCÍCIO ($p<0.001$) e DENERVADO ($p<0.001$) quando comparados aos mesmos parâmetros do grupo CONTROLE, com exceção dos valores obtidos em $n=1,471$ para os tendões dos grupos EXERCÍCIO ($p>0.05$) e DENERVADO ($p>0.1$) correspondentes à birrefringência intrínseca.

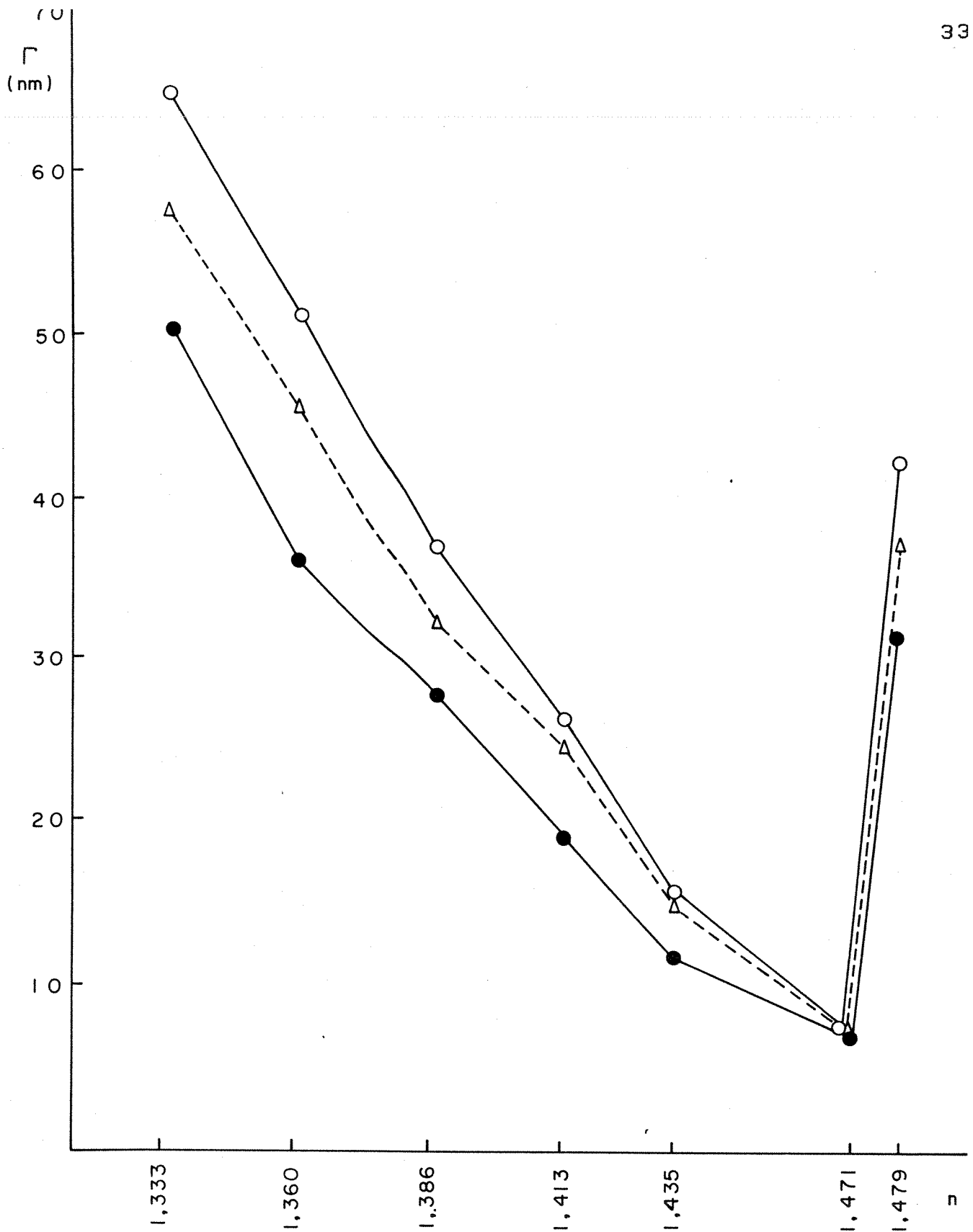


Figura 7 - Curvas de birrefringência de forma de tendões dos grupos **CONTROLE** (●—●), **EXERCÍCIO** (Δ-----Δ) e **DENERVADO** (○—○). Plotados na ordenada, os valores de retardo óptico (Γ) representam a média observada em 30 tendões em cada grupo. Na abscissa estão representados os valores do índice de refração (n) dos diferentes meios de embebição. Os valores médios e desvio padrão são encontrados na Tabela 5

A modificação do perfil das CBF traduz uma elevação acentuada dos valores de RO principalmente nos pontos extremos das curvas, caracterizando assim uma resposta biofísica dos feixes de colágeno aos processos de treinamento físico e denervação de um segmento do sistema locomotor (Figura 7). No entanto, deve ser ressaltado o fato de que pouca diferença é notada entre os pontos representantes da birrefringência intrínseca (n=1,471) quando da observação do perfil das CBF (Figura 7) e dos valores de RO (Tabela 5) dos grupos experimentais.

A Tabela 5 apresenta também o valor da percentagem de RO nos diversos meios de embebição em relação ao valor máximo que, neste caso, foi observado em água (n=1,333). Em todos os casos, com exceção do ponto correspondente à birrefringência intrínseca (n=1,471), nota-se uma queda menos acentuada dos valores de percentagem dos grupos EXERCÍCIO e DENERVADO em relação à queda de percentagem do grupo CONTROLE. Curiosamente, em relação ao valor de birrefringência intrínseca ocorre o processo inverso caracterizando uma participação percentual inferior deste parâmetro na birrefringência textural dos tendões dos grupos EXERCÍCIO e DENERVADO em relação ao grupo CONTROLE.

A observação dos perfis das curvas percentuais dos diferentes grupos (Figura 8) demonstra pouca variação entre os pontos em cada meio de embebição, se considerados em relação ao valor da birrefringência textural (n=1,333). Nota-se também a inversão do comportamento da queda percentual, quando considerados os pontos correspondentes à birrefringência intrínseca dos tendões (n=1,471).

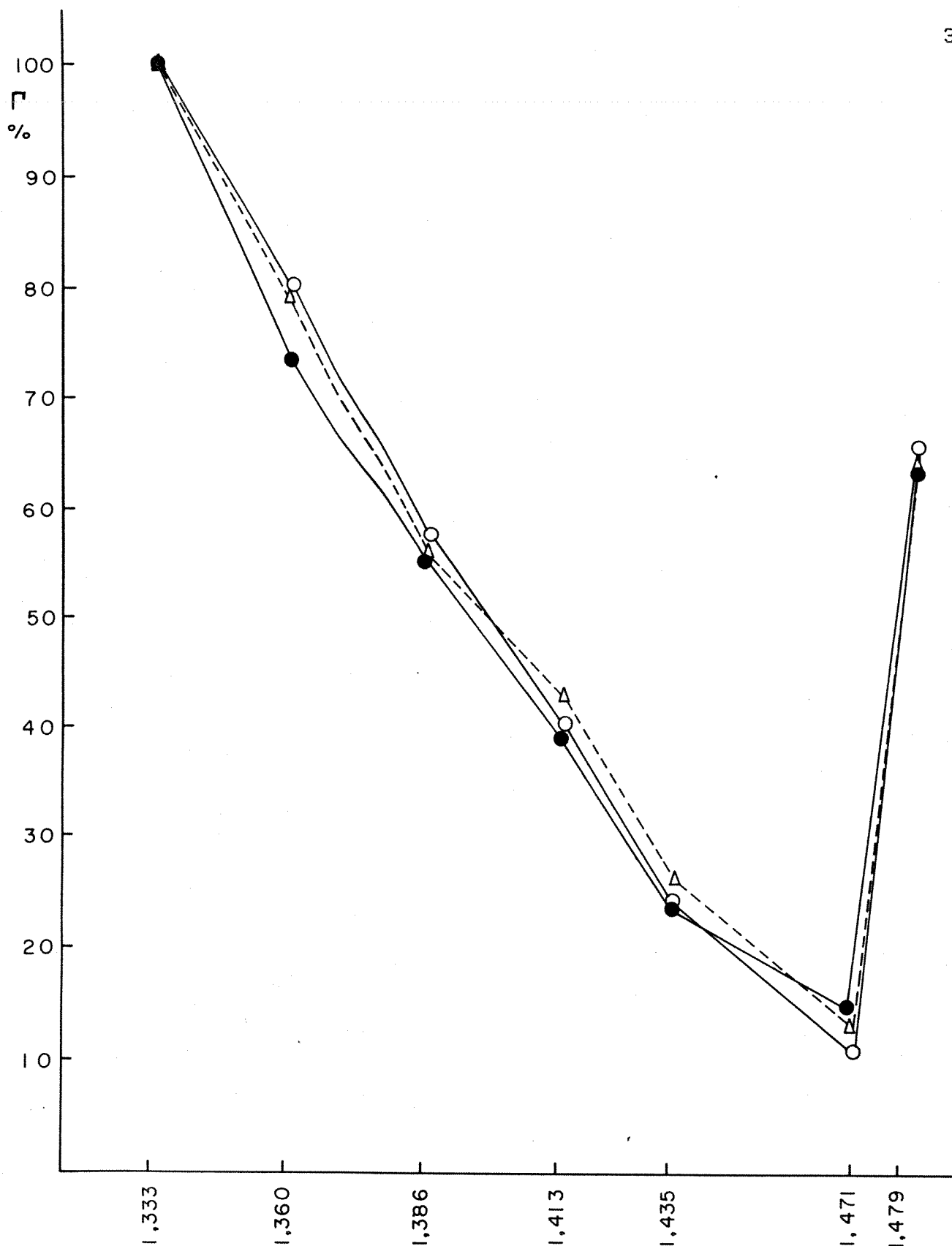


Figura 8 - Curva percentual dos valores de retardo óptico dos tendões dos diferentes grupos experimentais em relação aos valores obtidos em $n = 1,333$. Os valores percentuais são plotados na ordenada (%) e na abscissa os valores de índice de refração dos meios de embebição para os tendões dos grupos: **CONTROLE** (●—●), **EXERCÍCIO** (Δ---Δ) e **DENERVADO** (○—○). Os valores médios são encontrados na Tabela 5.

4. DISCUSSÃO:

4.1 - Considerações Gerais :

Este trabalho mostra que os feixes de colágeno sofrem modificações de suas propriedades biomecânicas e biofísicas em animais submetidos ao exercício físico e à denervação.

Considerando que os feixes de colágeno podem apresentar modificações estruturais influenciadas pela idade, sexo e tipo de alimentação, podemos afirmar que os resultados aqui apresentados refletem principalmente as alterações decorrentes do processo de adaptação, visto a padronização de nossas condições experimentais.

Vale destacar que as condições de treinamento foram suficientes para estimular um aumento do trofismo muscular, corroborando os resultados de WATT e colaboradores (1982) que além da hipertrofia, demonstram um aumento intracelular de proteínas e ácidos nucleicos em miofibrilas de animais treinados.

4.2 - Tensão de Ruptura Modificada pelo Exercício Físico :

Em nosso experimento, os tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO mostraram propriedades biomecânicas superiores no que se refere ao parâmetro de TENSÃO DE RUPTURA em relação a tendões de animais do grupo CONTROLE.

A elevação destes valores pode ser creditada a modificações de ordem ultraestrutural, bioquímica e da orientação macromolecular dos constituintes fibrilares e interfibrilares da matriz extracelular.

Tem-se postulado que as fibras de colágeno com diâmetros elevados estão mais adaptadas a resistir a esforços de tração, devido ao maior número de ligações cruzadas (PARRY et alii, 1978). No entanto, resultados conflitantes dão conta de modificações bioquímicas e morfológicas não condizentes com este conceito geral. Assim, as alterações posturais decorrentes do processo de imobilização podem influenciar o equilíbrio de forças sobre os ligamentos e tendões, aumentando o estímulo de tração sobre estas estruturas e resultando em fibras com uma elevada concentração de ligações cruzadas (AKESON et alii, 1973).

Da mesma forma, observa-se em tendões uma diminuição do diâmetro médio das fibras de colágeno após cinco semanas de treinamento físico (MICHNA, 1984). Tais alterações podem ser interpretadas como decorrentes de um rearranjo ultraestrutural dos feixes de colágeno durante o processo de adaptação, com a finalidade de resistir a esforços de tração ainda mais elevados.

Durante os processos de maturação e envelhecimento de feixes de colágeno "in vivo" e "in vitro" observa-se um aumento da concentração de ligações cruzadas e uma correspondente elevação dos valores de resistência à tração (BAILEY et alii, 1974; DANIELSEN, 1981).

Muito embora não seja feita menção sobre experimentos que demonstrem a elevação da concentração de ligações cruzadas em tendões de animais treinados podemos supor que modificações na quantidade e natureza destas ligações possam ocorrer em função de um aumento da demanda funcional.

Assim, a elevação do nível de TENSÃO DE RUPTURA suportada pelos tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO pode ter ocorrido em função da maior concentração de ligações cruzadas.

4.3 - Birrefringência de Forma Modificada pelo Exercício :

A elevação dos valores de RO observada entre os índices de refração 1,333 e 1,435, acentuando a inclinação da CBF, sugere a ocorrência de uma elevação do estado de agregação e também do grau de orientação das macromoléculas dos feixes de colágeno dos tendões do grupo EXERCÍCIO em relação aos tendões do grupo CONTROLE.

Esta análise das modificações biofísicas dos feixes de colágeno deve levar em conta que as CBF fornecem uma valiosa informação acerca dos valores relativos dos constituintes da matriz extracelular, da orientação macromolecular dos componentes fibrilares e do grau de empacotamento ou do estado de agregação que ocorre a nível molecular e fibrilar (VIDAL, 1977, 1980, 1986; VIDAL & CARVALHO, 1986).

Ao nível ultraestrutural, a elevação do estado de agregação pode equivaler a um aumento do diâmetro médio das fibrilas de colágeno e conseqüentemente a uma maior concentração de ligações cruzadas. A medida em que aumenta o diâmetro médio das fibrilas de colágeno eleva-se proporcionalmente o volume da substância micelar (fibrila) em relação ao volume da substância intermicelar (meio de embebição).

A suposição de que ocorreu uma modificação do volume dos feixes de colágeno em relação ao meio de embebição encontra embasamento experimental nos estudos dos fenômenos de envelhecimento e reparo de tendões (ENGEL & ZERLOTTI, 1967; MELLO et alii, 1975, 1979).

Os valores elevados de RO observados para os tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO sugerem um volume inferior da substância intermicelar (meio de embebição) determinando "in vivo" uma diminuição

da água tecidual uma vez que a matriz extracelular, além dos elementos fibrilares, é rica em água.

As modificações das CBF devem também ser analisadas em função da composição e das mútuas interações complexas entre os feixes de colágeno e os meios de embebição e não apenas como um fenômeno influenciado pela adsorção dos meios de embebição com diferentes índices de refração nos feixes de colágeno (VIDAL, 1980).

As moléculas de água desempenham um importante papel estrutural na estabilização da molécula de tropocolágeno, uma vez que participam na formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, apresentando assim uma distribuição ordenada (BERENDSEN & MICHELSEN, 1965; VIDAL, 1980). Portanto, em meios de embebição aquosos, diferenças de valores de RO em feixes de colágeno devem também ser analisados levando em conta a participação da ordem macromolecular determinada pelo arranjo das moléculas de água (água de cristalização) em função do estado de agregação dos feixes de colágeno (VIDAL, 1967, 1980).

4.4 - Relação com os Fenômenos de Reparo e Envelhecimento :

Uma elevação do estado de agregação dos feixes de colágeno é também observada em tendões de ratos velhos em relação a animais adultos (MELLO et alii, 1979) e em tendões calcaneares de ratos jovens ao longo do processo de reparo (MELLO et alii, 1975).

Considerando que a nível experimental é notada a elevação dos níveis de concentração de ligações cruzadas, do diâmetro das fibrilas e do estado de agregação dos feixes de colágeno durante os processos de reparo, maturação e envelhecimento, podemos supor que em

animais treinados as modificações estruturais e bioquímicas induzidas pelo exercício levam também a um novo arranjo ultraestrutural, que é capaz de alterar as propriedades biomecânicas e biofísicas dos feixes de colágeno, como foram aqui detectadas.

4.5 - Comportamento Biomecânico Influenciado por GAGA :

Devemos considerar também as modificações do comportamento biomecânico dos tendões influenciadas pela interação das fibras de colágeno com as GAGA e as GPE presentes na matriz extracelular.

Não há evidências concretas de que as GAGA e as GPE desempenhem um papel de importância na propriedade biomecânica de resistência à tração, quando avaliado o parâmetro de TENSÃO DE RUPTURA em tendões normais. Existe um consenso geral de que o colágeno seja o principal componente da matriz extracelular responsável pela capacidade de resistir a esforços de tração em vários tipos de estruturas como a pele, vasos, ligamentos e tendões (ELLIOTT, 1965a; CHVAPIL, 1967; VIIDIK, 1973). No entanto, parece haver indícios de que a presença de componentes não colagênicos associados às fibras de colágeno possa influenciar o comportamento biomecânico destas estruturas, principalmente nos estágios iniciais da aplicação de tensão de tração até atingir níveis de deformação em torno de 4% (porção inicial da curva de tensão de tração-deformação) (MINNS et alii, 1973; OXLUND & ANDREASSEN, 1980).

Na ausência de tensão de tração sobre tendões esqueléticos, os feixes de colágeno apresentam um arranjo ondulado característico, o que é justificado pela própria configuração estrutural de entrelaçamento das fibrilas em associação aos demais componentes da matriz ex-

tracelular (RIGBY et alii, 1959; ELLIOTT, 1965a; DIAMANT et alii, 1972; VIIDIK, 1973).

RIGBY et alii (1959), em um estudo das alterações morfológicas dos feixes de colágeno durante a aplicação de tensão em tendões da cauda de ratos, notaram que níveis de deformação de até 4% levam à eliminação do padrão de feixes ondulados, que é normalmente observado em tendão não tensionado. Os autores também observaram que o comportamento biomecânico do tendão é reversível, neste intervalo de deformação, quando a tensão é retirada. Ultrapassado este limite, o padrão de feixes ondulados deixa de existir.

Assim, as modificações biomecânicas induzidas por alterações da concentração de GAGA e de GPE decorrentes do exercício parecem estar restritas à fase inicial do processo de aplicação da tensão de tração sobre o tendão, onde o limite de deformação de 4% está situado. "In vivo" estas alterações podem modificar o padrão de resposta do tecido ao sofrer os impactos de carga durante a contração muscular o que, na ausência das ondulações dos feixes, poderia causar danos à estrutura do tendão.

No entanto, as alterações da concentração de GAGA observadas em tendões de animais treinados, apesar de não significativas, mostram uma tendência de diminuição destes valores na matriz extracelular (SUOMINEN et alii, 1980).

4.6 - Comportamento Biofísico Influenciado por GAGA :

A participação das GAGA e das GPE na orientação macromolecular dos feixes de colágeno tem sido detectada através dos estudos das

propriedades anisotrópicas de tendões submetidos a digestões enzimáticas pela hialuronidase testicular e alfa amilase (VIDAL, 1964, 1977, 1980). Destes estudos depreende-se que o eixo das cadeias protéicas, onde estão ancoradas as GAGA, encontra-se inclinado em relação ao eixo longitudinal das fibras de colágeno, com as cadeias de GAGA dispostas em paralelo em relação a estas fibras. Da mesma forma, as GPE e as moléculas de ácido hialurônico exibiriam um arranjo paralelo às GAGA acompanhando as fibras de colágeno (VIDAL, 1980).

A medida em que se observa uma diminuição nas concentrações de condroitino sulfato e ácido hialurônico em função do processo de envelhecimento e maturação dos tecidos (CLAUSEN, 1962; SINEX, 1968; MITCHELL & RIGBY, 1975; SCOTT et alii, 1981), nota-se que os tendões de ratos envelhecidos demonstram alterações na capacidade de ligação das GAGA a corantes básicos e nos padrões de orientação macromolecular destas substâncias polissacarídicas determinando, inclusive, a inversão dos sinais de dicroísmo e mudanças nos perfís de absorção espectral em cortes corados com o azul de toluidina a pH 4 e 5 (MELLO et alii, 1979).

Neste ponto, cabe colocar uma questão : O aumento dos valores de RD observado para os tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO teria sido o resultado de uma elevação do estado de agregação dos feixes de colágeno ou apenas seria devido a uma maior participação da ordem molecular dos demais elementos da matriz extracelular (GAGA e GPE)?

Apesar de ser constatada uma queda não significativa da concentração de GAGA na matriz extracelular de tendões de animais treinados (SUOMINEN et alii, 1980), e considerando-se que possa ter ocorrido o mesmo nos tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO, ainda assim seria

possível detectar uma elevação das propriedades anisotrópicas nestes tendões, considerando-se apenas uma elevação da ordem molecular das GAGA. É fato que estes polissacarídeos detêm uma contribuição em torno de 13% em relação ao valor total da birrefringência de forma da matriz extracelular de tendões calcaneares (VIDAL, 1964).

Se compararmos os valores médios de RO obtidos para os tendões de animais dos grupos CONTROLE e EXERCÍCIO podemos notar uma elevação média superior a 14% do valor da birrefringência de forma do grupo EXERCÍCIO considerado em meio de embebição com $n=1,333$ (água).

O experimento biomecânico evidencia que os tendões do grupo EXERCÍCIO tiveram elevadas suas propriedades de resistência à tração, fato que descarta a hipótese de que a elevação dos valores de RO teria sido o resultado da maior participação na ordem molecular das GAGA, uma vez que as fibrilas de colágeno são consideradas as estruturas responsáveis pelo comportamento biomecânico dos tendões, no que se refere à característica de TENSÃO DE RUPTURA (VIIDIK, 1973).

4.7 - Rigidez Elástica Modificada pelo Exercício Físico :

A análise das modificações do parâmetro biomecânico de rigidez elástica, induzidas pelo exercício nos tendões calcaneares, pode também ser correlacionada com as alterações das propriedades biofísicas observadas em nosso experimento.

Sendo o conceito de "módulo de elasticidade" baseado em uma relação linear entre a tensão e a deformação, não é apropriado o seu uso para caracterizar uma propriedade biomecânica semelhante ao que se conhece como "elasticidade" de um material biológico como o tendão.

Neste caso, devemos nos referir à propriedade de rigidez elástica, uma vez que, o comportamento biomecânico do tendão demonstra, além de um componente elástico, elementos de viscosidade e plasticidade, como é verificado em experimentos reológicos e biomecânicos (VIIDIK, 1967, 1968, 1969, 1972, 1973).

Em nosso experimento podemos considerar que a avaliação do parâmetro de rigidez elástica, que corresponde ao valor da TANGENTE DE ALFA, traduz o comportamento biomecânico dos tendões que se deformam proporcionalmente frente a valores crescentes de tensão de tração, o que é verificado apenas em um determinado intervalo da curva de tensão de tração-deformação (porção linear).

Valores superiores de rigidez elástica foram notados para os tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO em relação ao mesmo parâmetro para tendões do grupo CONTROLE. Esta diferença poderia estar relacionada com alterações quantitativas dos elementos da matriz extracelular responsáveis pela elasticidade, viscosidade e plasticidade dos tendões (VIIDIK, 1973).

O componente fibrilar da matriz extracelular responsável pelo comportamento biomecânico do tendão na porção linear da curva de tensão de tração-deformação parece ser a fibrila de colágeno, uma vez que, as GAGAs teriam influência apenas no início do processo de deformação (VIIDIK, 1973; OXLUND & ANDREASSEN, 1980).

De fato, as modificações estruturais induzidas pelo aumento da tensão em fibrilas de colágeno podem ocorrer a nível molecular e fibrilar, uma vez que, baseando-se em estudos de difração de raios X têm sido demonstradas alterações da periodicidade axial e também do período D (67 nm) da fibrila. No primeiro caso, nota-se que a periodi-

cidade axial em fibras normais passa de 2,86 Å para 3,1 Å em fibrilas de colágeno submetidas à tensão de tração, evidenciando um arranjo dos resíduos de aminoácidos das cadeias da molécula de tropocolágeno (VIIDIK, 1973). Em relação ao segundo caso, demonstra-se que o período D (67 nm) é aumentado em feixes de fibras submetidos à tensão de tração o que se justifica pelo alongamento da molécula de tropocolágeno e pelo deslizamento das triplas hélices uma em relação às outras, como previsto e proposto por VIDAL (1967, 1969), levando inclusive a alterações no comprimento de suas porções telopeptídicas que tomam parte no estabelecimento de ligações cruzadas intrafibrilares (MOSLER et alii, 1985).

Durante o processo de envelhecimento dos feixes de colágeno "in vivo" e "in vitro" observa-se um aumento dos valores de rigidez elástica sendo que à medida que o processo avança, a porção inicial tende a diminuir e a porção linear tende a ficar mais inclinada, correspondendo a valores de TANGENTE DE ALFA mais elevados (DIAMANT et alii, 1972; DANIELSEN, 1981). Este enrijecimento dos tendões têm sido creditado ao estabelecimento de ligações cruzadas, o que também levaria a um aumento dos valores de TENSÃO DE RUPTURA (RIGBY, 1964; BAILEY et alii, 1974; MITCHELL & RIGBY, 1975; DANIELSEN, 1981).

Após o período experimental, nós pudemos detectar um aumento dos valores de RO em tendões de animais treinados e a elevação desta propriedade biofísica é condizente com os resultados biomecânicos de um aumento da TENSÃO DE RUPTURA e da TANGENTE DE ALFA, podendo ser correlacionada com os achados ultraestruturais e bioquímicos que revelam uma elevação do diâmetro médio das fibrilas e um aumento da concentração de ligações cruzadas em feixes de colágeno de tendões de

animais em processos de treinamento e envelhecimento (PARRY et alii, 1978; MICHNA, 1984).

Da mesma forma, uma elevada concentração de ligações cruzadas em uma mesma fibrila diminuiria a intensidade de deslizamentos entre as cadeias de tropocolágeno, tornando estas fibrilas mais rígidas e portanto mais resistentes à deformação (MOSLER et alii, 1985).

Após o período experimental, notamos uma tendência à elevação da rigidez elástica do tendão, apresentando feixes de colágeno com elevado estado de agregação e ordem molecular.

O provável efeito útil que estas modificações provocam em tendões de animais treinados é o de aumentar a estabilidade das articulações envolvidas e movimentadas por estes tendões e provavelmente modificar a capacidade de armazenagem de energia durante a marcha, o que é verificado em tendões e proteínas musculares de insetos e mamíferos (ALEXANDER & BENNET-CLARK, 1977; KER, 1981).

4.8 - Níveis de Cristalinidade dos Tendões :

4.8.1 - Birrefringência Intrínseca :

As análises das modificações biofísicas dos feixes de colágeno, através do estudo das CBF, além de informar o estado de agregação e orientação macromolecular dos componentes da matriz extracelular, relacionando os volumes parciais dos elementos fibrilares e do meio de embebição (birrefringência textural), também permitem detectar diferentes níveis de orientação molecular em consequência da polarizabilidade dos grupos de elétrons das cadeias polipeptídicas in-

dependente do meio de embebição, esclarecendo, portanto, o nível de cristalinidade do arranjo molecular das cadeias protéicas (birrefringência intrínseca) (CASSIM et alii, 1968).

Os feixes de colágeno, em função do arranjo ordenado dos complexos moleculares e do estado de agregação e orientação macromolecular de seus componentes, apresentam uma birrefringência intrínseca com valores correspondentes ao RO obtido em $n=1,471$ (glicérol), representando o nível de organização cristalina do feixe, o que independe do meio de embebição em que se encontra.

A medida que se altera o meio de embebição com a adição de água pode-se avaliar, em acréscimo à birrefringência intrínseca, a participação da birrefringência textural.

A manutenção dos níveis de cristalinidade dos tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO sugere que as ligações intramoleculares das cadeias de tropocolágeno não sofreram modificações significativas durante o período de treinamento físico.

4.8.2 - Birrefringência Intrínseca Relativa

A participação relativa da birrefringência intrínseca na birrefringência total dos feixes de colágeno pode ser maior ou menor, dependendo de variáveis como o grau de complexação das fibrilas de colágeno com os demais elementos da matriz extracelular, a fase dos processos de maturação, envelhecimento ou reparo em que se encontram os feixes e também a intensidade do padrão de ondulação (crimped structure) das fibras presente em tendões intactos e em fibras de colágeno do tipo I (ENGEL & ZERLOTTI, 1967; MELLO et alii, 1975, 1979; PIMENTEL, 1981; VIDAL, 1986).

VIDAL (1986), ao avaliar este parâmetro em mamíferos, demonstra que em tendões de rato ocorre um padrão com poucas ondulações em relação àquele notado para bovino. Já a participação relativa da birrefringência intrínseca em tendão de rato é maior que aquela observada para tendão bovino. Quanto a fibras de colágeno puro do tipo I estendido sobre lâminas, nota-se a ausência de um padrão ondulado, sendo que, a participação relativa da birrefringência intrínseca, neste caso, eleva-se a valores superiores (27,5%) em relação aos tendões de rato (16,3%) e bovino (9,9%) sendo considerado pelo autor "a consequence of a better alignment of the fiber, with no variation in its direction (e.g. crimping) and consequently less internal compensation of optical retardations".

Os nossos resultados do experimento biofísico demonstram que em feixes de colágeno de animais treinados não ocorre diferença significativa do valor da birrefringência intrínseca em relação aos feixes de colágeno de animais do grupo CONTROLE. Por outro lado, se considerarmos a participação percentual da birrefringência intrínseca na birrefringência textural notamos uma queda deste valor, caracterizando assim, feixes de colágeno com uma rede cristalina com níveis superiores de compensação dos RO.

Semelhante ao observado para tendões e fibras de colágeno do tipo I (VIDAL, 1986), a queda percentual da birrefringência intrínseca pode caracterizar, a nível estrutural, feixes de colágeno com um padrão elevado de ondulação.

Assim, podemos considerar que o treinamento nestes animais, além de modificar o estado de agregação e orientação macromolecular dos feixes, também alterou o nível relativo de cristalinidade das mo-

lécúlas de colágeno, fato que pode estar relacionado a modificações nos padrões de ondulação dos feixes.

Estas modificações podem alterar as propriedades mecânicas dos tendões, principalmente se considerarmos que este padrão de ondulação (crimped structure) desaparece nos estágios iniciais do processo de deformação frente à tensão de tração.

4.9 - Modificações das Características Hidrofóbicas dos Feixes :

Outro aspecto das CBF que deve ser analisado refere-se ao ponto que situa os valores de RO obtidos quando o meio de embebição é o nujol (n=1,479). Este óleo mineral, apesar de possuir um índice de refração próximo ao glicerol (n=1,471), determina alterações no estado de agregação dos feixes de colágeno, o que leva a um aumento dos valores de RO, quando analisadas suas propriedades biofísicas (VIDAL, 1980; PIMENTEL, 1981).

Comparando-se o valor médio de RO em nujol dos tendões de animais treinados, nota-se uma elevação deste valor em relação àquele detectado para tendões de animais do grupo CONTROLE, o mesmo sendo observado para os meios de embebição aquosos que respondem pelos demais índices de refração das CBF (soluções de água e glicerol).

Foi aqui levantada a hipótese da possível participação das moléculas de água no arranjo macromolecular dos feixes de colágeno modificando, em parte, as propriedades anisotrópicas dos tendões de animais treinados. No caso do meio de embebição ser o nujol, esta possível participação da "água de cristalização" deixa de ter valor, uma vez que, para que ocorra a embebição com óleo mineral a técnica requer

que os feixes de colágeno estejam desidratados visto ser o nujol uma molécula hidrofóbica.

Assim, verificada uma elevação dos valores de RO em tendões de animais treinados, supõe-se que tenha ocorrido uma elevação do volume dos feixes de colágeno em relação ao volume do meio de embebição nujol.

A aplicação do uso do nujol como meio de embebição além de informar o estado de agregação dos feixes de colágeno independente da participação de outros elementos (água e glicerol) na ordem molecular também caracteriza o nível de hidrofobicidade destes feixes que pode ser modificada por condições experimentais. Uma alteração bioquímica de importância decorrente do treinamento revela um aumento da síntese de colágeno e uma diminuição da síntese de GAGA em tendões de animais treinados (TIPTON et alii, 1970; HEIKKINEN & VUORI, 1972; SUOMINEN et alii, 1980). O fato de ocorrer um maior empacotamento dos feixes de colágeno em um meio de embebição, como o nujol, pode estar relacionado com esta diminuição da síntese de GAGA, visto serem macromoléculas com um caráter polianiónico o que lhes confere uma elevada capacidade de reter água no feixe.

4.10 - Mecanismos de Controle do Processo de Adaptação :

Em face do que foi comentado, torna-se evidente o desenvolvimento de um fenômeno adaptativo frente a um aumento da demanda funcional, provável resultado de modificações quantitativas e qualitativas dos elementos da matriz extracelular.

Neste caso, o fenômeno da adaptação requer, em primeiro lugar, que o sistema constituído pelos fibroblastos e a matriz extracelular seja capaz de detectar as alterações nos níveis de demanda funcional e, posteriormente, elaborar uma resposta à altura da solicitação mecânica, promovendo em seguida, a manutenção de um novo arranjo estrutural e bioquímico.

Visto que os feixes de colágeno estão amplamente distribuídos pela matriz extracelular e resistem aos esforços de tração em tecidos como o tendão, podem ser considerados estruturas capazes de detectar variações nos níveis de demanda funcional e interagir com os fibroblastos e os demais elementos da matriz extracelular, sendo esta uma atividade fundamental para os mecanismos de controle e regulação da atividade celular.

Nossas observações indicam a manifestação de um provável mecanismo de controle seja a nível celular, durante o processo de síntese e secreção, seja a nível extracelular, em função de um arranjo supraorganizado capaz de detectar e modificar o estado de agregação dos elementos da matriz extracelular.

4.10.1 - Mecanismos que Envolvem uma Participação Preferencialmente Celular:

As evidências que levam a pensar em mecanismos de regulação dos padrões extracelulares influenciados por uma ação preferencialmente celular referem-se à propriedade que possuem alguns tipos celulares de exercerem forças de tração e compressão quando cultivados sobre substratos flexíveis (placas de colágeno ou de silicone) (HARRIS et

alii, 1981). Estas células, principalmente os fibroblastos, são capazes de distorcer intensamente as finas placas do substrato criando na periferia celular padrões de distribuição de forças semelhantes àquelas observados para a disposição bidimensional dos feixes de colágeno em tensões normais.

Durante o desenvolvimento embrionário, o alinhamento celular é comumente observado, sendo notada uma deposição de fibras com orientação paralela ao alinhamento dos fibroblastos (SHAH et alii, 1982).

A força de tração exercida por células alinhadas pode ser vista como uma característica de elevado significado morfogênético e a interpretação deste fenômeno tem levado à proposição de que os fibroblastos exerceriam sobre a matriz extracelular forças de tração suficientes para alinhar as moléculas de colágeno em um arranjo paralelo às direções destas forças, servindo inclusive, para direcionar a posterior deposição de novas moléculas, resultando em um aumento em diâmetro da fibrila (STOPAK & HARRIS, 1982).

Por outro lado, a incorporação de colágeno exógeno injetado em tecido embrionário parece ser determinada não só pelas tensões e deformações mecânicas geradas pelo deslocamento celular mas também por mecanismos relacionados com as tensões e deformações causadas pelo ambiente físico (STOPAK et alii, 1985).

Outro modelo que relaciona os movimentos celulares como sendo um importante evento no processo da fibrillogênese dos feixes de colágeno sugere que a associação de fibrilas "in vivo" tem início com a formação intracelular de sub-unidades, as quais seriam adicionadas por exocitose na porção terminal da fibrila que permanece em contato permanente com a superfície celular, regulando assim o arranjo morfológi-

co do feixe. Neste caso, o trajeto percorrido pelas células, durante o desenvolvimento embrionário, daria origem aos padrões de arranjo e orientação das fibrilas de colágeno (TRELSTAD & HAYASHI, 1979).

Em paralelo, tem sido demonstrada uma alta afinidade de ligação entre colágeno solubilizado do tipo I com a superfície celular de fibroblastos e com fibronectinas, sugerindo que estas interações possam desempenhar um papel importante durante a fibrilogênese e a regulação dos mecanismos de síntese de colágeno (GOLDBERG, 1979; KLEINMAN et alii, 1981).

Desde que tão intensa interação entre feixes e fibroblastos pode ser detectada, a suposição de que os mecanismos que regulam a síntese e a agregação dos elementos da matriz extracelular estariam relacionados com a deformação mecânica do ambiente celular, não pode ser descartada.

LEUNG et alii (1977) consideram que a deformação induzida por estiramentos cíclicos de células "in vitro" pode envolver alterações na estrutura da membrana plasmática e na citoarquitetura capazes de influenciar o arranjo das organelas celulares regulando, inclusive, a síntese de macromoléculas da matriz extracelular.

4.10.2 - Mecanismos que Envolvem uma Ação Preferencialmente Extracelular :

Estas hipóteses que sugerem mecanismos de regulação dos padrões de síntese e arranjo dos feixes de colágeno devido a uma ação preferencialmente celular, devem ser confrontadas com as evidências que indicam terem estes mecanismos origem a nível extracelular, sendo

os feixes de colágeno e as GAGA os transdutores das informações ou sinais que induziriam modificações no metabolismo celular, visando o processo de adaptação funcional (VIDAL, 1966, 1967; GILLARD et alii, 1979b).

VIDAL (1966, 1967), baseado em seus próprios estudos dos fenômenos de reparo e inflamação, propõe que as variações de natureza biomecânica detectadas pelos feixes de colágeno possam dar origem a uma mensagem bioquímica aos elementos modeladores do tecido conjuntivo. Segundo o autor, o código desta mensagem nasce no próprio feixe à custa de deslocamentos intra e intermoleculares, induzindo uma reação celular em favor da homeostase através de um mecanismo de retroação positiva.

A possibilidade de que alterações eletroquímicas das moléculas de colágeno possam exercer influência e transmitir informações para os fibroblastos tem encontrado embasamento teórico, visto ter conexão com os estudos dos efeitos piezoelétricos originados em feixes de colágeno, quando submetidos à tensões de compressão (BASSET & BECKER, 1962; BASSET & PAWLUK, 1972; FUKADA, 1974).

Em nossas condições experimentais, o estímulo mecânico originado nos feixes de colágeno em tendões de animais treinados pode ter ocorrido, visto que os níveis de tensão de tração verificados durante este tipo de solicitação funcional são suficientes para promover deslocamentos intermoleculares entre as cadeias de tropocolágeno das fibrilas (MOSLER et alii, 1985).

As características de retenção diferenciada dos corantes usados na técnica do tricrômio de MASSON, em feixes de colágeno em diferentes estados de tensão, e os achados ultraestruturais que indicam

a presença de fibrilas de menor diâmetro e com periodicidade axial modificada ao longo do treinamento físico são dados que favorecem a argumentação de que alterações na quantidade e acessibilidade de grupos polares carregados positivamente em feixes de colágeno possam contribuir para o controle do metabolismo celular, frente às alterações da solicitação funcional em tecidos como os tendões (FLINT & MERRILEES, 1977; MERRILEES & FLINT, 1980; OAKES et alii, 1982; MICHNA, 1984).

Ao considerar os elementos da matriz extracelular como efetores da transdução da informação de eventos mecânicos em atividade de síntese, também as GAGA parecem desempenhar um papel vital para a efetivação destes mecanismos de controle (VIDAL, 1966).

As diferenças no tipo e proporção das GAGA em áreas de tendões sujeitos à forças de tração e compressão evidenciam uma relação direta entre a presença de fibras de colágeno mais espessas associadas com uma pequena quantidade de GAGA em áreas sujeitas a esforços de tração, sendo que em segmentos resistentes à compressão, uma elevada proporção de GAGA está presente na matriz, onde se observam fibras de colágeno menos espessas (GILLARD et alii, 1977).

Tem sido também sugerido que o crescimento lateral das fibrilas de colágeno até diâmetros próximos de 60 nm seria inibido pela presença excessiva de ácido hialurônico, sendo este efeito anulado com o aumento da concentração de condroitino e dermatosulfato (PARRY et alii, 1982).

Estas evidências, aliadas aos achados biofísicos que demonstram variações nos níveis de participação das GAGA nos processos de fibrillogênese, reparo, calcificação e envelhecimento de tendões, permitem que seja sugerido um papel fundamental das GAGA nos mecanismos

de controle da síntese e do arranjo macromolecular dos elementos da matriz extracelular do tecido conjuntivo.

Nossos dados podem também contribuir para a elucidação destes mecanismos, visto ter sido detectada uma modificação dos padrões do estado de agregação, orientação e cristalinidade relativa dos feixes de colágeno, que podem estar associadas a perdas relativas de água tecidual em função da queda dos níveis de concentração de GAGA em tendões de animais treinados (SUOMINEN et alii, 1980) o que poderia favorecer, inclusive, a manutenção da estabilidade estrutural e bioquímica dos feixes de colágeno, resultando em tendões mais rígidos e menos susceptíveis à ruptura.

4.11 - Adaptação dos Tendões à Denervação :

O fenômeno da adaptação estrutural dos feixes de colágeno em tendões de ratos do grupo DENERVADO parece ter ocorrido de forma ainda mais incisiva do que para os tendões de animais do grupo EXERCÍCIO, fato nitidamente representado pelas modificações das propriedades biomecânicas e biofísicas que refletem uma elevação dos parâmetros de resistência à tração, rigidez elástica e uma acentuação do perfil das CBF.

Variadas respostas do tecido conjuntivo têm sido descritas para diferentes espécies de animais submetidos à denervação e à imobilização o que não permite, no entanto, que sejam traçadas comparações dos resultados biomecânicos visto a não homogeneidade das condições experimentais aplicadas (ROLLHÄUSER, 1954b; TIPTON et alii, 1970; NOYES et alii, 1974; AMIEL et alii, 1982).

vada, tendo ocorrido, em ambos os casos, uma elevação deste parâmetro.

A análise dos valores médios também evidencia que o grupo DENERVADO tem valores de **TANGENTE DE ALFA** inferiores aos do grupo EXERCÍCIO, caracterizando assim curvas de tensão de tração-deformação com inclinação da porção linear situada entre as mesmas curvas dos grupos CONTROLE e EXERCÍCIO e denotando uma rigidez elástica de valor intermediário.

Considerando a distribuição da frequência dos valores de **TANGENTE DE ALFA** dos grupos EXERCÍCIO e DENERVADO (dados não apresentados), a análise demonstra uma tendência à elevação da rigidez elástica dos tendões quando submetidos a estas condições experimentais.

3.3 - Modificações das Propriedades Biofísicas:

O aspecto dos feixes de colágeno em corte de tendão calcanear imerso em água ($n=1,333$) é mostrado na Figura 6, que exhibe o brilho característico de uma estrutura birrefringente quando observada em microscópio de polarização com luz monocromática ($\lambda=546\text{nm}$) estando polarizador e analisador cruzados.

As curvas de birrefringência de forma (CBF) foram construídas a partir dos valores médios de retardo óptico (RO) (Γ) medidos em cortes de tendões de 30 animais de cada grupo plotados contra os índices de refração (n) dos meios de embebição (Tabela 5).

Já as informações das características morfológicas e bioquímicas de tendões de animais denervados podem contribuir para elucidar os prováveis mecanismos biomecânicos que induziram as modificações por nós observadas. ELLIOTT (1965b) pôde demonstrar que o ventre muscular denervado tem o seu conteúdo total de colágeno aumentado em até 300% em relação aos músculos de animais controle.

O mesmo autor (1965a) relata uma correlação positiva entre tendões com elevadas áreas de secção transversal em músculos que possuem uma reconhecida participação na atividade postural prolongada em contra partida a músculos que atuam preferencialmente em movimentos rápidos e que participam de atividades leves, levando-o a sugerir que estas características bioquímicas e morfológicas são um reflexo da intensidade, frequência e duração das tensões exercidas sobre os tendões.

A intensa atrofia observada no ventre muscular denervado reflete apenas a queda do volume das miofibrilas não evidenciando, no entanto, as alterações que ocorrem ao nível do tecido conjuntivo que envolve e agrega as células musculares (endomísio, perimísio e epimísio).

Como sugerido por ELLIOTT (1965b), o aumento do tecido conjuntivo no ventre muscular denervado pode conduzir a uma elevação do nível da tensão de tração passiva transmitida ao tendão durante o movimento ou mesmo quando o animal permanece parado estando a articulação tibio-társica em dorsiflexão, promovendo assim uma tensão de tração sobre o tendão calcanear.

4.12 - Considerações Finais :

Considerando que este comportamento postural possa ter prevalecido nos animais do grupo DENERVADO, e estabelecendo uma comparação com o tipo de estímulo aplicado nos tendões dos animais do grupo EXERCÍCIO, torna-se viável a hipótese de que os mecanismos que regulam o estado de agregação, orientação e cristalinidade relativa das macromoléculas da matriz extracelular sejam influenciados não apenas pela intensidade de tensão de tração do estímulo funcional, mas também por outras variáveis, como a duração e a frequência da exigência mecânica a que estão sujeitos os tendões.

5. CONCLUSÕES:

1. O aumento dos níveis de solicitação funcional sobre os tendões calcaneares de ratos é capaz de promover um aumento do estado de agregação e orientação das moléculas dos feixes de colágeno.

2. A observação de um aumento do estado de agregação e orientação macromolecular dos feixes de colágeno aliada à constatação de um acréscimo da resistência à tração destes feixes sugere que as modificações bioquímicas induzidas pelo treinamento conduziram à ocorrência de fibras de colágeno com uma elevada quantidade de ligações cruzadas interfibrilares.

3. A acentuação do perfil das CBF de tendões de animais treinados sugere que as modificações decorrentes do processo de adaptação levaram a uma diminuição dos níveis de hidratação da matriz extracelular no tecido vivo.

4. A queda percentual da birrefringência intrínseca observada para os feixes de colágeno de animais treinados ocorre em função da maior compensação interna molecular como resultado de um alinhamento entrecruzado da rede cristalina. Ao nível estrutural esta característica resulta em feixes de colágeno mais ondulados, o que pode influenciar o comportamento biomecânico dos tendões no início do processo de deformação frente à tensão de tração.

5. O aumento do RO em meio de embebição nujol detectado nos feixes de colágeno de tendões de animais treinados pode refletir um aumento dos níveis do estado de agregação dos feixes sem a participação das moléculas de água e glicerol no processo anisotrópico, eviden-

ciando assim, um aumento de hidrofobicidade dos feixes de colágeno promovido pelo treinamento físico.

6. Nos tendões de animais denervados o estado de agregação e orientação dos feixes de colágeno apresentou-se ainda mais elevado, provavelmente em função da tensão de tração passiva transmitida ao tendão pelo ventre muscular atrofiado.

7. A análise das respostas biomecânicas e biofísicas dos tendões submetidos a níveis diferentes de demanda funcional denota que os mecanismos de controle da síntese e estado de agregação dos elementos da matriz extracelular são influenciados não apenas pela intensidade do estímulo de tensão de tração, mas também pela duração e frequência deste estímulo.

6. RESUMO:

Com o propósito de se determinar as modificações da resistência à tração e dos níveis de orientação macromolecular dos feixes de colágeno frente a estímulos mecânicos, animais de laboratório foram submetidos a diferentes condições experimentais como o exercício físico e a denervação de um grupo muscular.

Após o período experimental, os tendões calcaneares destes animais foram submetidos a experimentos biomecânicos e biofísicos.

A análise das curvas de tensão de tração-deformação demonstrou que os tendões de animais treinados apresentam parâmetros de **TENSÃO DE RUPTURA** e **RIGIDEZ ELÁSTICA** superiores aos tendões de animais controle.

A avaliação das Curvas de Birrefringência de Forma dos feixes de colágeno destes tendões mostrou um aumento do estado de agregação e orientação macromolecular dos elementos da matriz extracelular, sendo constatada a manutenção dos níveis de cristalinidade.

Valores médios de **TENSÃO DE RUPTURA** ainda mais elevados foram observados para tendões de animais denervados da mesma forma que foi detectada para estes uma acentuação dos perfis das curvas de birrefringência de forma.

Visto terem sido detectadas modificações biomecânicas e biofísicas nos feixes de colágeno, estes resultados podem contribuir para a elucidação dos prováveis mecanismos de controle dos padrões de síntese e estado de agregação dos elementos fibrilares da matriz extracelular dos tendões.

7. ABSTRACT:

For the purpose of determining the modifications of tensile strength and of the different levels of macromolecular orientation in collagen bundles due to mechanical stimuli, rats were submitted to different experimental treatments, such as physical exercise and muscular denervation.

After these treatments the Achilles tendons of animals were submitted to biomechanical and biophysical experiments.

The analysis of the stress-deformation curves indicated that the tendons of trained animals presented superior **RUPTURE TENSION** and **ELASTIC STIFFNESS** parameters in comparison to their controls.

The form birefringence curves of collagen bundles in these tendons also showed an increase of aggregation state and macromolecular orientation of the extracellular matrix elements, while maintaining the crystallinity levels.

Average values of **RUPTURE TENSION** were even higher in the tendons of denervated animals. An accentuation in the profile of the Form Birefringence Curves was also observed in these tendons.

The finding of the biomechanical and biophysical modifications can contribute to the understanding of the probable control mechanisms of both the synthesis and aggregation state patterns of the fibrous elements of extracellular matrix.

B. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

AKESON, W.H.; WOO, S.L-Y.; AMIEL, D.; COUTTS, R.D. & DANIEL, D. The connective tissue response to immobility: Biochemical changes in periarticular connective tissue of the immobilized rabbit knee. Clin. Orthop., 93: 356-62, 1973.

ALEXANDER, R.McN. & BENNET-CLARK, H.C. Storage of elastic strain energy in muscle and other tissues. Nature, 256: 114-7, 1977.

AMIEL, D.; WOO, S.L-Y.; HARWOOD, F.L. & AKESON, W.H. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: A biochemical-biomechanical correlation. Acta Orthop. Scand., 53: 325-32, 1982.

ANDERSON, J.J.B.; MILIN, L. & CRACKEL, W.C. Effect of exercise on mineral and organic bone turnover in swine. J. Appl. Physiol., 30: 810-3, 1971.

ATKINS, T. Nature's lessons for the engineer. Spectrum, 192: 8-11, 1985.

BAILEY, A.J.; PEACH, C.M. & FOWLER, L.J. Chemistry of collagen cross-links. Biochem. J., 117: 819-31, 1970.

- ; ROBINS, S.P. & BALIAN, G. Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. Nature, 251: 105-9, 1974.
- BASSET, C.A.L. & BECKER, R.D. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. Science, 137: 1063-4, 1962.
- & PAWLUK, R.J. Electrical behavior of cartilage during loading. Science, 178: 982-3, 1972.
- BERENDSEN, H.J.C. & MICHELSEN, C. Hydration structure of fibrous macromolecules. Ann. N. Y. Acad. Sci., 125: 356-79, 1965.
- CASSIM, J. Y.; TOBIAS, E.W. Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. Biochim. biophys. Acta, 168: 463-71, 1968.
- CHVAPIL, M. Physico-mechanical function of connective tissue. In: ----- . Physiology of connective tissue. London, Butterworths, 1967. cap. 2, p. 11-27.
- CHVAPIL, M.; BARTOS, D. & BARTOS, F. Effect of long term physical stress on collagen growth in the lung, heart and femur of young and adult rats. Gerontologia, 19: 263-70, 1973.
- CLAUSEN, B. Influence of age on connective tissue. Hexosamine and hydroxyproline in human aorta, myocardium and skin. Lab. Invest., 11: 229-34, 1962.

- DANIELSEN, C.C. Mechanical properties of reconstituted collagen fibrils. Connect. Tissue Res., 9: 51-7, 1981.
- DIAMANT, J.; KELLER, A.; BAER, E.; LITT, M. & ARRIDGE, R.G.C. Collagen; Ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. Proc. R. Soc. Lond. B., 180: 293-315, 1972.
- ELLIOTT, D.H. Structure and function of mammalian tendon. Biol. Rev., 40: 392-421, 1965a.
- . The growth of tendon after denervation or excision of its muscle. Proc. R. Soc. B., 162: 203-9, 1965b.
- & CRAWFORD, G.N.C. The thickness and collagen content of tendon relative the cross-sectional area of muscle during growth. Proc. Roy. Soc. B., 162: 198-202, 1965.
- ENGEL, M.B. & ZERLOTTI, E. Changes in cell matrix and water of calcifying turkey leg tendons. Am. J. Anat., 120: 489-526, 1967.
- FLINT, M.H. Interrrelationships of mucopolysaccharides and collagen in connective tissue remodeling. J. Embryol. exp. Morph., 27: 481-95, 1972.
- & MERRILEES, M.J. Relationship between the axial periodicity and staining of collagen by the Masson trichrome procedure. Histochem. J., 9: 1-13, 1977.

- FUKADA, E. Piezoelectric properties of organic polymers. Ann. N. Y. Acad. Sci., 238: 7-25, 1974.
- GILLARD, G.C.; MERRILEES, M.J.; BELL-BOOTH, P.G.; REILLY, H.C. & FLINT, M.H. The proteoglycan content and the axial periodicity of collagen in tendon. Biochem. J., 163: 145-51, 1977.
- ; BIRNBAUM, P.; REILLY, H.C.; MERRILEES, M.J. & FLINT, M.H. The effect of charged synthetic polymers on proteoglycan synthesis and sequestration in chick embryo fibroblast cultures. Biochim. biophys. Acta, 584: 520-28, 1979a.
- ; REILLY, H.C.; BELL-BOOTH, P.G. & FLINT, M.H. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of rabbit flexor digitorum profundus. Connect. Tissue Res., 7: 37-46, 1979b.
- GOLDBERG, B. Binding of soluble type I collagen molecules to the fibroblast plasma membrane. Cell, 16: 265-75, 1979.
- HARRIS, A.K.; STOPAK, D. & WILD, P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. Nature, 290: 249-51, 1981.
- HEIKKINEN, E. & VUORI, I. Effect of physical activity on the metabolism of collagen in aged mice. Acta Physiol. Scand., 84: 543-49, 1972.

INGELMARK, B.E. Über den Bau der Sehnen während verschiedener Altersperioden und unter wechselnden functionellen Bedingungen. Acta Soc. Med., 50: 357-96, 1945.

----- The structure of tendons at various ages and under different functional conditions. II- An electron-microscopic investigation of Achilles tendons from white rats. Acta Anat., 6: 193-225, 1948.

JACKSON, D.S. & BENTLEY, J.P. Collagen-glycosaminoglycan interactions. In: Gould, B.S., ed. Treatise on collagen. New York, Academic, 1968. v.2, p.189-211.

KER, R.F. Dynamic tensile properties of the plantaris tendon of sheep (Ovis aries). J. Exp. Biol., 93: 283-302, 1981.

KIISKINEN, A. Physical training and connective tissues in young mice - Physical properties of Achilles tendons and long bones. Growth, 41: 123-37, 1977.

----- & HEIKKINEN, E. Physical training and connective tissues in young mice. Biochemistry of long bones. J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol., 44 (1): 50-4, 1978.

----- & SUOMINEN, H. Blood circulation of long bones in trained growing rats and mice. Eur. J. Appl. Physiol., 34: 303-9, 1975.

- KLEIN, L.; DAWSON, M.H. & HEIPLE, K.G. Turnover of collagen in the adult rat denervation. J. Bone Jt. Surg., 59-A: 1065-7, 1977.
- KLEINMAN, H.K.; WILKES, C.M. & MARTIN, C.R. Interaction of fibronectin with collagen fibrils. Biochemistry, 20: 2325-30, 1981.
- LEUNG, D.Y.M.; GLAGOV, S. & MATHEWS, M.B. A new in vitro system for studying cell response to mechanical stimulation. Exp. Cell Res., 109: 285-98, 1977.
- LIGHT, N.D. & BAILEY, A.J. Changes in crosslinking during aging in bovine tendon collagen. FEBS Lett., 97: 183-8, 1979.
- MELLO, M.L.S.; GODO, C.; VIDAL, B.C. & ABUJADI, J.M. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. Ann. Histochem., 20: 145-52, 1975.
- _____; VIDAL, B.C.; CARVALHO, A.C. & CASEIRO-FILHO, A.C. Change with age of anisotropic properties of collagen bundles. Gerontologia, 25: 2-8, 1979.
- MERRILEES, M.J. & FLINT, M.H. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. Am. J. Anat., 157: 87-106, 1980.

- MICHNA, H. Morphometric analysis of loading-induced changes in collagen-fibril populations in young tendons. Cell Tissue Res., 236: 465-70, 1984.
- MINNS, R.J.; SODEN, P.D. & JACKSON, D.S. The role of the fibrous components and ground substance in the mechanical properties of biological tissues: A preliminary investigation. J. Biomech., 6: 153-65, 1973.
- MITCHELL, T.W. & RIGBY, B.J. In vivo and in vitro aging of collagen examined using an isometric melting technique. Biochim. biophys. Acta, 393: 531-41, 1975.
- MOSLER, E.; FOLKHARD, W.; KNÖRZER, E.; NEMETSCHKE-GANSLER, H.; NEMETSCHKE, T.H. & KOCH, M.H.J. Stress-induced molecular rearrangement in tendon collagen. J. Mol. Biol., 182: 589-596, 1985.
- NOYES, F.R.; TORVIK, P.J.; HYDE, W.B. & DE LUCAS, J.L. Biomechanics of ligament failure. II: An analysis of immobilization, exercise and reconditioning effects in primates. J. Bone Jt. Surg., 56-A: 1406-18, 1974.
- OAKES, B.W.; PARKER, A.W. & NORMAN, J. Changes in collagen fiber population in young rat cruciate ligaments in response to a one month intensive exercise program. Connect. Tissue Res., 9: 212, 1982.

OXLUND, H. & ANDREASSEN, T.T. The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissues. J. Anat., 131 (4): 611-20, 1980.

PARRY, D.A.D.; BARNES, G.R.H. & CRAIG, A.S. A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. Proc. R. Soc. Lond. B., 203: 305-21, 1978.

-----; FLINT, M.H.; GILLARD, G.C. & CRAIG, A.S. A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. FEBS Lett., 149: 1-7, 1982.

PAUKKONEN, K.; SELKÄINÄHO, K. JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I. & HELMINEN, H. Cells and nuclei of articular cartilage chondrocytes in young rabbits enlarged after non-strenuous physical exercise. J. Anat., 142: 13-20, 1985.

PIMENTEL, E.R. Form birefringence of collagen bundles. Acta Histochem. Cytochem., 14 (1): 35-40, 1981.

RIGBY, B.J. Effect of cyclic extension on the physical properties of tendon collagen and its possible relation to biological ageing of collagen. Nature, 202: 1072-4, 1964.

-----; HIRAI, N; SPIKES, J.D. & EYRING, H. The mechanical properties of rat tail tendon. J. Gen. Physiol., 43: 265-83, 1959.

ROBINS, S.P. & BAILEY, A.J. Some observations on the ageing *in vitro* of reprecipitated collagen fibres. Biochim. biophys. Acta, 492: 408-14, 1977.

ROLLHÄUSER, H. Die Doppelbrechkraft der Sehnen bei gesteigerter Muskeltätigkeit. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 40: 459-69, 1954a.

----- Funktionelle Anpassung der Sehnenfasern im submikroskopischen Bereich. Anat. Anz., 51: 318-322, 1954b.

ROTH, S. & FREUND, I. Second harmonic generation and orientation order in connective tissue : A mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon. J. Appl. Cryst., 15: 72-8, 1982.

RUNDGREN, Å. Physical properties of connective tissue as influenced by single and repeated pregnancies in the rat. Acta Physiol. Scand., (suppl.) 417: 1-138, 1974.

SCOTT, J.E. Collagen-proteoglycan interactions. Biochem. J., 187: 887-91, 1980.

-----; ORFORD, C.R. & HUGHES, E.W. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. Biochem. J., 195: 573-81, 1981.

SHAH, J.S.; PALACIOS, E. & PALACIOS, L. Development of crimp morphology and cellular changes in chick tendons. Dev. Biol., 94: 499-504, 1982.

SINEX, F.M. The role of collagen in aging. In: Gould, B.S., ed. Treatise on collagen. New York, Academic, 1968. v. 2B, p. 409-448.

STOPAK, D. & HARRIS, A.K. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. Dev. Biol., 90: 383-98, 1982.

-----; WESSELLS, N.K. & HARRIS, A. K. Morphogenetic rearrangement of injected collagen in developing chicken limb buds. Proc. natl. Acad. Sci., 82: 2804-8, 1985.

SUOMINEN, H.; KIISKKINEN, A. & HEIKKINEN, E. Effects of physical training on metabolism of connective tissues in young mice. Acta Physiol. Scand., 108: 17-22, 1980.

TIPTON, C.M.; JAMES, S.L.; MERGNER, W. & TSCHENG, T-K. Influence of exercise on strength of medial collateral knee ligaments of dogs. Am. J. Physiol., 218 (3): 894-901, 1970.

-----; SCHILD, R.J. & TOMANEK, R.J. Influence of physical activity on the strength of knee ligaments in rats. Am. J. Physiol., 212 (4): 783-7, 1967.

TRELSTAD, R.L. & HAYASHI, K. Tendon collagen fibrillogenesis : Intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. Dev. Biol., 71: 228-42, 1979.

VAILAS, A.C.; TIPTON, C.M.; MATTHES, R.D. & GART, M. Physical activity and its influence on the repair process of medial collateral ligaments. Connect. Tissue Res., 9: 25-31, 1981.

VIDAL, B.C. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. Protoplasma, 56: 529-36, 1963.

----- The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. Protoplasma, 59: 472-9, 1964.

----- Macromolecular desorientation in detached tendons. Protoplasma, 62: 121-32, 1966.

----- Desorganização macromolecular dos feixes de colágeno sob a influência da histamina. Estudo experimental. Dissertação de Cátedra, Piracicaba, Unicamp, 1967. 101 p.

----- Collagen bundle regulation and control. Revta. Bras. Pesqui. Med. Biol., 2 (5/6): 356-9, 1969.

----- Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: Microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell. Mol. Biol., 22: 45-64, 1977.

----- . The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. Cell. Mol. Biol., 26: 415-21, 1980.

----- . Orden molecular y haces de colágeno. Trab. Inst. Cajal, 75: 19-27, 1984.

----- . Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: Microphotometric measurements of textural birefringence. Cell. Mol. Biol., 1986 (in press).

----- . & CARVALHO, H.F. Chitin molecular order in chitinous tendon of the grasshopper, Spharagenon bolli. Cell. Mol. Biol., 1986 (in press).

----- .; MELLO, M.L.S.; GODO, C.; CASEIRO-FILHO, A.C. & ABUJADI, J.M. Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles : ADB and form birefringence curves. Ann. Histochem., 20: 15-26, 1975.

----- . & VILARTA, R. Articular cartilage: Collagen II - proteoglycan interactions. Availability of reactive groups. Variations in birefringence and differences as compared to collagen I. (manuscrito).

VIIDIK, A. The effect of training on the tensile strength of isolated tendons. Scand. J. Plast. Reconstruct. Surg, 1: 141-7, 1967.

- Elasticity and tensile strength of the anterior cruciate ligament in rabbits as influenced by training. Acta Physiol. Scand., 74: 372-80, 1968.
- Tensile strength properties of Achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. Acta Orthop. Scand., 40: 261-72, 1969.
- Simultaneous mechanical and light microscopic studies of collagen fibers. Z. Anat. EntwGesch., 136: 204-12, 1972.
- Functional properties of collagenous tissues. Int. Rev. Connect. Tissue Res., 6: 127-215, 1973..
- WATT, P.W.; KELLY, F.J.; GOLDSPINK, D.F. & GOLDSPINK, G. Exercise-induced morphological and biochemical changes in skeletal muscles of the rat. J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol., 53 (5): 1144-51, 1982.
- WOO, S. L-Y.; GELBERMAN, R.H.; COBB, N.G.; AMIEL, D.; LOTHINGER, K. & AKESON, W.H. The importance of controlled passive mobilization on the flexor tendon healing. A biomechanical study. Acta Orthop. Scand., 52 (6): 615-22, 1981.
- ; RITTER, M.A.; AMIEL, D.; SANDERS, T.M.; GOMEZ, M.A.; KUEI, S.C.; GARFIN, S.R. & AKESON, W.H. The biomechanical and biochemical

properties of swine tendons.- Long term effects of exercise on the digital extensors. Connect. Tissue Res., 7: 177-83, 1980.

WOOD, G.C. The formation of fibrils from collagen solutions. III. Effects of chondroitin sulfate and some other naturally occurring polyanions on the rate of formation. Biochem. J., 75: 605-12, 1960.

ZUCKERMAN, J. & STULL, G.A. Effects of exercise on knee ligament separation force in rats. J. Appl. Physiol., 26 (6): 716-9, 1969.