

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE BIOLOGIA

Andrea Aparecida de Aro

**EFEITO DA IMOBILIZAÇÃO SEGUIDA DE ALONGAMENTO
SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR DO TENDÃO
CALCANEAR DE RATOS**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Andrea Aparecida de Aro e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Campinas, 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Ar67e

Aro, Andrea Aparecida de
Efeito da imobilização seguida de alongamento sobre a matriz extracelular do tendão calcâneo de ratos / Andrea Aparecida de Aro. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Imobilização. 2. Alongamento passivo. 3. Tendão calcâneo. 4. Matriz extracelular. 5. Rato. I. Pimentel, Edson Rosa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of immobilization followed by stretching on the extracellular matrix of the calcaneal tendon of the rat.

Palavras-chave em inglês: Immobilization; Passive stretching; Calcaneal tendon; Extracellular matrix; Rat.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Edson Rosa Pimentel, Sebastião Roberto Taboga, Antonella Sachsida Braga Vilela.

Data da defesa: 28/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 28 de fevereiro de 2008.

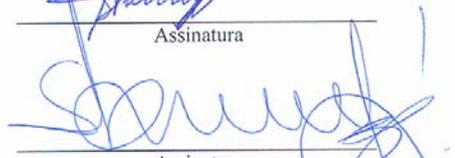
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga



Assinatura

Profa. Dra. Antonella Sachsida Braga Vilela



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Assinatura

Profa. Dra. Flávia de Paoli

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP por possibilitar a realização desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial ao meu orientador, prof. Edson Rosa Pimentel, meus mais profundos agradecimentos pela oportunidade, confiança, amizade e dedicação.

À Tatiana e Adriano pela amizade, divertida companhia e ajuda durante a realização dos experimentos no laboratório.

À Elusa pela amizade e apoio durante os momentos difíceis que vivemos dentro e fora da UNICAMP.

Ao prof. Vidal pela paciência e ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação.

Aos amigos do Instituto de Biologia, Júlio, Juliana Mória, Alberto, Juliana Monteiro, Danilo, Taíze, Marcos, Pedro, Fabrícia, Karina e Wilson pela agradável e divertida convivência.

À profa. Laure pela colaboração na manutenção dos recursos do laboratório.

À Liliam pela amizade e boa vontade em resolver todos os problemas.

Ao Francisco pela amizade e valiosa ajuda técnica diária no laboratório.

À Tatiane pela carinhosa amizade que foi fundamental nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Alexandre, pelo carinho e incentivo durante a preparação final desse trabalho.

Aos meus pais Ademir e Izilda, e irmã Fernanda, pelo apoio, confiança, amor e incentivo constantes em minha vida.

*“O coração do homem planeja o seu caminho, mas o SENHOR
lhe dirige os passos”.*

PROVÉRBIOS 16:9

“Vários são os caminhos não percorridos

Vários são os recursos não usados

Todas as chances são para você

Tente mais uma vez...

Se dê a chance da conquista

Insista e faça dar certo.”

Luiz Antônio Gasparetto

Dedico esta dissertação

a

*todas as pessoas que, direta ou indiretamente,
contribuíram para a sua realização.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Anatomia do tendão de Aquiles.....	18
1.2 Características estruturais e bioquímicas.....	20
1.3 Comportamento biomecânico.....	24
1.4 Alterações nos tendões resultantes da imobilização e alongamento....	26
1.5 Dicroísmo linear no estudo da organização da matriz extracelular....	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ARTIGO.....	42
Efeito da imobilização seguida de alongamento sobre a matriz extracelular do tendão calcâneo de ratos.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.1 Animais.....	48
2.2 Grupos experimentais.....	48
2.3 Procedimentos para imobilização e alongamento.....	49
2.4 Análise bioquímica	49
2.4.1 Extração dos componentes da matriz extracelular do tendão.....	49
2.4.2 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.....	50
2.4.3 Eletroforese em gel de agarose (0.5-1.0%).....	51

2.4.4	Quantificação de hidroxiprolina.....	51
2.4.5	Dosagem de proteínas não colagênicas.....	52
2.4.6	Dosagem de glicosaminoglicanos sulfatados.....	52
2.4.7	Densitometria.....	52
2.5	Análise morfológica.....	53
2.5.1	Processamento para análise estrutural em microscopia de luz.....	53
2.5.2	Medidas de dicroísmo linear (DL).....	53
2.6	Análise estatística.....	54
3.	RESULTADOS.....	55
4.	DISCUSSÃO.....	61
5.	CONCLUSÃO.....	69
	FIGURAS.....	71
	Figura 1: Modelo de órtese.....	72
	Figura 2: Pata inferior de rato.....	73
	Figura 3: Gráfico peso dos animais.....	74
	Figura 4: SDS-PAGE sem β -mercaptoetanol.....	75
	Figura 5: SDS-PAGE com β -mercaptoetanol.....	76
	Figura 6: Gráfico dosagem de hidroxiprolina.....	77
	Figura 7: Gráfico dosagem de proteínas não colagênicas.....	78
	Figura 8: Gráfico dosagem de glicosaminoglicanos sulfatados.....	79
	Figura 9: Eletroforese em gel de agarose.....	80
	Figura 10: Densitometria dermatam sulfato.....	81
	Figura 11: Densitometria condroitim sulfato.....	82
	Figura 12: Prancha HE (MOC).....	83
	Figura 13: Prancha AT (MOC).....	84
	Figura 14: Prancha AT polarização.....	85
	Figura 15: Prancha PSS polarização.....	86

Tabela 1.....	87
REFERÊNCIAS REBLOGRÁFICAS.....	88
DECLARAÇÃO.....	96

RESUMO

Músculos, tendões e ligamentos constituem a maioria das estruturas afetadas durante a realização de atividades desportivas, assim um melhor conhecimento sobre essas estruturas é de grande interesse para profissionais que tratam da reabilitação. Pouco se sabe sobre os efeitos do alongamento sobre aspectos bioquímicos e estruturais de tendões, quando usado como modalidade terapêutica após longo período de imobilização. No presente estudo, com o objetivo de avaliar a resposta do tecido frente a procedimentos de alongamento após imobilização, ratos wistar foram divididos em cinco grupos experimentais: controle do grupo Imobilizado (ratos não imobilizados), grupo Imobilizado (ratos imobilizados por 4 semanas), controle do grupo Imobilizado Alongado e Imobilizado Livre (ratos sem imobilização e alongamento), grupo Imobilizado e Alongado (imobilizados por 4 semanas e alongados durante 3 semanas) e grupo Imobilizado e Livre (imobilizados por 4 semanas e livres na gaiola por 3 semanas). Os tendões foram retirados e separados em regiões proximal (tensão) e distal (compressão) para serem analisados. Para as análises bioquímicas as regiões distal e proximal foram extraídas com cloreto de guanidina e os extratos analisados por SDS-PAGE, dosagem de proteínas não colagênicas e glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados. Para quantificação de hidroxiprolina os tendões foram hidrolisados em HCl. Para as análises morfológicas os cortes de tendões foram corados com Hematoxilina-eosina (HE), Azul de Toluidina (AT) e Ponceau SS (PSS). A análise em SDS-PAGE não mostrou diferenças marcantes entre os grupos, mas uma banda de colágeno mais proeminente foi observada no grupo IL em relação ao IA e ao grupo controle na região de compressão. A dosagem de hidroxiprolina mostrou maior concentração no grupo I na região de compressão. Nenhuma diferença foi

observada na região de tensão. Com relação à concentração de proteínas não colagênicas, foram detectadas diferenças apenas na região de tensão, com maiores concentrações no grupo I. Quando comparados os grupos IA e IL, valores mais altos foram encontrados no grupo IA. Foi observado presença abundante de GAGs sulfatados, especialmente de condroitim sulfato, na região de compressão do grupo IA. A presença de dermatam sulfato foi marcante nas regiões de compressão e tensão dos grupos I e IL. A análise em microscopia de polarização de cortes corados com PSS indicou maior desorganização dos feixes de colágeno no grupo I, com parcial recuperação após alongamento ou apenas remobilização. Uma revisão no procedimento de alongamento deveria ser considerada em experimentos futuros, considerando a duração e periodicidade das sessões, visando melhorar sua eficiência em casos de tendões previamente imobilizados.

Palavras-chave: imobilização, alongamento passivo, tendão calcâneo, matriz extracelular, rato.

ABSTRACT

Muscles, tendons and ligaments are present in most of structures that may be injured during sportive activities, so a better knowledge on these structures is very important for professionals who work with rehabilitation. Little is known about the stretching effects on the biochemical and morphological features of the tendons, specially when tendons are submitted to a long period of immobilization. In the present work our purpose was evaluate the response of the tissue to the procedures of stretching followed of immobilization, rats wistar were divided into five experimental groups: control Immobilized (rats not immobilized), Immobilized (immobilized for 4 weeks), control Immobilized and Stretched / Immobilized and Free (rats without immobilization and stretching), Immobilized and Stretched (immobilized for 4 weeks and stretched during 3 weeks) and Immobilized and Free (immobilized for 4 weeks and free in the cages for 3 weeks). The tendons were removed and the proximal (tension) and distal (compression) regions were separated to be analyzed. For biochemical analysis the proximal and distal regions were extracted with guanidinium chloride and the extract analyzed for SDS-PAGE, non-collagenous proteins, and sulfated glycosaminoglycan (GAGs sulfated). For quantitation of hydroxyproline the tendons were hydrolysed in HCl. For morphological analysis the sections of the tendons were stained with Haematoxylin-eosin (HE), Toluidine Blue (AT) and Ponceau SS (PSS). Observations were with polarization microscopy. Analysis in SDS-PAGE showed no remarkable differences amongst the groups, but a more prominent band of collagen was observed in the IF in relation to IA and control groups in the compression region. Analysis of the quantity of hydroxyproline showed more concentration in the I group in the compression region. No differences were observed in tension region. With respect to the concentration of non-collagenous

proteins, differences were detected only in the tension region, where larger concentrations were found in the I Group. When IS and IF were compared, highest values were found in the IS group. A more abundant presence of sulfated GAGs, especially chondroitin sulfate, was found in the compression region of the IS group. The presence of dermatan sulfate was remarkable in the compression and tension regions of I and IF groups. Analysis of sections stained with Ponceau SS, under polarization microscopy, indicated that the I group exhibits a larger disorganization of the collagen bundles, partially recovered after stretching or with only remobilization. A revision in the stretching procedure should be considered in future experiments, in terms of duration and periodicity of the sessions to try improving the efficiency of the stretching in cases of previous immobilization of tendons.

Keywords: immobilization, passive stretching, calcaneal tendon, extracellular matrix, rat.

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{pa} – absorvância na posição paralela

A_{pe} – absorvância na posição perpendicular

AT – azul de toluidina

contr I – controle do grupo imobilizado

contr IA/IL – controle do grupo imobilizado alongado e imobilizado livre

CS – condroitim sulfato

DL – dicroísmo linear

DR – índice dicróico

DS – dermatam sulfato

GAG – glicosaminoglicano

Gly – glicina

HE – hematoxilina-eosina

HS – heparam sulfato

I – grupo imobilizado

IA – grupo imobilizado e alongado

IL – grupo imobilizado e livre

Kp – quiloponde

MEC – matriz extracelular

MMPs – metaloproteases

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio.

PG – proteoglicano

PNC – proteínas não colagênicas

PLP – plano de luz polarizada

PSS – ponceau SS

TIMPs – inibidoras teciduais de metaloproteases

1. INTRODUÇÃO

Músculos, tendões e ligamentos constituem a maioria das estruturas afetadas durante a realização de atividades desportivas, sendo portanto, de grande interesse para profissionais da reabilitação. O excesso ou a ausência de estresse sobre os tecidos muscular e conjuntivo induz alterações em suas propriedades e favorece a ocorrência de lesões que podem, algumas vezes, impedir o indivíduo de realizar atividades esportivas (AQUINO *et al.*, 2005).

Embora os tendões sejam componentes chaves do sistema músculo-esquelético, apenas recentemente receberam atenção dos reumatologistas, devido à massificação das atividades desportivas. As desordens dos tendões eram coletivamente classificadas como “tendinites”. Somente com a atual introdução de técnicas que permitem a investigação detalhada de tendões, como a Imagem de Ressonância Magnética (MRI), foi possível identificar lesões de tendões e determinar suas causas. A MRI pode ser usada ainda na avaliação dos riscos de ocorrência de ruptura de tendão e monitorar o curso da tendinopatia (HAYEM, 2001).

Além das atividades desportivas, alguns outros fatores como idade, diabetes e hormônios, determinam condições fisiológicas que afetam os tecidos conjuntivos e modificam o metabolismo do colágeno e as propriedades funcionais de suas fibras (COMPER & WAYNE, 1996). Com o envelhecimento e desuso, os feixes de colágeno do tipo I nos tendões sofrem transformações decorrentes do aumento de ligações cruzadas inter/intramoleculares, com o aumento da cristalinidade e da agregação ordenada deste tipo de colágeno (VIDAL & CARVALHO, 1990). Paralelamente, há decréscimo de proteoglicanos (PGs) e conteúdo de água (SELL & MONIER, 1995; TUIE *et al.*, 1997). Em geral, a densidade e o conteúdo total de colágeno aumentam com a idade (SHADWICK, 1990), principalmente por

causa do decréscimo do “turnover” de colágeno e da redução na síntese de enzimas colagenolíticas (O`BRIEN, 1997).

Apesar da ampla utilização de várias técnicas de alongamento no processo de reabilitação, a literatura é escassa com relação aos mecanismos responsáveis pelo ganho de amplitude de movimento (AQUINO *et al.*, 2005). É conhecido que o músculo responde a remobilização mais rapidamente que outras estruturas de tecido conjuntivo. A recuperação do músculo começa dentro de 3 a 5 dias após o início de um programa de exercícios, mas não se sabe se todos os efeitos lesivos de uma imobilização prolongada sobre os tecidos podem ser totalmente revertidos com técnicas de remobilização (CARVALHO, 2001). Entretanto, não se conhece o efeito do alongamento sobre tendões previamente imobilizados. Em geral, após a imobilização há perda de componentes básicos dos tecidos que podem repercutir negativamente em suas funções teciduais básicas (ENGLES, 2001). Essas alterações parecem ser mais facilmente revertidas no tecido muscular quando comparado com o tecido conjuntivo (COOPER, 1972). Sendo assim, o conhecimento das alterações estruturais e funcionais do tendão decorrentes do uso do alongamento como modalidade terapêutica após imobilização, poderia contribuir amplamente para o desenvolvimento de um protocolo para o tratamento de determinadas desordens tendíneas, em especial o tendão de Aquiles.

1.1 Anatomia do tendão de Aquiles

Os tendões são estruturas anatômicas interpostas entre músculos e ossos que transmitem a força de contração gerada no músculo para o osso, promovendo o movimento articular. Tendões saudáveis apresentam uma coloração branca brilhante e uma textura fibro-elástica, mostrando grande resistência às forças de tensão e compressão. A estrutura de união do tendão com o músculo é

chamada de junção miotendínea (MTJ) e a de união com o osso, é chamada de junção osteotendínea (OTJ) (KANNUS, 2000). A transmissão da força da unidade miotendínea é dependente tanto da integridade estrutural entre as fibras individuais do músculo e a MEC (BAILEY *et al.*, 1979), como também do arranjo fibrilar do tendão, proporcionando resistência e absorção de energia (ALEXANDER, 1991; ALEXANDER & BENNET-CLARK, 1997).

O tendão de Aquiles é um dos maiores e mais resistentes tendões do corpo humano (DeMAIO *et al.*, 1995; LEMM *et al.*, 1992), podendo resistir às cargas superiores à 400Kp (WEINER & LIPSCOMB, 1956), contudo, desordens e rupturas são muito comuns. Em adultos, este tendão apresenta uma zona hipovascular localizada entre 2-6 cm a partir da zona de inserção no calcâneo (LAGERGREN & LINDHOLM, 1959; SCHIMIDT-ROHFLING *et al.*, 1992), onde as desordens e rupturas são mais frequentes. Além disso, esta posição corresponde a uma região de máxima rotação das fibras de colágeno, comprometendo o suprimento sangüíneo (LESIC & BUMBASIREVIC, 2004).

O tendão de Aquiles humano se origina das aponeuroses de ambos os músculos gastrocnêmio e sóleo, tendo 15 cm de comprimento. Insere-se no osso calcâneo do tarso do pé (MYERSON & MANDELBAUM, 2000; LEACH *et al.*, 1981). Este tendão é circundado por um tecido conjuntivo frouxo chamado de paratendão, que permite o livre movimento do tendão contra os tecidos vizinhos (HESS *et al.*, 1989). Abaixo do paratendão, todo o tendão é circundado por uma fina bainha de tecido conjuntivo denominada epitendão (figura 1), que na sua superfície externa é contínua com o paratendão, e na sua superfície interna é contínua com o endotendão. O endotendão recobre cada fibra do tendão e liga essas fibras individuais, formando grandes unidades de feixes de fibras de colágeno (ELLIOT, 1965; JÓZSA *et al.*, 1991).

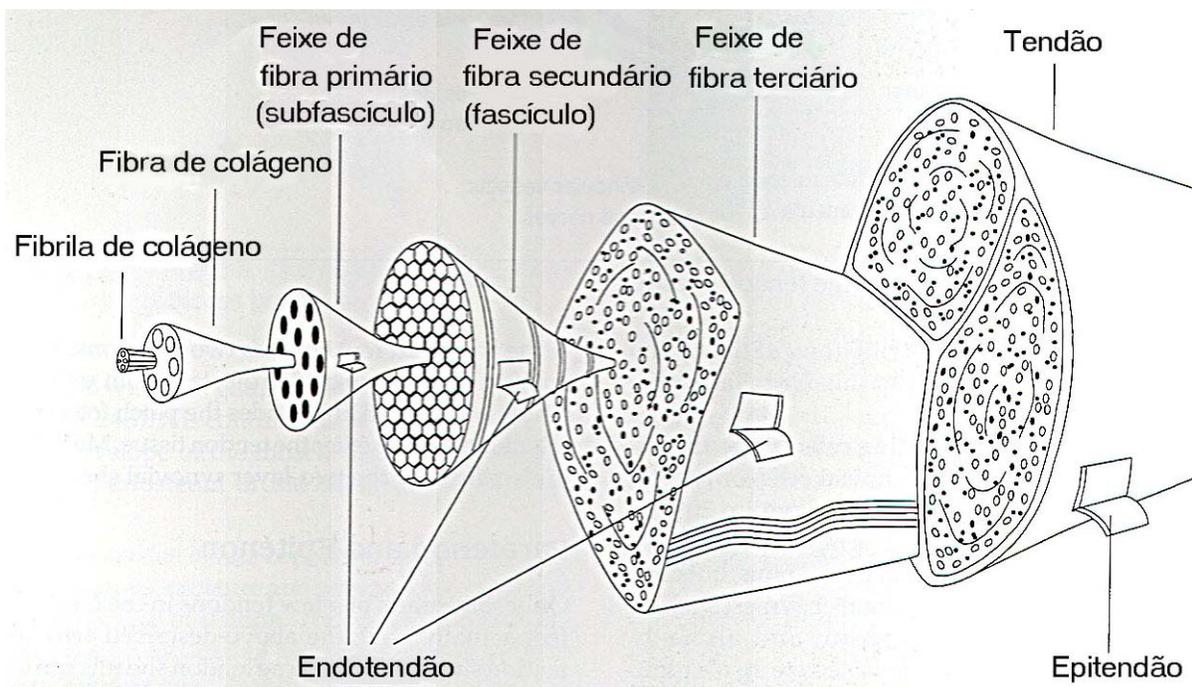


Figura 1: Organização hierárquica da estrutura do tendão a partir das fibrilas de colágeno (modificado de JÓZSA & KANNUS, 1997).

1.2 Características estruturais e bioquímicas

Os tendões são um tipo de tecido conjuntivo denso modelado formados por uma abundante matriz extracelular (MEC) constituída por componentes fibrilares, tais como: fibras de colágeno e elastina; proteoglicanos (PGs) e glicoproteínas não colagênicas. Os tendões contém 55-70% de água e uma parte substancial dessa água está associada com os PGs na MEC (ELLIOTT, 1965; JÓZSA & KANNUS, 1997; VOGEL & MEYERS, 1999). Do peso seco do tendão, 60-85% são proteínas colagênicas (KJAER, 2004), sendo que estas representam o maior grupo de macromoléculas orgânicas presentes no organismo (GELSE *et al.*, 2003).

O colágeno presente no tendão é predominantemente do tipo I (~60%) que se organiza em fibrilas, fibras, feixes de fibras e fascículos (KJAER, 2004), que se dispõem em arranjo helicoidal seguindo o maior eixo do tendão (O'BRIEN, 1997; VIDAL & CARVALHO, 1990; LIU *et al.*, 1995). Estas fibras são responsáveis por propriedades biomecânicas como flexibilidade, resistência e até mesmo uma certa elasticidade dos tendões (VOGEL & KOOB, 1989; VIDAL & CARVALHO, 1990; MILZ *et al.*, 1998; KUIST *et al.*, 1991). Também estão presentes os colágenos tipo III (0-10%), IV (~2%) (AHTIKOSKI *et al.*, 2003; HANSON & BENTLEY, 1983), V e VI (JOZSA & KANNUS, 1997; VIIDK, 1969).

A principal característica de uma molécula de colágeno fibrilar é a estrutura longa, rígida e estável de sua fita-tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas α são enroladas, formando um tipo de corda supertorcida. Cada cadeia contém repetições de uma seqüência característica de aminoácidos, formada por Gly-X-Y, onde X e Y podem ser quaisquer aminoácidos, mas cerca de um terço das posições X são ocupadas por prolina e um número semelhante de posições Y são 4-hidroxiprolina, resultante de modificações pós-traducionais de prolina. A presença de prolina, hidroxiprolina e glicina, é fundamental na estabilização da tripla hélice de colágeno (PIEZ & REDDI, 1984).

A glicina é o aminoácido com menor radical R, apenas H, e está espaçada regularmente a cada dois aminoácidos por toda a região central da cadeia α , permitindo que as três hélices de cadeias α se aproximem e formem a tripla hélice do colágeno. Resíduos de lisina também estão presentes na molécula de colágeno. A hidroxilação destes resíduos pela ação da Lisil-hidroxilase (HAY, 1991) e posterior formação de grupo aldeído pela ação da Lisil-oxidase (PIEZ & REDDI, 1984), favorecem a formação de ligações cruzadas intra e posteriormente intermoleculares, contribuindo assim, para o aumento da capacidade das fibrilas de colágeno de resistir às forças de tensão. Algumas hidroxilinas são ainda

adicionalmente modificadas pela glicosilação (GELSE *et al.*, 2003). No tendão de Aquiles, o colágeno possui altíssimo número de ligações cruzadas, formando uma estrutura reforçada onde a resistência à força tensora é essencial.

Além das moléculas de colágeno como representantes dos componentes fibrilares da MEC, também está presente uma pequena quantidade de fibras elásticas (~2% do peso seco) (EYRE *et al.*, 1984; JÓZSA & KANNUS, 1997) que se organiza de forma ordenada e paralela às fibras de colágeno, permitindo aos tendões suportar as altas cargas unidirecionais a que são submetidos durante as atividades esportivas ou diárias (AQUINO *et al.*, 2005).

Componentes não-fibrilares, tais como os PGs e glicoproteínas não colagênicas, também são elementos constituintes dos tendões. Os PGs consistem de um esqueleto central de proteína e pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAG) ligada covalentemente (ESQUISATTO *et al.*, 2003). Os PGs são importantes na fusão das fibrilas, pois assim como atuam as moléculas de fibrilina, estes também aderem ao longo das fibrilas de colágeno (BALDOCK *et al.*, 2001), mantendo e regulando o diâmetro das mesmas (IOZZO & MURDOCH, 1996).

Estudos têm mostrado que entre os PGs constituintes do tendão, estão presentes especialmente os pequenos PGs ricos em leucina, dos quais o fibromodulim e o decorim (até 1%) são os mais importantes (DERWIN *et al.*, 2001) e também pode ser encontrada uma proteína não colagênica, chamada de proteína oligomérica de matriz de cartilagem (COMP até 1%)(MULLER *et al.*, 1998; SMITH-MUNGO & KAGAN, 1997). Esta proteína tem esse nome porque foi primeiramente encontrada em cartilagem. O fibromodulim e o decorim interagem com as fibrilas de colágeno de maneira ordenada (SCOTT, 1998), atuando na fibrilogênese do colágeno (SCOTT *et al.*, 1997; SCOTT, 1995). Os GAGs presentes nos proteoglicanos formam géis hidratados que são importantes

na manutenção do espaçamento entre as fibras de colágeno, facilitando o deslizamento entre elas e conferindo ao tecido a propriedade de viscoelasticidade (AQUINO *et al.*, 2005). Os GAGs também associam-se às proteínas fibrosas da matriz, como o colágeno, gerando estruturas supramoleculares (VIDAL & MELLO, 1984).

Os tendões possuem fibras de colágeno que apresentam um padrão ondulado conhecido como “crimp” (GATHERCOLE & KELLER, 1991; VIDAL & MELLO, 1984), que pode ser detectado também em outros tecidos, onde são fundamentais e apresentam uma estrutura mais complexa. O “crimp” é uma característica dos colágenos formadores de fibrilas (em particular os tipos I, II e III), presentes em tecidos conjuntivos sujeitos a cargas de tensão, sendo que, o padrão ondulado básico da fibra é alterado de modo a se adaptar a situação mecânica atuante (GATHERCOLE & KELLER, 1991). Desta forma, há variações na organização do “crimp” nas diferentes regiões do mesmo tendão (VIDAL, 1995), que podem ser reveladas pela microscopia de luz polarizada (VIDAL, 2003). O estresse e a deformação pelos quais os feixes de colágeno são submetidos necessitam de grandes regiões de “crimp”, que favorecem os feixes de colágeno na adaptação à tensão (GATHERCOLE & KELLER, 1991).

Na matriz extracelular do tendão, entre os feixes de colágeno são encontrados tendinócitos com núcleos achatados e fibroblastos com núcleos alongados, responsáveis pela intensa atividade na síntese de macromoléculas da matriz extracelular (O’BRIEN, 1997). A celularidade em tendões e a espessura dos feixes de fibra de colágeno variam de acordo com a idade, sendo que tendões de animais adultos têm feixes de colágeno mais compactos e menor número de células, enquanto que animais mais jovens apresentam grande celularidade e feixes de fibras mais finos (VIDAL & CARVALHO, 1990).

1.3 Comportamento biomecânico

A capacidade que os tendões apresentam de resistir aos vários tipos de estresse mecânico ao qual são submetidos, está diretamente relacionada com a organização estrutural da sua MEC (ESQUISATTO *et al.*, 2003). As propriedades biomecânicas dos tendões são determinadas tanto pela associação entre o colágeno e os outros elementos da matriz extracelular, como também, pelo diâmetro e orientação de suas fibras e feixes (VIDAL & CARVALHO, 1990).

As forças de compressão e atrito adicionadas à de tensão normal exercidas pelos músculos, levam à variações regionais na morfologia e composição dos tendões (CARVALHO & VIDAL, 1994; COVIZI *et al.*, 2001). Desta forma, a MEC se adapta a diferentes forças biomecânicas, apresentando diferenças regionais em termos de composição e organização ao longo do tendão. Nas regiões onde a tensão é exercida em todas as direções, os feixes de colágeno estão dispostos sem orientação regular, enquanto que em regiões onde a tensão é exercida apenas em uma direção, as fibras demonstram uma disposição ordenada e unidirecional (O'BRIEN, 1997). Os PGs estão presentes especialmente em regiões de compressão (VOGEL & HEINEGARD, 1985), pois são estruturas altamente hidratadas por uma espessa camada de água de solvatação que envolve a molécula, tornando o tecido viscoso. As fibras elásticas posicionam-se paralelamente as fibras de colágeno nas regiões de tensão, enquanto que na região de compressão, as fibras elásticas e colágenas estão distribuídas em várias direções, imersas em grande quantidade de proteoglicanos (FEITOSA *et al.*, 2002).

A carga mecânica leva a uma adaptação fisiológica do tecido (COVIZI *et al.*, 2001) que responde ao estresse alterando sua organização estrutural, de modo a atender à nova demanda mecânica (CHIQUET, 1999). Esta alteração e a própria manutenção da estrutura tecidual são parcialmente dependentes da estimulação

mecânica (COVIZI *et al.*, 2001). O estímulo mecânico é importante para a homeostase da MEC nos tecidos conjuntivos, pois afeta a expressão de proteínas específicas da MEC, como descrito abaixo. Sendo assim, deve existir um mecanismo de feedback pelo qual as células que são atingidas, via substrato, por sinais desencadeados pelo estresse mecânico, respondam alterando a expressão de proteínas e, conseqüentemente, remodelam a MEC para se adaptarem às necessidades biomecânicas. Entretanto, a quantidade e composição da matriz extracelular são controladas não apenas pelo tipo e magnitude do estresse mecânico ao qual o tecido está submetido, mas também por programas celulares endógenos e fatores de crescimento (CHIQUET, 1999).

A MEC do tendão é formada por um conglomerado de substâncias responsáveis pela mecanotransdução, um importante mecanismo pelo qual o estresse mecânico atua sobre as células e inicia uma sinalização intracelular que promove crescimento e sobrevivência celular (FRISCH *et al.*, 1996; RAMIREZ & RIFKIN, 2003; RIED *et al.*, 1994; ROUSLAHTI, 1997; TIBBLES & WOODGETT, 1999), controla a morfologia e arquitetura em vários tipos celulares (CHICUREL *et al.*, 1998; FANGER, 1999) e influencia respostas metabólicas (IHLEMANN *et al.*, 1999).

Os vários tipos de células do tendão respondem diferentemente às mudanças mecânicas (HAMILL & MARTINAC, 2001). Contudo, está claro que o estímulo mecânico na MEC de tendão e músculo esquelético inicia uma adaptação que tornará o tecido mais resistente ao dano, com a função de assegurar a eficiência da transmissão de força com a contração muscular (KJAER, 2004).

A interação entre a MEC e as células, induz a ativação da sinalização intracelular e o rearranjo do citoesqueleto (BANES *et al.*, 1999; BLOCH *et al.*, 2002; CARRAGHER *et al.*, 1999). Paralelamente, os PGs com suas cadeias de glicosaminoglicanos laterais são capazes de se ligar e apresentar fatores de

crescimento ao seus respectivos receptores. Além disso, a MEC pode também liberar fatores de crescimento sob estimulação mecânica (KJAER, 2004).

As integrinas parecem ser importantes para a mecanotransdução, pois são as maiores moléculas estruturais dos complexos de adesão na membrana celular que liga a MEC ao citoesqueleto (BURRIDGE & CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996; CHIQUET *et al.*, 1996). Essas moléculas estabelecem uma continuidade física, ao longo da qual, forças podem ser transmitidas de fora para dentro da célula e vice-versa (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2001). Acredita-se que as integrinas sejam os sensores da deformação de tensão na superfície celular (INGBER *et al.*, 1994), pois evidências mostram que tais moléculas são capazes de converter sinais mecânicos em respostas adaptativas na célula (CARSON & WEI, 2000; SHYY & CHIEN, 1997).

Diversos estudos têm demonstrado que a expressão de vários outros componentes da MEC também pode ser controlada pelo nível de carga mecânica atuante. Por exemplo, o colágeno tipo XII e a tenascina-C presentes em tendões e em outros tecidos conjuntivos como ligamentos, tem sua expressão e síntese aumentadas quando fibroblastos são alongados *in vitro*, e suprimidas em células que são deixadas em estado relaxado (CHIQUET, 1999; CHIQUET *et al.*, 2003).

1.4 Alterações nos tendões resultantes da imobilização e do alongamento

Assim como os tecidos biológicos reagem ao estresse mecânico imposto por forças externas ao corpo, modificando suas propriedades, a ausência de estresse também induz respostas nessas estruturas (MUELLER & MALUF, 2002). Tendões reagem à ausência de estresse alterando a composição e organização da matriz extracelular, tornando-os menos resistentes (TIPTON *et al.*, 1975). Adicionalmente, por estarem mais fracos e com capacidade diminuída de absorver

energia, a ruptura ocorre com uma força de menor intensidade (TIPTON *et al.*, 1975; AMIEL *et al.*, 1982).

Quando o tecido conjuntivo é submetido à imobilização, provavelmente não ocorra diminuição no número de fibras de colágeno (AKESON *et al.*, 1987). Geralmente há aumento da degradação e síntese do colágeno sem alteração na sua concentração (AKESON *et al.*, 1987; WOO *et al.*, 1975). Concomitantemente, há redução na quantidade de água e GAG, tornando o tecido menos elástico e mais quebradiço (ENGLES, 2001; WOO *et al.*, 1975). Estes efeitos, contudo não são irreversíveis, podendo ser reparados (COMPER & WAYNE, 1996).

Estudos sobre os efeitos de alongamento e também imobilização tem sido realizados em ratos, mas enfocando aspectos morfológicos das fibras musculares (GOMES *et al.*, 2004). Sobre tendões existem poucos estudos, analisando apenas propriedades viscoelásticas destes tecidos (KUBO *et al.*, 2002). Em nosso laboratório, trabalho em andamento (ALMEIDA *et al.*, 2006) tem mostrado que o alongamento nos membros posteriores de rato leva a um aumento da celularidade, da concentração de proteínas não colagênicas, colágeno e GAGs sulfatados, em comparação com os tendões não alongados.

1.5 Dicroísmo linear no estudo da organização da matriz extracelular

Possíveis alterações na organização de macromoléculas da matriz extracelular do tendão frente à imobilização e ao alongamento, podem ser detectadas através do uso da microscopia de polarização. Este tipo de microscopia permite a determinação estatística exata da ordem molecular e de variações nos estados de agregação molecular no tecido, através do estudo das anisotropias ópticas (birrefringência e dicroísmo).

O DL é a absorção seletiva da luz polarizada pelos grupos cromofóricos presentes em determinadas moléculas, dependendo da sua direção em relação ao azimute do vetor elétrico. Quando a luz polarizada incide sobre a região cromofórica da molécula, cujos elétrons estão vibrando em um plano que coincide com o azimute do vetor elétrico ocorre um máximo de absorção da luz polarizada (VIDAL, 1987).

Os materiais biológicos geralmente não possuem grupos cromofóricos que apresentem DL detectáveis em espectro visível, sendo necessário o uso de corantes dicróicos que ligando-se quimicamente ao material em estudo, provoquem um fenômeno extrínseco. Assim, o DL é um meio extremamente acurado para determinação de ordem molecular porque revela a orientação de vibrações dos elétrons ressonantes dos grupos cromofóricos (VIDAL, 1987).

De acordo com VIDAL & MELLO (2005), o colágeno pode ser considerado um biopolímero para o estudo de mudanças nas propriedades ópticas seguindo a ligação ordenada de corantes ácidos sulfonados como o Ponceau SS. Ainda segundo esses autores, este corante apresenta geometria bem definida (figura 2) e distribuição topográfica de grupos reativos ($-\text{SO}_3^-$) no naftaleno da extremidade aniônica da molécula, além da existência de dois grupos cromofóricos ($-\text{N}=\text{N}-$) que se alinham melhor do que numerosos grupos cromofóricos presentes em extensas moléculas de outros corantes, especialmente quando se ligam à substratos como o colágeno (VIDAL *et al.*, 1982). Por último, as moléculas do corante Ponceau SS apresentam ainda excelente planaridade que provavelmente as tornam termodinamicamente melhor na reação e ligação com substratos ordenados, como o colágeno (VIDAL & MELLO, 2005).

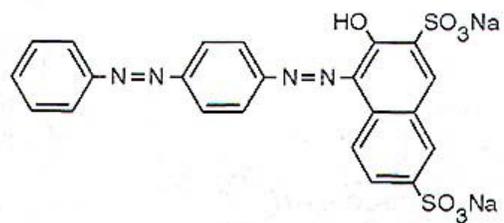


Figura 2: Fórmula estrutural da molécula de Ponceau SS.

A análise de DL pode ser feita em cortes corados com Azul de Toluidina (AT), colocando-se os cortes do tendão com o eixo mais longo nas posições paralela e perpendicular em relação à luz polarizada, com o objetivo de investigar a organização dos GAGs em relação aos feixes de colágeno nos diferentes grupos. Trata-se de um corante tiazínico (figura 3) com excelentes propriedades anisotrópicas, cujas propriedades ópticas têm sido exaustivamente estudadas por inúmeros autores (BERGERON & SINGER, 1958; LISON, 1960; TOEPFER, 1970).

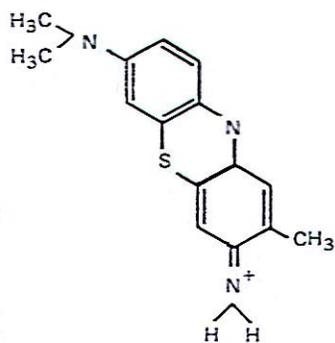


Figura 3: Fórmula estrutural da molécula de Azul de Toluidina.

Na MEC, a solução de AT pH 4.0 liga-se aos grupos aniônicos dos GAGs (LISON, 1960; MELLO & VIDAL, 1972; SILBERMAN & FROMER, 1973). Nos fibroblastos, o corante se liga aos grupamentos fosfatos livres dos ácidos nucleicos, como DNA e RNA por exemplo (VIDAL, 1987).

A ligação eletrostática de substratos aniônicos ao AT é caracterizada pelas reações de basofilia e metacromasia e obedece aos princípios atuais da química supramolecular (VIDAL, 1987). No caso do AT, a metacromasia é um efeito espectral caracterizado pelo abaixamento do pico original de absorção da luz, até muitas vezes o seu desaparecimento (hipocromismo), simultaneamente ao deslocamento dos maiores valores de absorbância para comprimentos de onda mais curtos (hipsocromismo). Uma das causas apontadas para a manifestação da metacromasia é a formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros por empilhamento das moléculas de corante (LISON, 1960), sendo que o AT apresenta empilhamento ordenado espontâneo ou induzido por um biopolímero ácido (VIDAL, 1963, 1977 e 1987).

O AT apresenta dicroísmo negativo porque o grupo quinonadiimina está orientado perpendicularmente aos GAGs e ao eixo principal das fibras, levando a uma maior extinção da luz quando o colágeno esta perpendicular ao plano de luz polarizada (VIDAL & MELLO, 1970). Estudos baseados nas propriedades anisotrópicas de fibras de colágeno mostraram que as cadeias de glicanas ácidas dos PGs se dispõem alinhadas e paralelas às fibrilas de colágeno e exibem estrutura helicoidal sob certas condições experimentais (VIDAL, 1963, 1964). Mais tarde foi proposto que o core protéico está posicionado inclinado em relação às fibrilas de colágeno e às cadeias de glicosaminoglicanos, com vários graus de arranjo helicoidal (VIDAL & MELLO, 1984). De acordo com ROMHANYI (1963), metacromasia e dicroísmo poderiam ser relacionados e explicados como uma deposição ordenada do corante ao substrato devido à agregação do corante.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a resposta do tendão em seus aspectos estruturais e bioquímicos frente a um procedimento de imobilização seguido de alongamento.

Objetivos específicos:

1. Analisar a morfologia de tendões imobilizados (grupo I), imobilizados e alongados (grupo IA), imobilizados e livres (grupo IL) e compará-los com os tendões controle (grupo controle I e grupo controle IA/IL).
2. Analisar possíveis alterações na organização da MEC dos tendões dos diferentes grupos experimentais.
3. Quantificar proteínas, glicosaminoglicanos sulfatados e hidroxiprolina dos 5 grupos estudados.
4. Analisar em gel de SDS-poliacrilamida, as populações de proteínas extraídas dos tendões dos 5 grupos experimentais.
5. Analisar em gel de agarose a presença dos glicosaminoglicanos heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato e de tendões somente imobilizados, assim como de tendões imobilizados e posteriormente alongados ou livres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKESON WH, AMIEL D, ABEL MF, GARFIN SR and WOO SL. Effects of immobilization on joints. **Clin Orthop**, 219: 28-37, 1987.

ALEXANDER RM. Energy-saving mechanisms in walking and running. **J Exp Biol**, 160: 55-69, 1991.

ALEXANDER RM & BENNET-CLARK HC. Storage of elastic strain energy in muscle and other tissues. **Nature**, 265: 114-117, 1977.

ALMEIDA FM *et al.*, 2006. Tese de mestrado da UNICAMP: Efeito do alongamento sobre o tendão calcâneo de ratos (manuscrito em preparação).

AMIEL D, WOO SL, HARWOOD FL and AKESON WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: A biochemical-biomechanical correlation. **Acta Orthop Scand**, 53(3): 325-32, 1982.

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

BAILEY AJ, SHELLSWELL GB and DUANCE VC. Identification and change of collagen types in differentiating myoblasts and developing chick muscle. **Nature**, 278: 67-69, 1979.

BALDOCK C, KOSTER AJ, ZIESE U, ROCK MJ, SHERRATT MJ, KADLER KE, SHUTTLEWORTH A and KIELTY CM. The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. **J Cell Biol**, 152: 1045-1056, 2001.

BANES A, WEINHOLD P, YANG X, TSUZAKI M, BYNUM D, BOTTLANG M and BROWN T. Gap junctions regulate responses of tendon cell ex vivo to mechanical loading. **Clin Orthop Rel Res**, 367: 356-370, 1999.

BERGERON J & SINGER M. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. **J biophys. biochem. Cytol**, 4: 433-457, 1958.

BLOCH RJ, CAPETANAKI Y, O'NEILL A, REED P, WILLIAMS MW, Resneck WG and Porter NJA. Costameres: repeating structures at the sarcolemma of skeletal muscle. **Clin Orthop**, 403: 203-210, 2002.

BURRIDGE K & CHRZANOWSKA-WODNICKA M. Focal adhesions, contractility and signaling. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 12: 463-518, 1996.

CARRAGHER NO, LEVKAU B, ROSS R and RAINES EW. Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlate with cleavage of pp125FAK, paxillin and talin. **J Cell Biol**, 147: 619-629, 1999.

CARSON JA & WEI L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. **J Appl Physiol**, 88: 337-343, 2000.

CARVALHO CMM. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Tese de Mestrado**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2001.

CARVALHO HF & VIDAL BC. Cell types and evidence for traumatic cell death in a pressure-bearing tendon of *Rana catesbeiana*. **Tissue Cell**, 26: 841-848, 1994.

CHICUREL ME, CHEN CS and INGBER DE. Cellular control lies in the balance of forces. **Curr Opin Cell Biol**, 10: 232-239, 1998.

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

CHIQUET M, MATTHISSON M, KOCH M, TANNHEIMER M and CHIQUET-EHRISMAN R. Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. **Biochem Cell Biol**, 74: 737-744, 1996.

CHIQUET M, RENEDO AS, HUBER F and FLÜCK M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? **Matrix Biol**, 22: 73-80, 2003.

COMPER I & WAYNE D. **Extracellular matrix, tissue function**. Amsterdam: Harwood Academic. v.1, 1996.

COOPER RR. Alterations during immobilization and regeneration of skeletal muscle in cats. **J Bone Joint Surg**, 54A: 919-925, 1972.

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

DeMAIO M, PAINE R and DREZ DJ. Achilles tendonitis-Sports **Med Rehabil Series**, 18: 195-204, 1995.

DERWIN KA, SOSLOWSKY LJ, KIMURA JH and PLAAS AH. Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structures in the mouse tail tendon fascicle. **J Orthop Res**, 19: 269-277, 2001.

ELLIOTT DH. Structure and function of mammalian tendon. **Biol Ver**, 40: 392-421, 1965.

ENGLES M. Tissue response. In: DONATELLI, R.A.; WOODEN, MJ. **Orthopaedic Physical Therapy**. Philadelphia: Churchill Livingstone. 3ed. cap.1 p.1-24, 2001.

ESQUISATTO MAM, JOAZEIRO PP, PIMENTEL ER and GOMES L. Ultrastructural characteristics of tensional regions in tendons from rats of different ages. **Braz J morphol Sci**, 20(2): 109-114, 2003.

EYRE DR, PAZ MA and GALLOP PM. Cross-linking in collagen and elastin. **Annu Rev Biochem**, 53: 717-748, 1984.

FANGER GR. Regulation of the MAPK family members: role of subcellular localization and architectural organization. **Histol Histopathol**, 14: 887-894, 1999.

FEITOSA VLC, ESQUISATTO MAM, JOAZEIRO PP, GOMES L, FELISBINO SL and PIMENTEL ER. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. **Cellular and Molecular Biology**, 48: online, OL359-367, 2002.

FRISCH SM, VUORI K, RUOSLAHTI E and CHAN HP. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. **J Cell Biol**, 134: 793-799, 1996.

GATHERCOLE LJ and KELLER A. Crimp morphology in the fibre-forming collagens. **Matrix**, 11: 214-234, 1991.

GELSE K, PÖSCHL E and AIGNER T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55: 1531-1546, 2003.

GOLDSCHMIDT ME, McLEOD KJ and TAYLOR WR. Integrin-mediated mechanotransduction in vascular smooth muscle cells: frequency and force response characteristics. **Circ Res**, 88: 674-680, 2001.

GOMES ARS, COUTINHO EL, FRANÇA CN, POLONIO J and SALVINI TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37: 1473-1480, 2004.

HAMILL OP & MARTINAC B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. **Physiol Rev**, Ver 81: 685-740, 2001.

HANSON AN & BENTLEY JP. Quantitation of type I and type III collagen ratios in small samples of human tendon, blood vessels and atherosclerotic plaque. **Anal Biochem**, 130: 32-40, 1983.

HAY ED. **Cell biology of extracellular matrix**. New York: Plenum. 2ed, 1991.

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

HESS GP, CAPPIELLO WL, POOLE RM and HUNTER SC. Prevention and treatment of overuse tendon injuries. **Sports Med**, 8: 371-384, 1989.

IHLEMANN J, PLOUG T, HELLSTEN Y and GALBO H. Effect of tension on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 277: E208-E214, 1999.

INGBER DE, DIKE L, HANSEN L, KARP S, LILEY H, MANIOTIS A, McNAMEE H, MOONEY D, PLOPPER G, SIMS J and WANG N. Cellular tensegrity: Exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration and tissue pattern during morphogenesis. **Int Rev Cytol**, 150: 173-224, 1994.

IOZZO RV & MURDOCH AD. Proteoglycans of the extracellular environment: Clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. **FASEB J**, 10: 598-614, 1996.

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

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

KANNUS P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports**, 10: 312-320, 2000.

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

KUBO K, HAMESHIKA H and FUKUNAGA T. Effects on transient muscle contractions and stretching on the tendon structure *in vivo*. **Acta Physiol Scand**, 175: 157-164, 2002.

KUIST M, JOZSA L, KANNUS P, VIENO T, JÄRVINEN M and LEHTO M. Structure and macromolecular composition of the myotendineal junction. Histochemical immunohistochemical and electron microscope study of the rat calcaneal muscle. **Acta Morphologica Hungarica**, 39(4): 287-297, 1991.

LAGERGREN & LINDHOLM A. Vascular distribution in the Achilles tendon: an angiographic and microangiographic study. **Acta Chir scand**, 116: 491-495, 1958-1959.

LEACH RE, JAMES S and WASILEWSKI S. Achilles tendonitis. **Am J Sports Med**, 9: 93-98, 1981.

LEMM M, BLAKE RL, COLSON JP and FERGUSON H. Achilles peritendinitis: a literature review with case report. **J Am Podiatr Méd Assoc**, 82(9): 482-90, 1992.

LESIC A & BUMBASIREVIC M. Disorders of the Achilles tendon. **Current Orthopaedics**, 18: 63-75, 2004.

LISON L. HISTOCHIMIE ET CYTOCHIMIE ANIMALES: Principes et Methodes. Gauthier-Villars. Paris. pp. 293-294; pp. 415-417; pp. 523, 1960.

LIU SH, YANG RS, SHAIKH R and LANE JM. Collagen in tendon, ligament and bone healing. **Clin Orthop Rel Res**, 318: 265-278, 1995.

MELLO MLS & VIDAL BC. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. **Ann. Histochem**, 18: 103-122, 1972.

MILZ S, MCNEILLY C, PUTZ R, RALPHS J and BENJAMIN M. Fibrocartilages in the extensor tendons of the interphalangeal joints of human toes. **Anat Rec**, 252: 264-270, 1998.

MUELLER MJ & MALUF KS. Tissue adaptation to physical stress: A proposed "Physical Stress Theory" to guide physical therapist practice, education and research. **Phys Ther**, 82(4): 383-403, 2002.

MULLER G, MICHEL A and ALTENBURG E. Comp (cartilage oligomeric matrix protein) is synthesized in ligament, tendon, meniscus, and cartilage. **Connect tissue Res**, 39: 233-244, 1998.

MYERSON MS & MANDELBAUM B. Disorders of the Achilles tendon and the retrocalcaneal region. In: Myerson MS, editor. **Foot and ankle disorders**. Philadelphia, London, Toronto, Sydney: WB Saunders. Co: 1367-1398, 2000.

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

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

RAMIREZ F & RIFKIN DB. Cell signalling events: a view from the matrix. **Matrix Biol**, 22: 101-107, 2003.

RIED W, HUANG J and BRYSON S. Diaphragm injury and myofibrillar structure induced by resistive loading. **J Appl Physiol**, 76: 176-184, 1994.

ROMHANYI G. Uber die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion. **Acta histochem**, (Jena) 15: 201-233, 1963.

ROUSLAHTI E. Stretching is good for a cell. **Science**, 276: 1345-1346, 1997.

SCHMIDT-ROHFLING B, GRAF J and SCHNEIDER U. The blood supply of the Achilles tendon. **Int Orthop**, 16: 29-31, 1992.

SCOTT JE. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. **J Anat**, 187: 259-269, 1995.

SCOTT JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. **Biochem J**, 252: 313-323, 1998.

SCOTT PG, NAKANO T and DODD CM. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. **Biochim Biophys Acta**, 1336: 254-262, 1997.

SELL DR & MONNIER VM. Aging of long-lived proteins: extracellular matrix (collagens, elastins and proteoglycans). **In: Handbook of Physiology Section 11: Aging** (Masoro EJ, ed). Oxford University Press: New York, 1106-1128, 1995.

SHADWICK RE. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. **J Appl Physiol**, 68: 1033-1040, 1990.

SHYY JYJ & CHIEN S. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. **Curr Opin Cell Biol**, 9: 707-713, 1997.

SILBERMANN M & FROMER J. Dynamic changes in acid mucopolysaccharides during mineralization of the mandibular condylar cartilage. **Histochemie**, 36: 185-192, 1973.

SMITH-MUNGO LI & KAGAN HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. **Matrix Biol**, 16: 387-398, 1997.

TIBBLES LA & WOODGETT JR. The stress-activated protein kinase pathways. **Cell Mol Life Sci**, 55: 1230-1254, 1999.

TIPTON CM, MATHES RD, MAYNARD JA and CAREU RA. The influence of physical activity in ligaments and tendons. **Med Sci Sports**, 7(3): 165-75, 1975.

TOEPFER K. Die thiazinfarbstoffe. Gustav Fischer-Verlag. Stuttgart, 1970.

TUITE DJ, RENSTRÖM PA and O'BRIEN M. The aging tendon. **Scand J Med Sci Sports**, 7: 72-77, 1997.

VIDAL BC. Crimp as part of a helice structure. **C R Acad Sci Paris, Sci la Vie/Life Sci**, 318: 173-178, 1995.

VIDAL BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron**, 34: 423-432, 2003.

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

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

VIDAL BC & MELLO MLS. Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye ponceau SS to collagen fibers. Published online 22 march, 2005.

VIDAL BC. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. **Protoplasma**, 56: 529-536, 1963.

VIDAL BC. The part played by the mucopolysaccharides in the from birefringence of the collagen. **Protoplasma**, 59: 472-479, 1964.

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

VIDAL BC. Métodos em Biologia Celular. In: Vidal BC e Mello MLS. Biologia Celular. Rio de Janeiro. Atheneu, 348 p. pp. 05-34, 1987.

VIDAL BC. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microespectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol Biol**, 22: 45-64, 1977.

VIDAL BC, MELLO MLS and PIMENTEL ER. Polarization microscopy and microspectrophotometry of sirius red, picro sirius and chlorantine fast red aggregates and their complexes with collagen. **Histochem J**, 14: 857-978, 1982.

VIDAL BC & MELLO MLS. Absorption spectral curves of dichroism on collagen bundles. **Histochemie**, 23: 176-179, 1970.

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

VOGEL KG & HEINEGARD D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. **J Biol Chem**, 260: 298-306, 1985.

VOGEL KG & MEYERS AB. Proteins in the tensile region of adult bovine deep flexor tendon. **Clin Orthop Relat Res**, 367: S344-S355, 1999.

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

WEINER AD & LIPSCOMB PR. Rupture of muscles and tendons. **Minn Med**, 39(11): 731-736, 1956.

WOO SL, MATTHEWS JV, AKESON WH, AMIEL D and CONVERY FR. Connective tissue response to immobility: Correlative study of biomechanical measurements of normal and immobilized rabbit knees. **Arthritis and Rheumatism**, 18(3): 257-64, 1975.

Artigo

EFEITO DA IMOBILIZAÇÃO SEGUIDA DE ALONGAMENTO SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS

ARO AA¹, VIDAL BC¹, TOMIOSSO TC¹, GOMES L¹, MATIELLO-ROSA S² e PIMENTEL ER¹

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, ²Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP

RESUMO

Músculos, tendões e ligamentos constituem a maioria das estruturas afetadas durante a realização de atividades desportivas, assim um melhor conhecimento sobre essas estruturas é de grande interesse para profissionais que tratam da reabilitação. Pouco se sabe sobre os efeitos do alongamento sobre aspectos bioquímicos e estruturais de tendões, quando usado como modalidade terapêutica após longo período de imobilização. No presente estudo, com o objetivo de avaliar a resposta do tecido frente a procedimentos de alongamento após imobilização, ratos wistar foram divididos em cinco grupos experimentais: controle do grupo Imobilizado (ratos não imobilizados), grupo Imobilizado (ratos imobilizados por 4 semanas), controle do grupo Imobilizado Alongado e Imobilizado Livre (ratos sem imobilização e alongamento), grupo Imobilizado e Alongado (imobilizados por 4 semanas e alongados durante 3 semanas) e grupo Imobilizado e Livre (imobilizados por 4 semanas e livres na gaiola por 3 semanas). Os tendões foram retirados e separados em regiões proximal (tensão) e distal (compressão) para serem analisados. Para as análises bioquímicas as regiões distal e proximal foram extraídas com cloreto de guanidina e os extratos analisados por SDS-PAGE, dosagem de proteínas não colagênicas e glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados. Para quantificação de hidroxiprolina os tendões foram hidrolisados em HCl. Para as análises morfológicas os cortes de tendões foram corados com Hematoxilina-

eosina (HE), Azul de Toluidina (AT) e Ponceau SS (PSS). A análise em SDS-PAGE não mostrou diferenças marcantes entre os grupos, mas uma banda de colágeno mais proeminente foi observada no grupo IL em relação ao IA e ao grupo controle na região de compressão. A dosagem de hidroxiprolina mostrou maior concentração no grupo I na região de compressão. Nenhuma diferença foi observada na região de tensão. Com relação à concentração de proteínas não colagênicas, foram detectadas diferenças apenas na região de tensão, com maiores concentrações no grupo I. Quando comparados os grupos IA e IL, valores mais altos foram encontrados no grupo IA. Foi observado presença abundante de GAGs sulfatados, especialmente de condroitim sulfato, na região de compressão do grupo IA. A presença de dermatam sulfato foi marcante nas regiões de compressão e tensão dos grupos I e IL. A análise em microscopia de polarização de cortes corados com PSS indicou maior desorganização dos feixes de colágeno no grupo I, com parcial recuperação após alongamento ou apenas remobilização. Uma revisão no procedimento de alongamento deveria ser considerada em experimentos futuros, considerando a duração e periodicidade das sessões, visando melhorar sua eficiência em casos de tendões previamente imobilizados.

Palavras-chave: imobilização, alongamento passivo, tendão calcâneo, matriz extracelular, rato.

1. INTRODUÇÃO

O tendão calcâneo transmite forças de tensão geradas pelos músculos sóleo e gastrocnêmio ao osso calcâneo, promovendo o movimento articular. É formado por um tecido conjuntivo denso modelado, constituído por uma abundante matriz extracelular (MEC) que consiste principalmente de fibras de colágeno tipo I altamente organizadas (BIRK *et al.*, 1996) e arrançadas em feixes (BIRK & IRELSTAD, 1986), proteoglicanos (PGs) e proteínas não colagênicas (PNC). Também estão presentes os colágenos tipo II, III, IV (AHTIKOSKI *et al.*, 2003; HANSON & BENTLEY, 1983), V e VI (JÓZSA *et al.*, 1991; VIIDIK, 1969). O arranjo estrutural das fibrilas de colágeno especialmente do tipo I, e a associação dessas fibrilas com outros elementos de matriz resultando na formação de fibras, refletem nas propriedades biomecânicas do tendão (BENEVIDES *et al.*, 2004).

As fibras de colágeno são estruturas resistentes à tensão, enquanto que os PGs, especialmente os de alto peso molecular, são responsáveis pela resistência às forças de compressão que atuam no tecido (SCOTT *et al.*, 1997). Além dos PGs de alto peso molecular, estão presentes na matriz interfibrilar os pequenos proteoglicanos como o fibromodulim e decorim (SCOTT, 1995) com o possível papel de regular o diâmetro das fibrilas de colágeno, além de outras funções (IOZZO & MUROCH, 1996). Esses PGs atuam na organização do tecido e agem na fibrilogênese do colágeno (SCOTT *et al.*, 1997; HEDBOM & HEINERGARD, 1989) durante o desenvolvimento (BIRK *et al.*, 1995) e na maturação de animais adultos (ROSENBERG *et al.*, 1985; OLDBERG *et al.*, 1989).

Os PGs podem se associar às proteínas fibrosas da matriz, como o colágeno, gerando estruturas supramoleculares (VIDAL & MELLO, 1984). O conteúdo de PGs pode variar de acordo com a força biomecânica atuante. É baixo em regiões onde o tendão está apenas sob forças de tensão, mas atinge valores altos em regiões

sujeitas às forças de compressão e fricção em adição às forças de tensão. Os glicosaminoglicanos (GAGs) promovem resistência osmótica à compressão devido a sua elevada carga negativa (GILLARD *et al.*, 1979; KOOB & VOGEL, 1987). Na região de compressão tem sido observada a presença de condroitin sulfato (CS) e de dermatan sulfato (DS), enquanto que apenas o DS está presente na região de tensão (VOGEL & KOOB, 1989; MERILEES & FLINT, 1980; BENEVIDES *et al.*, 2004; FEITOSA *et al.*, 2002; FEITOSA *et al.*, 2005).

Estudos morfológicos têm mostrado presença de fibroblastos com núcleos alongados especialmente na região de tensão, responsáveis pela intensa atividade na síntese de macromoléculas da matriz extracelular (O'BRIEN, 1997). A celularidade e a espessura dos feixes de fibra de colágeno variam de acordo com a idade, sendo que tendões de animais adultos têm feixes de colágeno mais compactos e menor número de células, enquanto que animais mais jovens apresentam grande celularidade e feixes de fibras mais finos (VIDAL & CARVALHO, 1990).

Apesar da ampla utilização de várias técnicas de alongamento no processo de reabilitação, a literatura é escassa com relação aos aspectos moleculares responsáveis pelo ganho de amplitude de movimento com o alongamento (AQUINO *et al.*, 2005). Sobre o efeito desse procedimento sobre o tendão, trabalho realizado recentemente (ALMEIDA *et al.*, 2006 – manuscrito em preparação) mostrou que há aumento dos diferentes componentes da MEC e aumento de resistência biomecânica do tecido após um programa de várias sessões de alongamento. É conhecido que o músculo responde a remobilização mais rapidamente que outras estruturas de tecido conjuntivo. A recuperação do músculo após um período de imobilização começa dentro de 3 a 5 dias após o início de um programa de exercícios, mas não se sabe se todos os efeitos lesivos de uma imobilização prolongada sobre os tecidos podem ser totalmente revertidos com

técnicas de remobilização (CARVALHO, 2001). Também não se conhece o efeito do alongamento sobre tendões previamente imobilizados.

Em geral, após a imobilização há perda de componentes básicos dos tecidos que podem repercutir negativamente em suas funções teciduais básicas (ENGLES, 2001). Essas alterações parecem ser mais facilmente revertidas no tecido muscular quando comparado com o tecido conjuntivo (COOPER, 1972). Sendo assim, o conhecimento das alterações estruturais e funcionais do tendão decorrentes do uso do alongamento como modalidade terapêutica após imobilização, poderia contribuir amplamente para o desenvolvimento de um protocolo para o tratamento de determinadas desordens tendíneas, em especial do tendão de Aquiles.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos wistar machos, adultos jovens, pesando em média 250 gramas. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, com livre acesso à água e ração.

2.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos, conforme protocolo utilizado no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, após adaptações (RENNER *et al.*, 2006).

Controle do grupo I (controle do grupo somente imobilizado): os animais ficaram livres na gaiola por 4 semanas, não sendo imobilizados nem alongados.

Grupo I (imobilizado e sacrificado): animais tiveram os músculos sóleos esquerdos imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas, e após este tempo foram imediatamente sacrificados.

Controle do grupo IA/IL (controle dos grupos imobilizado/alongando e imobilizado/livre): os animais ficaram livres na gaiola por 7 semanas, não sendo imobilizados nem alongados.

Grupo IL (imobilizado e livre): animais tiveram os músculos sóleos esquerdos imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas, e após este tempo ficaram livres nas gaiolas durante 3 semanas.

Grupo IA (imobilizado e alongado): animais tiveram os músculos sóleos esquerdos imobilizados em posição de encurtamento por 4 semanas, e após este

tempo foram alongados durante 30 s seguidos de 30 s de relaxamento, com 10 repetições, 3 vezes por semana, durante 3 semanas.

Ao todo foram utilizados 45 animais para bioquímica e 25 animais para morfologia.

2.3 Procedimentos para imobilização e alongamento

Os animais foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de Ketamina (70 mg/Kg) e Xylazina (10 mg/Kg). Para a imobilização do sóleo, a articulação tibiotársica foi imobilizada em flexão plantar máxima com o uso de fita adesiva e, em seguida, colocado um dispositivo de imobilização (órtese), para manter a flexão plantar máxima (figura 1). Este procedimento foi aplicado nos animais com 68 dias. O modelo de imobilização (COUTINHO *et al.*, 2002) após adaptações, foi mantido por 4 semanas.

Para o alongamento passivo, os animais foram previamente anestesiados como descrito acima. A articulação foi mantida em flexão dorsal máxima, durante 30 s intercalados com 30 s de relaxamento, por um período de 10 minutos, 3 vezes por semana, durante 3 semanas.

2.4 Análise bioquímica

2.4.1 Extração dos componentes da matriz extracelular do tendão

O tendão calcâneo foi separado nas regiões proximal, que recebe forças de tensão, e distal, que recebe compressão do calcâneo (figura 2). Os feixes de fibras foram devidamente dissociados em uma placa de petri mantida em torno de 4°C para diminuir o risco de proteólise. Após rápida lavagem em PBS (NaCl 0,15 M

em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 com EDTA 50 mM), o material foi seco com papel de filtro e pesado. Porção proximal do tendão foi extraído com 50 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4 M contendo 0,05 M EDTA, 1mM de PMSF em tampão Acetato 0,05M pH 5.8 (HEINEGARD & SOMMARIN, 1987). A extração foi durante 24 horas, com temperatura de 4° C em constante agitação. Após esse tempo, o material foi centrifugado em 20.000 r.p.m., durante 60 minutos, a 4° C em centrífuga Beckman J2-21 (Rotor JA-20). O sobrenadante contendo o material extraído em GuHCl, foi utilizado para análise bioquímica.

2.4.2 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

As proteínas extraídas foram analisadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Gradiente (4-16%) de poliacrilamida foi usado segundo o método de ZINGALES (1984), com algumas modificações. O sistema tampão foi de acordo com LAEMMILI (1970), com gel de empacotamento contendo 3,5 % de acrilamida. Amostras de 50 a 300 µl dos diferentes extratos foram precipitados em solução de 100 e 50 µl de tampão acetato de sódio 0,5 e 1 M pH 7,4 respectivamente, contendo 9 volumes de etanol, durante 24 horas à 4° C. As centrifugações foram realizadas em microcentrífuga Fischer Scientific Model 235 Va 8.000, a 9.000 r.p.m. por 5 minutos. O precipitado obtido foi seco em 37° C e ressuspendido em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, EDTA 1 mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01 %. As amostras foram incubadas por 5 minutos em 96 ° C. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1 % em pH 6,8. A corrente elétrica aplicada foi de 30 mA durante 4 horas. Para o padrão de colágeno, foi empregado o colágeno tipo I extraído de tendão de cauda de rato. Após a corrida o gel foi fixado em metanol 50 %, ácido acético 12 % durante 1 hora, e em seguida

corado por Coomassie Brilliant Blue-R (CBB-R-250) 0,25 %, 50 % de metanol e 7 % de ácido acético. O gel foi descorado utilizando uma solução contendo de metanol (50 %) e ácido acético (10%).

2.4.3 Eletroforese em gel de agarose (0.5-1.0%):

Os glicosaminoglicanos sulfatados (condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato) foram analisados em gel de agarose (0.5-1.0%) em tampão 0.05 M de propileno-diamino (PDA), conforme o método de DIETRICH & DIETRICH (1976). Para liberação das cadeias de GAGs da proteína central, as amostras das regiões de compressão e de tensão dos tendões extraídos em GuHCl foram precipitadas em etanol-acetato, incubadas durante 19 horas com 0,5 mL de NaOH 0,5 M à 4°C. Em seguida, as amostras foram precipitadas em álcool etílico absoluto, lavadas em etanol 80% e a seguir em acetona. A corrente elétrica aplicada foi de 0,1 mA durante 45 minutos. Para o padrão de glicosaminoglicanos sulfatados, foi empregada uma mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato (1mg/mL), fornecidos pela Sigma. Após a corrida, o gel foi fixado em cetavlon e em seguida corado por Azul de Toluidina. O gel foi descorado utilizando uma solução contendo etanol (50%) e ácido acético (1%). Para se ter certeza da identificação dos GAGs foi feita digestão com condroitinases B e AC (produzidas e gentilmente cedidas por Yara Michelacci).

2.4.4 Quantificação de hidroxiprolina

Fragmentos dos tendões foram hidrolisados em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 4 horas a 130°C. Foram utilizados 5 µL do material hidrolisado para cada leitura. A essa quantidade de amostra foi acrescentado 1 mL de cloramina T

(1,41 g de cloramina T, 10 mL de água, 10 mL de n-propanol e 80 mL de tampão pH 6,0). Após 20 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL de solução de aldeído perclórico (15 g de dimetilaminobenzaldeído, 60 mL de n-propanol, 26 mL de ácido perclórico a 60% e n-propanol para completar o volume para 100 mL). O material foi incubado por 15 minutos a 60°C e posteriormente resfriado. A leitura das amostras foi em 550 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences (STEGEMANN & STALDER, 1967).

2.4.5 Dosagem de proteínas não colagênicas

As dosagens de proteínas não colagênicas (PNC) foram realizadas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G 250. Como padrão foram empregadas diferentes soluções de albumina bovina (BSA), nas concentrações: 10; 20; 40; 80; 100; µg/ml. A leitura das amostras foi feita em 595 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences.

2.4.6 Dosagem de glicosaminoglicanos sulfatados

As dosagens de glicosaminoglicanos sulfatados dos extratos em GuHCl foram realizadas utilizando azul de dimetilmetileno blue (DMMB) (FARNDALE *et al.*, 1986). Para a curva padrão foram usadas diferentes concentrações de condroitim sulfato (1mg/mL) e a leitura foi feita em 525 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences.

2.4.7 Densitometria

A quantificação de heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato foi realizada pelo programa de densitometria Scion Image, a partir dos géis de agarose, contendo 5 µg de cada um dos glicosaminoglicanos padrões.

2.5 Análise morfológica

2.5.1 Processamento para análise estrutural em microscopia de luz

Após a dissecação, os tendões calcaneares foram fixados em solução de formol 4% em tampão Millonig pH 7,4 durante 24 h em temperatura ambiente. Em seguida as peças foram lavadas em tampão, desidratadas em banhos de álcool, seguido de diafanização com banhos de xilol e incluídas em parafina (Histosec). Foram realizados cortes longitudinais e seriados de 7 µm. Para uma visualização geral do tecido alguns cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (KIERNAM, 1981). Para observação dos feixes de colágeno, foi usada coloração por Ponceau SS (0,025 % em solução de ácido acético 2 %, durante 3 minutos, seguido de lavagem rápida em ácido acético 2% e em água) (VIDAL & VOLPE, 2005). Para detecção de proteoglicanos foi utilizada a coloração com Azul de Toluidina (0,025 % em tampão Mc Ilvaine pH 4.0). As lâminas foram deixadas no corante por 30 minutos, lavadas no próprio tampão, colocadas para secar ao ar. Em seguida, foram mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá. As observações e documentação foram feitas em microscópio Olympus BX 60 equipado com câmera fotográfica.

2.5.2 Medidas de dicroísmo linear (DL)

Para as observações de dicroísmo linear, os cortes com seus eixos mais longos foram posicionados paralelamente e perpendicularmente ao plano de luz polarizada (PLP). Para a determinação do índice dicroico (DR) dos cortes corados com Ponceau SS, foi feita a razão das absorbâncias dos feixes de colágeno em posições paralela (A_{pa}) e perpendicular (A_{pe}) em relação ao PLP (VIDAL E MELLO, 2005).

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa Minitab 12, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os grupos experimentais foram pesados semanalmente a partir do 47º dia de idade e apresentaram variação de peso. Como mostra a figura 3, todos os grupos imobilizados perderam peso durante o período de imobilização. Os animais dos grupos IL e IA voltaram a engordar apenas a partir do período de remobilização, mas não atingiram o peso médio normal quando comparados com o grupo controle.

Para os estudos bioquímicos, os tendões de todos os grupos foram separados em regiões de compressão e de tensão, sendo estudados separadamente. As proteínas extraídas foram primeiramente analisadas em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. As observações dos géis das regiões de compressão e tensão dos diferentes grupos experimentais mostraram poucas diferenças (figuras 4 e 5). No grupo I, tanto na região de compressão como na de tensão, a presença de colágeno parecia menos marcante do que seu respectivo controle. Já no caso do grupo IL, as cadeias α de colágeno eram mais proeminentes do que no IA e no controle.

Comparando as regiões de compressão e tensão, observou-se uma presença mais marcante de colágeno na região de tensão do que na região de compressão. O contrário foi observado com relação à proteína de 60 kDa, possivelmente o pequeno proteoglicano fibromodulim, cuja presença foi mais proeminente na região de compressão. Analisando os géis em condições redutoras (figura 5) e não redutoras (figura 4), não foi detectada proteína oligomérica, todavia é interessante notar que as proteínas de 60 kDa e 49 kDa tem mobilidade alterada em presença de β -mercaptoetanol. Vale notar também que as proteínas de 35 kDa, 32 kDa, 18 kDa e 17 kDa, são mais proeminentes na região de compressão, independente dos grupos, do que na região de tensão (figura 4).

A análise dos resultados da dosagem de hidroxiprolina (figura 6), a qual é um indicador da concentração de colágeno no tecido, mostrou que a região de compressão do grupo I apresentou maior concentração de hidroxiprolina quando comparado a todos os outros grupos, mesmo tendo passado por quatro semanas de inatividade física devido à imobilização. Ao passo que o grupo IA teve a menor concentração, com valor inferior ao do grupo IL. Ambos os grupos IA e IL não se equipararam ao seu respectivo controle, devido a um provável aumento do metabolismo de colágeno. Vale ressaltar ainda que, animais mais jovens (14 semanas) representados pelo grupo controle I, obtiveram concentração de hidroxiprolina menor em relação ao grupo controle IA/IL (17 semanas).

A dosagem de hidroxiprolina da região de tensão dos tendões dos diferentes grupos experimentais não mostrou valores significativamente diferentes (gráfico não mostrado).

Na dosagem de proteínas não colagênicas (figura 7), de modo geral observou-se maiores concentrações na região de tensão em relação à região de compressão dos tendões. Não foram observadas diferenças significativas na região de compressão quando comparados todos os grupos (gráfico não mostrado). Na análise da região de tensão, observou-se que o grupo I apresentou elevada concentração de proteínas não colagênicas, superior a todos os outros grupos. Ao passo que o grupo IL apresentou menor concentração nesta região, com valor inferior ao grupo IA.

A dosagem de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados mostrou que esses componentes são abundantes especificamente na região de compressão (figura 8). Considerando esta região, foi observada uma quantidade significativamente maior no grupo IA. Apesar do grupo IL ter apresentado valor próximo ao do grupo IA, este não foi significativo.

Quanto à região de tensão, valores próximos entre os grupos IA e IL foram mais uma vez observados, mas ambos superiores em relação ao seu controle.

A análise dos géis de agarose (figura 9) mostrou a presença marcante do dermatam sulfato (DS) nas regiões de compressão e tensão de todos os grupos. Ao passo que o condroitim sulfato (CS) foi observado apenas na região de compressão dos grupos, representado por bandas menos intensas quando comparado ao DS. Os animais mais jovens, como no grupo controle imobilizado (contr I) e imobilizado (I), apresentaram bandas correspondentes ao heparam sulfato (HS) na região de tensão. Tal observação pode indicar uma relação entre idade e presença de HS, independente da ação de forças mecânicas atuantes no tendão.

A análise da densitometria dos géis de agarose permitiu verificar a variação na quantidade de dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS) entre os grupos. Surpreendentemente, foi encontrado mais DS no grupo I na região de compressão e tensão (figura 10), sendo superior às respectivas regiões de compressão e tensão do grupo IA. O CS foi observado em maior quantidade na região de compressão do grupo IA (figura 11).

Para as análises morfológicas foram utilizadas colorações distintas tais como hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina (AT) e ponceau SS (PSS) para as análises morfológicas dos tendões dos diferentes grupos.

Os cortes dos tendões corados com HE (figura 12) apresentaram-se igualmente corados, com exceção da região de compressão do grupo IA, que obteve uma coloração bem menos intensa pela eosina. Observou-se uma grande quantidade de células arredondadas e enfileiradas na região de inserção do grupo I, apesar da inatividade física durante o período de imobilização. Foi característico da região de tensão a presença de células alongadas entre os feixes de colágeno, sendo estes mais espaçados no grupo I sugerindo desorganização do tecido.

Na coloração com AT analisada ao microscópio ótico comum, foram observadas a presença e variação de metacromasia nas diferentes regiões dos tendões, bem como do aspecto nuclear das células. De modo geral foram constatadas diferenças entre todos os grupos nas diferentes regiões.

Na inserção, com exceção do grupo I, foi observada metacromasia na matriz territorial de todos grupos, sendo mais intensa no grupo IA. Como pode ser visto na figura 13, o grupo I apresentou células enfileiradas com ausência de metacromasia na região de inserção, ao passo que foi observado material metacromático no citoplasma das células e na matriz territorial do seu controle. No grupo IA, as células observadas nesta região se destacaram por serem maiores e com cromatina aparentemente menos condensada, além de intensa metacromasia no citoplasma e na região territorial das células, enquanto que no grupo IL, a organização das células se destacou pela presença de grupos de células enfileiradas e menores, mas também com intensa metacromasia citoplasmática e na região territorial. Este resultado aponta para uma maior síntese de PGs na região de inserção do grupo IA e IL, em relação aos outros grupos.

Na região de compressão, todos grupos apresentaram uma organização típica de fibrocartilagem, com células semelhantes a condrócitos e MEC mais corada pelo AT em relação à região de tensão. Pouca diferença foi encontrada nesta região para o grupo I, mas para o grupo IA foi notório o acúmulo de material metacromático na matriz territorial, sugerindo aumento de síntese de PGs. Este aspecto também foi observado no grupo IL, mas menos intenso do que no grupo IA. Quanto à organização celular nesta região, vale ressaltar a presença de uma camada de células dispostas na periferia da região de fibrocartilagem do grupo IA, com intensa metacromasia territorial. Enquanto que no centro desta região, foram observadas células com cromatina descondensada e ausência de material metacromático extracelular (figura 13).

Com relação à região de tensão, todos os grupos apresentaram a MEC fracamente corada pelo AT e fibroblastos bem alongados. Aparentemente, uma maior quantidade dessas células pode ser vista no grupo IA e IL.

A observação dos cortes da região de inserção corados com AT e observados ao microscópio de luz polarizada mostrou forte dicróismo linear (DL) no grupo IA, como pode ser visto na figura 14. Resultado semelhante foi encontrado no seu respectivo controle, porém o dicróismo nesse último parece menos intenso do que no grupo IA. Foi notória a ausência de DL do grupo I quando comparado ao seu controle. Aparentemente, não foram encontradas diferenças nesta região entre os demais grupos. Quanto à região de tensão, também não foram observadas diferenças entre os animais (prancha não mostrada).

Para os cortes corados com PSS foram feitas medidas de dicróismo linear, para se detectar possíveis mudanças no grau de orientação das moléculas de colágeno nos diferentes grupos experimentais. A escolha do corante PSS foi baseada em estudos anteriores onde foi mostrado que este corante juntamente com as fibrilas de colágeno, formavam um complexo altamente dicróico (VIDAL & MELLO, 2005). Como mostra a tabela 1, foram calculados os índices dicróicos ($DR = A_{pa}/A_{pe}$) de cada grupo, obtidos pela razão entre a absorvância medida nos cortes na posição paralela e perpendicular em relação ao polarizador. Não foram feitas fotos de todos os grupos corados com PSS, pelo fato das diferenças não serem perceptíveis apenas por análises das imagens, mas sim por medidas de DL de todos os grupos para que as possíveis diferenças fossem detectadas.

A análise dos resultados descritos na tabela 1 mostrou que o grupo I apresentou menor índice dicróico quando comparado ao seu controle. Foram observadas fendas entre os feixes de colágeno (figura 15) nos tendões dos animais deste grupo, sugerindo um desarranjo das moléculas de colágeno. Quanto aos grupos IA e IL, ambos também obtiveram índices dicróicos inferiores ao seu

respectivo controle. Entretanto, embora o grupo IL tenha apresentado DR menor que o controle, apresentou valor superior ao grupo IA. Este resultado sugere que a simples remobilização foi capaz de promover uma organização maior do colágeno, embora sem atingir valor obtido em um tendão de animal controle.

4. DISCUSSÃO

Em contraste com a visão clássica que definia a matriz extracelular como um tecido estático e inerte, vários estudos têm mostrado que o tecido conjuntivo dos tendões é uma estrutura dinâmica, capaz de se adaptar às diferentes demandas funcionais às quais o sistema músculo-esquelético está sujeito, alterando suas propriedades estruturais e mecânicas (BANES *et al.*, 1999; D'SOUZA & PATEL, 1999; LANGBERG *et al.*, 1999, VILARTA & VIDAL, 1989). Neste aspecto, nosso estudo se propôs a identificar as alterações bioquímicas e estruturais decorrentes da imobilização do músculo sóleo na posição encurtada, seguida do alongamento passivo aplicado por um período de três semanas sobre o tendão calcâneo de ratos.

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida indicou a presença mais marcante de colágeno em todos os grupos da região de tensão em relação à região de compressão. Isto se deve ao fato de que esta região está sujeita a altas forças de tensão e por isso é requerida grande quantidade de colágeno I, organizada em feixes de fibras dispostos apenas em uma direção. A análise da eletroforese também mostrou que uma proteína de 60 kDa tem uma presença expressiva na região de compressão de todos os grupos, mas é pouco visível na região de tensão. O comportamento eletroforético dessa proteína, em condições redutoras e não redutoras sugere tratar-se do fibromodulim, um pequeno proteoglicano importante na fibrilogênese (HEINEGARD & SOMMARIN, 1987) e que interage com colágeno (VIOLA *et al.*, 2007).

De acordo com os dados obtidos na dosagem de hidroxiprolina, foram observadas diferenças significativas na concentração da região de compressão dos diferentes grupos. Foi notável o valor superior obtido no grupo I em relação a todos os outros grupos, apesar da inatividade física da pata esquerda inferior

durante o período de imobilização. Na região de tensão não foram encontradas diferenças na concentração de hidroxiprolina dos diferentes grupos, a exemplo do que já foi constatado por outros autores (AKESON *et al.*, 1973; SAVOLAINEN *et al.*, 1988).

A mais alta concentração de hidroxiprolina observada na região de compressão do grupo I pode estar relacionada a um aumento da quantidade de colágeno, possivelmente do tipo III, que possui uma maior quantidade de hidroxiprolina. Hidroxiprolina de colágeno degradado, mas ainda não eliminado pode fazer parte da concentração total obtida no grupo I. A degradação de colágeno I pode ser a razão da banda menos intensa observada em SDS-PAGE do grupo I. Assim, nossos resultados sugerem que a imobilização alterou o “turnover” de colágeno, com aumento da degradação de colágeno I. KJAER *et al.* (2005), constatou que a imobilização induz a um aumento na expressão de MMPs (metaloproteases) em suas formas ativa e inativa, levando a um colapso acelerado das fibras de colágeno. KANNUS *et al.* (1992) observou uma significativa perda de tecido colagenoso na junção miotendínea (MTJ) de ratos após uma semana de imobilização, embora tenha constatado por meio de análises imunohistoquímicas, aumento na quantidade de colágeno III. Também ocorre aumento de colágeno III na MTJ de tendões de humanos após imobilização (JÓZSA *et al.*, 1992).

De acordo com dados da literatura, é conflitante a observação de aumento da quantidade de colágeno durante a imobilização. Estudos têm mostrado que a imobilização de membro inferior de rato induz a diminuição da expressão e síntese de colágeno no músculo (AHTIKOSKI *et al.*, 2003). Também tem sido constatada uma diminuição na atividade de enzimas que participam da biossíntese do colágeno em tendões (SAVOLAINEN *et al.*, 1988) e músculos, mas sem alteração no conteúdo de colágeno neste último (AHTIKOSKI *et al.*, 2001). Em tendões e

ligamentos, a imobilização leva a uma perda da massa de colágeno (AMIEL *et al.*, 1982).

Foram ainda observadas diferenças significativas na dosagem de hidroxiprolina da região de compressão dos grupos IA e IL, sendo que ambos apresentaram valores inferiores ao do controle. Nossos dados sugerem que com a simples remobilização, a concentração de hidroxiprolina observada possivelmente se deve ao restabelecimento da compressão exercida pelo calcâneo sobre o tendão e conseqüente indução de processos de síntese e degradação simultaneamente. Estudos têm mostrado que o exercício acelera a formação e degradação de tecido conjuntivo em músculos e tendões, levando à adaptação fisiológica e de reparo de danos de estruturas da MEC (KOVANEN, 1989; KOSKINEN *et al.*, 2000; LANGBERG *et al.*, 1999). Possivelmente, pelo fato da remobilização exercer um estímulo mecânico constante sem sobrecarregar o tendão, acabou atuando na remodelação da MEC mantendo o equilíbrio entre as MMPs, presentes na sua maior parte na forma latente no tecido (WOESSNER, 1991; NAGASE & WOESSNER, 1999), e TIMPs (inibidoras teciduais de MMPs), mas sem atingir valores normais. As MMPs-2 tem sua regulação aumentada após uma sessão simples de exercícios, sugerindo um aumento na degradação do colágeno. Curiosamente, as TIMPs são freqüentemente ativadas concomitantemente com as MMPs em resposta a atividade física (KOSKINEN *et al.*, 2000), indicando uma ativação simultânea de estímulo e inibição da degradação, para adaptação do tecido à carga mecânica atuante.

Um dado interessante foi o fato de que o grupo IL exibiu maior concentração de hidroxiprolina em relação ao IA, apontando para adaptações composicionais distintas do tendão dependendo do tipo de estímulo mecânico aplicado. O alongamento parece ter sido menos efetivo do que a simples remobilização, no restabelecimento do conteúdo de colágeno. O procedimento de alongamento

utilizado, três vezes por semana, pode ter levado a uma sobrecarga mecânica e conseqüente diminuição na quantidade de colágeno, a exemplo do que ocorre em equinos submetidos a alto estresse (PARRY *et al.*, 1978). É possível que MMPs, cuja expressão é mais acentuada durante o alongamento mecânico (ARCHAMBAULT *et al.*, 2002 a, b), sejam responsáveis pela menor concentração de colágeno no grupo IA. Possivelmente, a tensão causada durante as sessões de alongamento sobre o tendão, que de acordo com os nossos resultados apresentava-se estruturalmente comprometido devido à imobilização, aumentou a expressão de MMPs e conseqüentemente, a degradação de colágeno tipo I, como já sugerido por LANGBERG *et al.* (2001).

De acordo com dados da literatura, algumas mudanças nas células do tendão, fibras de colágeno e outros componentes da MEC associados com a resposta à carga excessiva têm recentemente sido documentada. De acordo com KUBO *et al.* (2002), a rigidez do tendão decresce significativamente após o alongamento estático por 5 minutos, sendo desconhecido o mecanismo pelo qual isso ocorre. ZAMORA & MARINI (1988) observaram rompimento dos feixes de colágeno e espaços vazios longitudinais entre os mesmos. Eles sugeriram que neste caso, o tendão foi submetido a um processo similar ao de hipertrofia muscular, mas que no caso do remodelamento da arquitetura do tendão, deve envolver um período transitório de debilidade mecânica do tecido.

Os dados obtidos com a dosagem de hidroxiprolina apontam para a pouca eficiência do alongamento na reconstituição do conteúdo colagênico da MEC da região de compressão. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas na dosagem de hidroxiprolina da região de tensão dos grupos, a análise das medidas de DL sugere que o alongamento contribuiu com a recuperação parcial da organização molecular do tendão nesta região. Foram

detectados diferentes DR entre os grupos, sugerindo importantes alterações na organização das fibras de colágeno durante a imobilização e o alongamento.

A análise do DL em cortes do grupo I corados com PSS e medidos através da microscopia de polarização, mostrou uma maior desorganização dos feixes de colágeno, indicada pelo baixo DR. Foram observadas fendas entre as fibras de colágeno após o período de imobilização. Este dado está de acordo com o estudo de JÓZSA (1984), que além da presença de fendas longitudinais, também constatou que as fibras de colágeno se tornam mais finas, desorientadas e com angulações anormais após imobilização.

O grupo IA obteve DR superior ao grupo I, sugerindo efetividade do alongamento na reorganização dos feixes de colágeno após a desestruturação tecidual causada pela imobilização observada em nosso estudo. De acordo com KELLETT (1986), após a fase inflamatória, o alongamento controlado de tendões que passaram por processo de reparo tende a acelerar a síntese de colágeno, de neoformação de fibrilas e alinhamento adequado das fibras, aumentando desta forma sua resistência à tensão. Segundo KJAER *et al.* (2005), o alongamento é capaz de impedir parcialmente o colapso acelerado dos feixes de colágeno após imobilização. Assim, nossos resultados apontam para um restabelecimento parcial da organização estrutural do tendão, indicado pelo menor DR do grupo IA em relação ao seu controle. Possivelmente, o período de alongamento utilizado no experimento não tenha sido suficiente para o reparo total.

Os animais do grupo IL submetidos apenas a remobilização apresentaram DR mais alto do que o grupo I, embora também inferior ao controle. O resultado sugere um restabelecimento da organização tecidual superior em relação ao grupo IA, devido ao maior alinhamento das moléculas de colágeno indicado pelo DR mais alto. Possivelmente, o estímulo mecânico da remobilização tenha favorecido a formação de “crosslink” entre as fibrilas de colágeno, contribuindo com a

organização da matriz colagênica. Esses resultados estão de acordo com o estudo de KARPAKKA *et al.* (1990), que constatou que a remobilização de tendões de ratos resulta em uma aceleração da síntese de colágeno e, especialmente, da Lisil-oxidase, que gera allisina e conseqüente formação de “crosslink” entre as fibrilas de colágeno.

Com relação à dosagem de proteínas não colagênicas (PCNs), não houve diferença significativa na região de compressão entre todos os grupos estudados. Já na região de tensão foi observada diferença entre os grupos, sendo que o grupo I apresentou maior concentração em relação ao seu controle, provavelmente devido a uma maior expressão de PNCs, como as MMPs por exemplo, sugeridas em nosso estudo devido à desorganização estrutural do tecido observada durante a imobilização. Já o grupo IA que passou por imobilização e alongamento, não apresentou diferença na concentração de PNCs em relação ao controle, devido à atividade de alongamento, que removeu proteínas, supostamente metaloproteases, que estão presentes durante a imobilização.

As presenças de CS na região de compressão e DS na região de tensão e compressão dos grupos analisados em nosso estudo estão de acordo com outros trabalhos (VOGEL & KOOB, 1989; VOGEL & HEINEGARD, 1985; COVIZI *et al.*, 2001; FEITOSA *et al.*, 2005). Os dados discrepantes obtidos com relação à quantificação do DS, não nos permitem relacioná-los com as atividades biomecânicas ocorridas em cada grupo, todavia, merece atenção a maior quantidade de DS observada no grupo I. No entanto, se a presença de DS, que provém de decorim, está relacionada com uma tentativa do tecido em controlar a fibrilogênese de colágeno durante a imobilização, ainda precisa ser confirmada. Com relação ao CS, sua presença mais expressiva no grupo IA se deve às forças compressivas do calcâneo sobre o tendão, que ocorrem durante os procedimentos

de alongamento. Esse resultado está de acordo com a alta metacromasia observada nos cortes corados com AT.

O alto DL observado em cortes corados com AT da região de inserção do grupo IA, confirmam que as cadeias de GAGs estão posicionadas paralelamente ao longo dos feixes de colágeno de forma ordenada, como já verificado por VIDAL & MELLO (1984) e constatado também em tendão de porco (FEITOSA *et al.*, 2002).

Outro dado interessante observado em nosso estudo, foi o aumento de GAGs na região de tensão de todos os grupos em relação aos seus respectivos controles, inclusive no grupo I, sugerindo que há produção de GAGs mesmo com a imobilização. Este resultado difere do encontrado em junção miotendínea de ratos após imobilização, onde houve decréscimo na quantidade de GAGs sulfatados (KANNUS *et al.*, 1992), e em tendões humanos após imobilização (JÓZSA *et al.* 1992). O aumento da tensão exercida tanto pelo alongamento como pela simples remobilização, devem ter contribuído para a aumento do conteúdo de GAGs sulfatados totais após um longo período de imobilização.

A análise dos cortes corados com AT e observados ao MOC (microscópio ótico comum) mostrou que, com exceção do grupo I, foi marcante a metacromasia nas regiões de inserção osteotendínea e de compressão dos tendões dos diferentes grupos. Provavelmente, a imobilização e conseqüente ausência de compressão do calcâneo no tendão, levou à diminuição na síntese de PGs nos tendões do grupo I indicada pela matriz fracamente corada na região de inserção osteotendínea. De acordo com alguns estudos, as células sob forças de compressão induzem ao desenvolvimento de uma estrutura de fibrocartilagem (VOGEL & KOOB, 1989; BENJAMIN & EVANS, 1990; BENJAMIN & RALPHS, 1998), cuja manutenção e diferenciação são parcialmente dependentes do estímulo mecânico (GILLARD *et al.*, 1979; VOGEL & KOOB, 1989).

A intensa metacromasia observada principalmente na região de inserção e compressão do grupo IA, sugere presença de PGs devido ao estímulo mecânico provocado pela flexão dorsal máxima durante o alongamento, que gera forças de compressão do calcâneo sobre o tendão. Embora o grupo IL também tenha apresentado metacromasia sugerindo maiores quantidades de PGs, esta foi menos intensa em relação ao grupo IA. Isso é perfeitamente cabível visto que no alongamento ocorrem atividades compressivas intensas e direcionadas, enquanto que nos animais mantidos com movimento livre após a imobilização, o estímulo compressivo não é tão intenso e com a regularidade do alongamento.

Os aspectos organizacionais do tendão podem ser resultantes do metabolismo dos componentes da sua matriz, frente às forças mecânicas atuantes. Assim, os resultados observados em nosso estudo sugerem que o alongamento, de um modo geral, foi menos efetivo do que apenas a remobilização. Possivelmente, variações na duração das sessões de alongamento ou na amplitude articular poderiam tornar essa prática mais eficiente após períodos de imobilização. Deve-se considerar ainda que, um período maior entre o término das sessões de alongamento e o início das análises morfológicas e bioquímicas, poderia contribuir para a constatação de uma melhor recuperação tecidual, devido possivelmente, ao restabelecimento metabólico normal da matriz extracelular alcançada após adaptação à força de tensão exercida pelo alongamento.

5. CONCLUSÃO

1. O efeito da imobilização e do alongamento é diferente nas regiões de compressão e tensão de um mesmo tendão.
2. Na região de compressão observou-se uma maior concentração de hidroxiprolina no tendão imobilizado do que no tendão controle. O contrário é observado nos tendões imobilizados/alongados e imobilizados/livres, que apresentaram menor concentração de hidroxiprolina.
3. Uma maior concentração de proteínas não colagênicas é encontrada na região de tensão de tendões imobilizados, o contrário é observado em tendões de animais que passaram por remobilização. Já a remobilização associada ao alongamento restabelece a concentração normal dessas proteínas no tecido.
4. Na região de compressão a concentração de GAGs é maior nos tendões de animais que tem vida livre ou são alongados após imobilização.
5. A quantidade de DS é mais proeminente em tendões (compressão e tensão) imobilizados e imobilizados/livres. Já o CS foi mais marcante em tendões que receberam alongamento após a imobilização.
6. A metacromasia mais intensa na região de compressão de tendões de animais que tiveram alongamento ou vida livre após imobilização, demonstra a importância do exercício na produção de GAGs.
7. A imobilização do tendão leva a um desarranjo nos feixes de fibras de colágeno.
8. A remobilização e/ou alongamento nos tempos experimentais adotados, permite o restabelecimento embora não completo, da organização da matriz extracelular.
9. Nossos resultados apontam para uma maior eficácia da remobilização sobre o alongamento, com relação aos aspectos organizacionais e composicionais da MEC de tendões previamente imobilizados. Uma modificação nos protocolos de

alongamento, quanto à frequência e tempo das sessões, deverá ser considerada em experimentos futuros.

FIGURAS



Figura 1: Para a imobilização do sóleo, a articulação tibiotársica foi imobilizada em flexão plantar máxima com o uso de fita adesiva (observe detalhe na figura ao lado). Em seguida, foi colocado um modelo de imobilização (órtese), para manter a flexão plantar máxima e a pata imobilizada. A órtese foi mantida por 4 semanas.

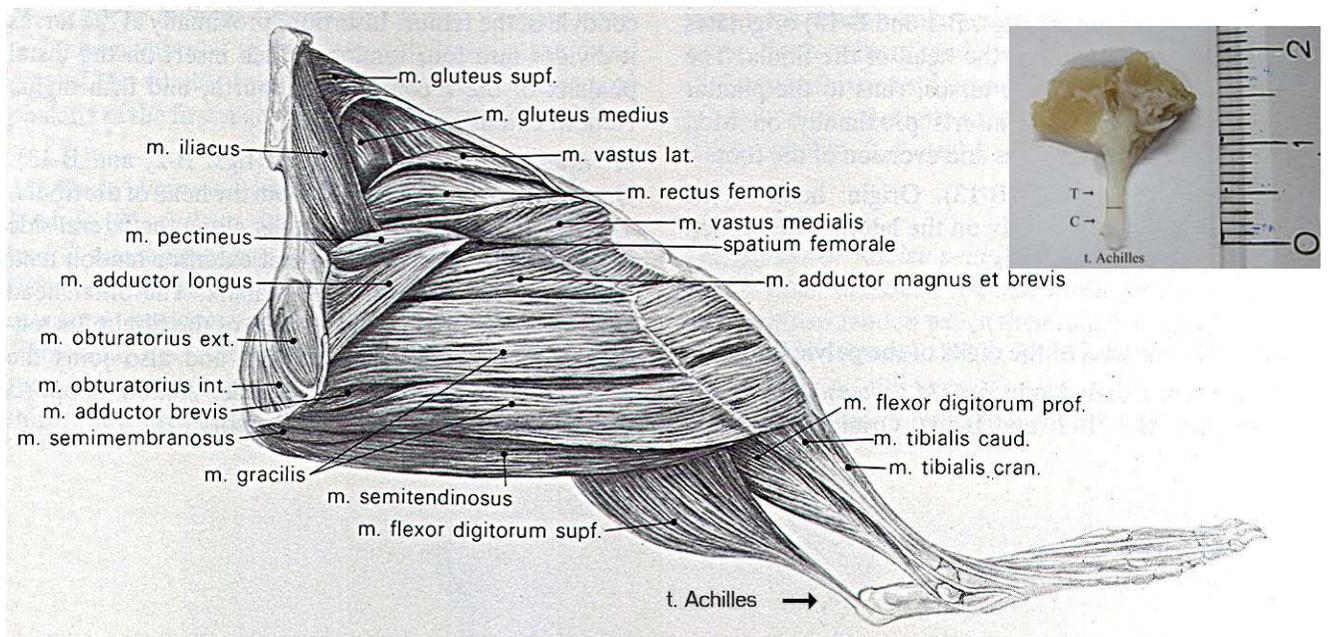


Figura 2: Tendão de Achilles de rato (modificado de HEBEL & MELVIN, 1986). Observe no detalhe da figura ao lado, as regiões sujeitas às forças de compressão (C) e tensão (T) do tendão de Achilles de rato.

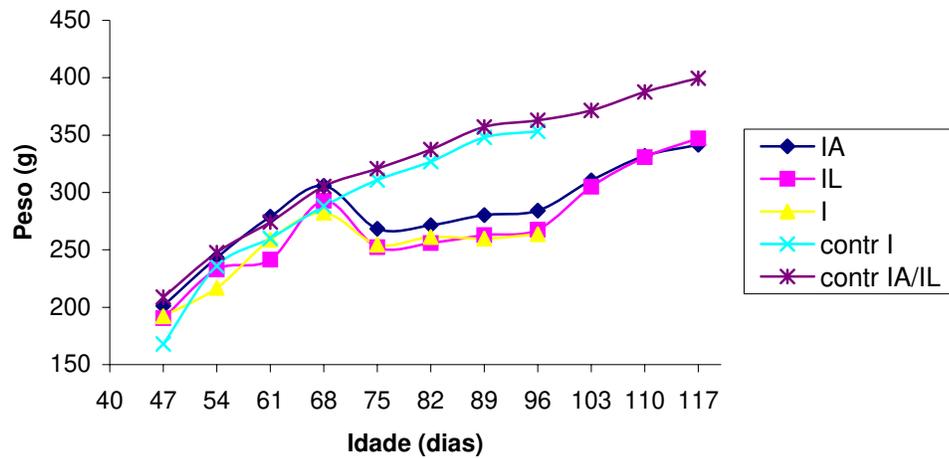


Figura 3: Representação da variação do peso (g) dos animais dos grupos CI (controle do grupo imobilizado), C IL/IA (controle do grupo imobilizado/livre e imobilizado/alongado), IA (grupo imobilizado/alongado), IL (grupo imobilizado/livre) e grupo imobilizado (I), em relação ao período de imobilização. Observe o início da imobilização dos animais com 68 dias e o término, aos 96 dias.

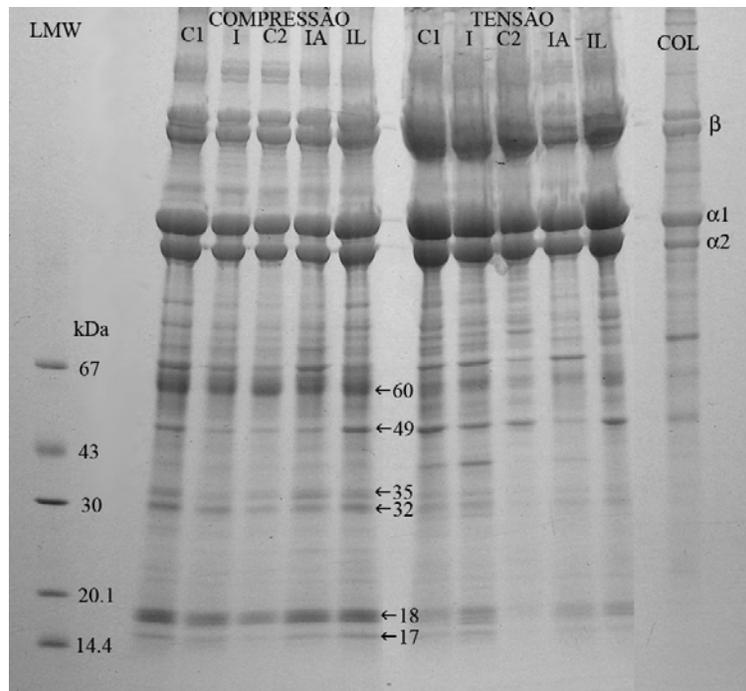


Figura 4: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida sem β -mercaptoetanol. Na coluna da esquerda estão os padrões de peso molecular (LMW) e à direita, o padrão de colágeno (cadeias α_1 , α_2 e β). C1 (controle do grupo I), I (grupo imobilizado), C2 (controle do grupo IA/IL), IL (grupo imobilizado e livre), IA (grupo imobilizado e alongado). Observe as cadeias α de colágeno menos intensas no grupo I nas regiões de compressão e tensão. Note que, o grupo IL apresentou cadeias α de colágeno mais proeminentes do que os grupo IA e C2. Observe ainda a presença mais marcante das proteínas de 60, 35, 32, 18 e 17 kDa na região de compressão de todos os grupos, sendo que, as proteínas de 60 e 49 kDa tiveram mobilidade alterada na presença de β -mercaptoetanol (ver figura 5).

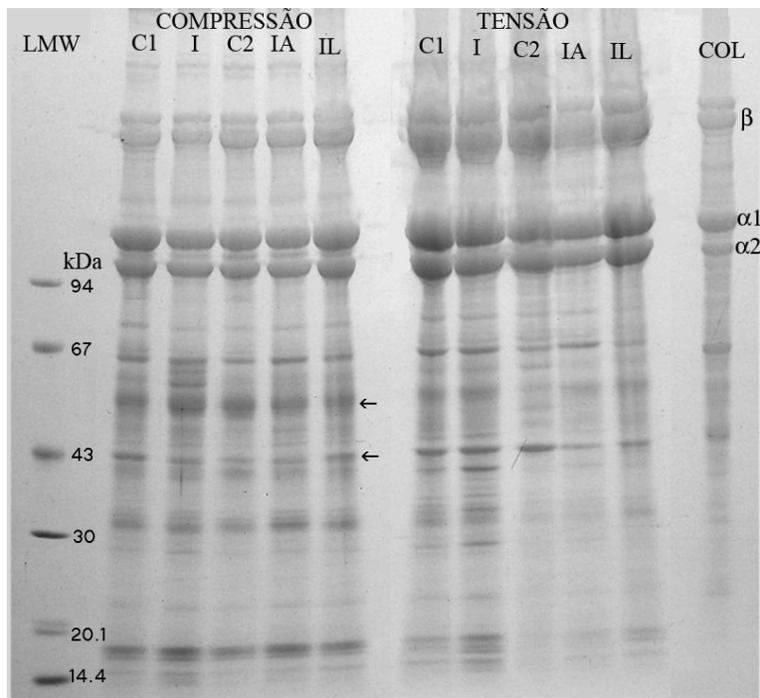


Figura 5: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida com β -mercaptoetanol. Na coluna da esquerda estão os padrões de peso molecular (LMW) e à direita, o padrão de colágeno (cadeias α_1 , α_2 e β). C1 (controle do grupo I), I (grupo imobilizado), C2 (controle do grupo IA/IL), IL (grupo imobilizado e livre), IA (grupo imobilizado e alongado). Observe as cadeias α de colágeno menos intensas no grupo I nas regiões de compressão e tensão. Note ainda que, o grupo IL apresentou cadeias α de colágeno mais proeminentes do que os grupo IA e C2. As setas (\leftarrow) possivelmente representam migração mais rápida das proteínas de 60 e 49 kDa na presença de β -mercaptoetanol.

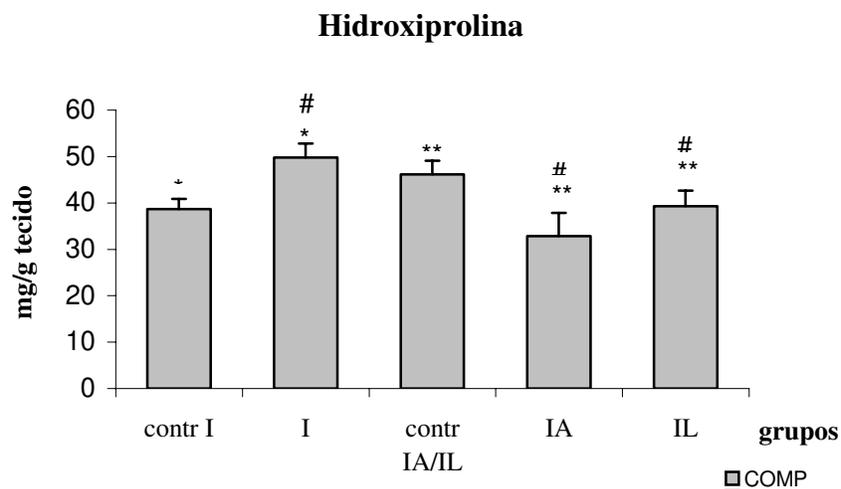


Figura 6: Concentração de hidroxiprolina (mg/g de tecido) da região de compressão (COMP) dos tendões dos grupos contr I (controle imobilizado), I (imobilizado), contr IA/IL (controle imobilizado/alongado e imobilizado/livre), IA (imobilizado/alongado) e IL (imobilizado/livre). Observe a maior concentração de hidroxiprolina no grupo I, ao contrário do grupo IA que apresentou a menor concentração. * e ** Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos e seus respectivos controles e # diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos assinalados.

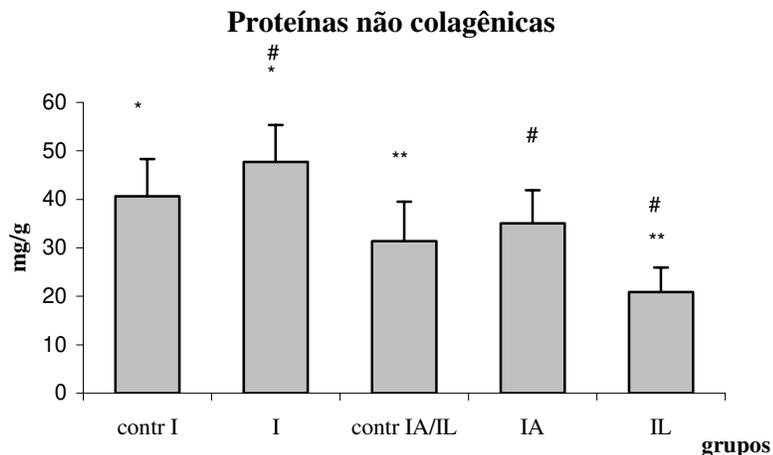


Figura 7: Concentração de proteínas não colagênicas (mg/g de tecido) da região de compressão (COMP) e tensão (TENS) dos tendões dos grupos contr I (controle imobilizado), I (imobilizado), contr IA/IL (controle imobilizado/alongado e imobilizado/livre), IA (imobilizado/alongado) e IL (imobilizado/livre). Observe que não houve diferença significativa entre a região de compressão dos diferentes grupos. Em relação à região de tensão, o grupo I apresentou a maior concentração de proteínas não colagênicas. Ao contrário do grupo IL que apresentou menor concentração. * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em relação aos seus respectivos controles e # diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos assinalados.

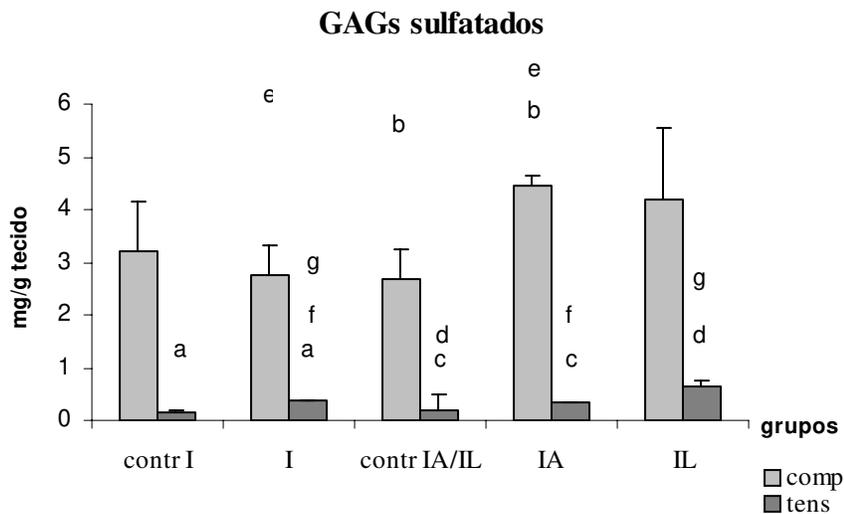


Figura 8: Concentração de GAGs sulfatados (mg /g de tecido) da região de compressão (comp) e tensão (tens) dos tendões dos grupos CONTR I (controle imobilizado), I (imobilizado), CONTR IA/IL (controle imobilizado/alongado e imobilizado/livre), IA (imobilizado/alongado) e IL (imobilizado/livre). Observe a presença marcante desses componentes na região de compressão, sendo que o grupo IA apresentou maior valor de GAGs sulfatados. Em relação à região de tensão, os três grupos experimentais que passaram pela imobilização (grupos I, IA e IL) apresentaram maiores concentrações em relação aos seus respectivos controles. As letras correspondentes colocadas sobre as barras indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos relacionados com mesma letra.

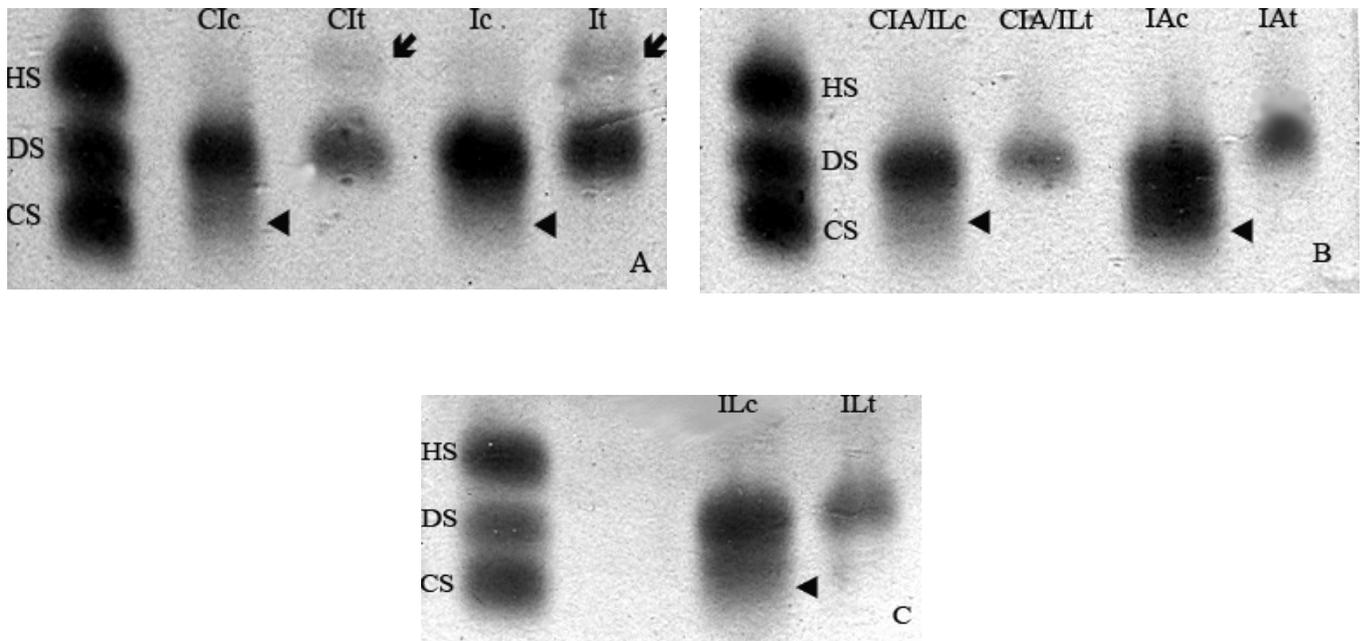


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose. Na coluna da esquerda estão os padrões de HS (heparam sulfato), DS (dermatam sulfato) e CS (condroitim sulfato). Em **A:** C1c (controle I compressão), C1t (controle I tensão), I1c (grupo I compressão) e I1t (grupo I tensão); **B:** CIA/ILc (controle grupo IA/IL compressão), CIA/ILt (controle grupo IA/IL tensão), IA1c (grupo IA compressão) e IA1t (grupo IA tensão); **C:** ILc (grupo IL compressão) e ILt (grupo IL tensão). Observe a banda referente ao DS em todas as regiões dos grupos experimentais (A, B e C), enquanto que o CS (◄) está presente apenas na região de compressão dos grupos. Note também a presença da banda referente ao HS (↙) nas regiões de tensão somente dos grupos C1t e I1t (A).

Quantidade de DS

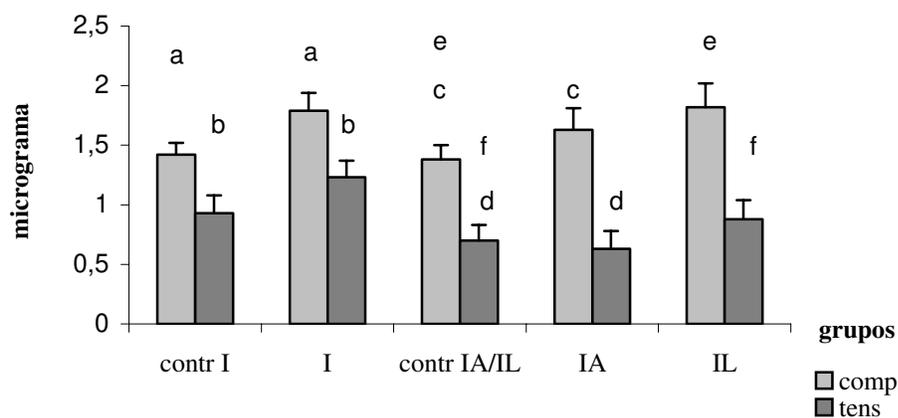


Figura 10: Histograma representando a quantidade de DS (dermatam sulfato) da região de compressão (comp) e tensão (tens) dos tendões dos grupos contr I (controle imobilizado), I (imobilizado), contr IA/IL (controle imobilizado/alongado e imobilizado/livre), IA (imobilizado/alongado) e IL (imobilizado/livre). Observe a presença marcante deste componente na região de compressão, sendo que o grupo I apresentou maior valor em comparação ao grupo IA. As letras correspondentes colocadas sobre as barras indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos com mesma letra relacionados.

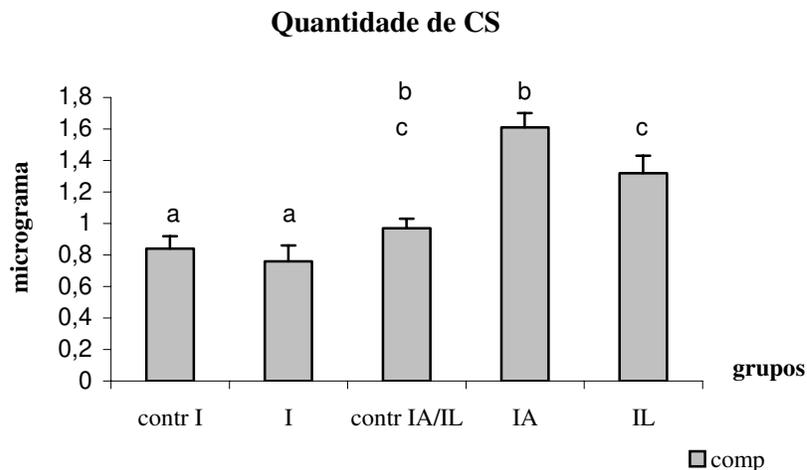


Figura 11: Histograma representando a quantidade de CS (condroitim sulfato) da região de compressão (comp) dos tendões dos grupos contr I (controle imobilizado), I (imobilizado), contr IA/IL (controle imobilizado/alongado e imobilizado/livre), IA (imobilizado/alongado) e IL (imobilizado/livre). Note a presença marcante deste componente no grupo IA. As letras correspondentes colocadas sobre as barras indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos com mesma letra relacionados.

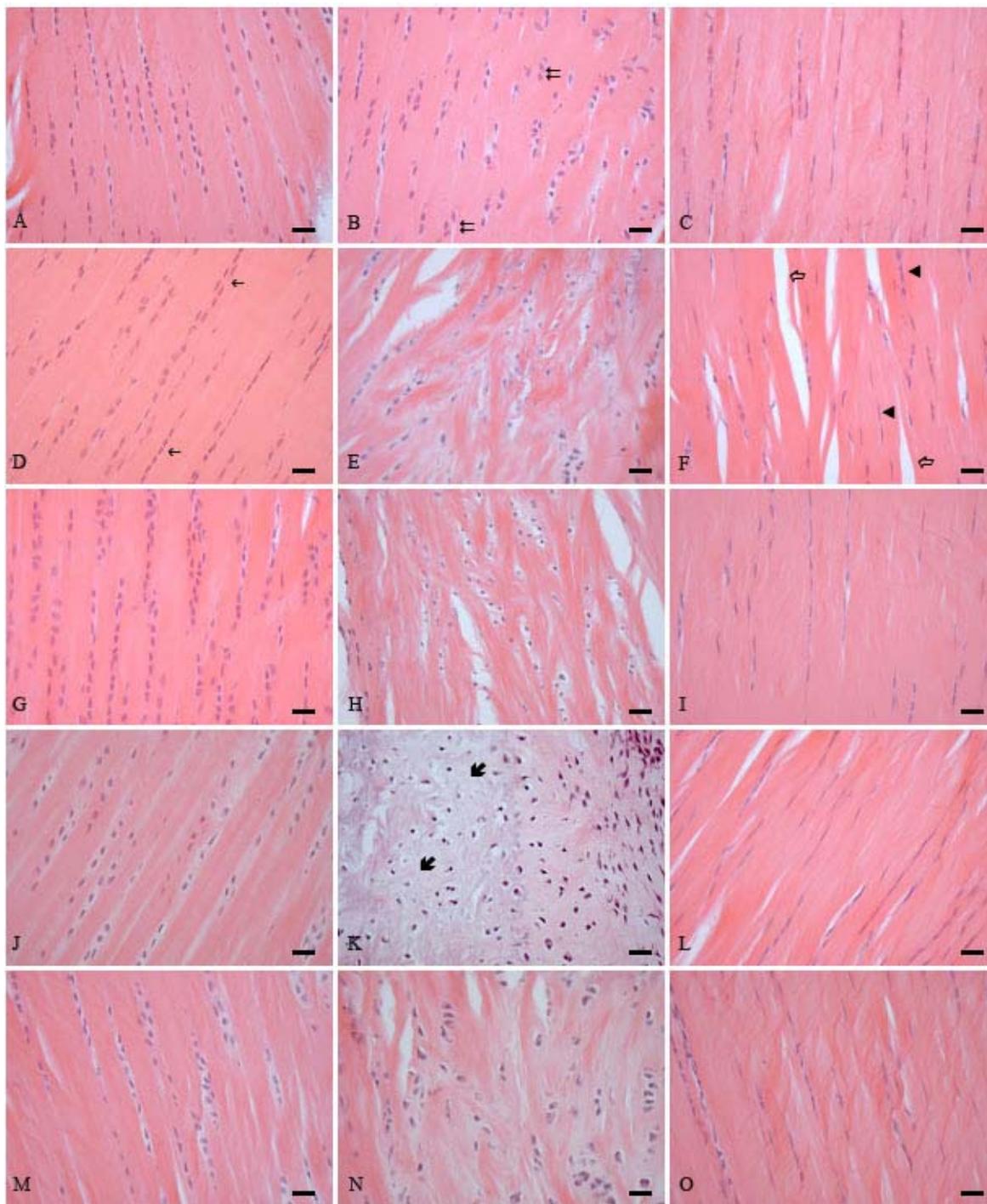


Figura 12: Cortes longitudinais de tendões corados com HE observados ao MOC. A, D, G, J e M correspondem aos grupos Controle I, I, Controle IA/IL, IA e IL respectivamente da região de inserção; B, E, H, K e N da região de compressão; e C, F, I, L e O da região de tensão. Note células arredondadas e enfileiradas na inserção do grupo I (←D) e fibroblastos alongados (◄) e fendas na matriz colagênica (⇐F) na região de tensão. Observe ainda células semelhantes a condrócitos (⇐B) na fibrocartilagem característico em todos os grupos e coloração menos intensa da região de fibrocartilagem do grupo IA (◄-K). Barra = 50 µm (B, E, H, K, N) e barra = 25 µm (A, C, D, F, G, I, J, L, M, O) .

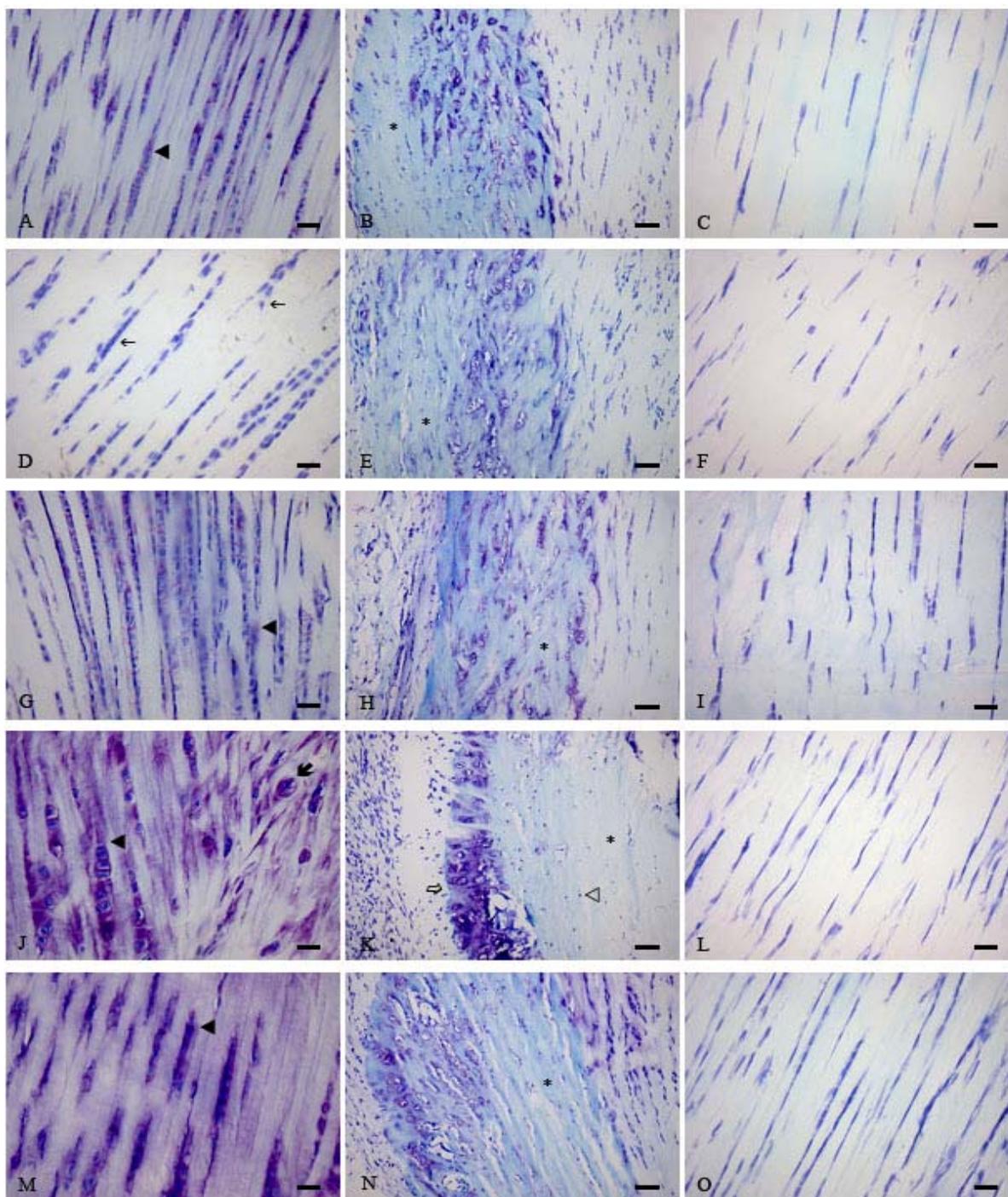


Figura 13: Cortes longitudinais de tendões corados com AT observados ao MOC. A, D, G, J e M correspondem à região de inserção dos grupos Controle I, I, Controle IA/IL, IA e IL respectivamente; B, E, H, K e N à região de compressão; e C, F, I, L e O à região de tensão. Observe a intensa metacromasia na matriz territorial em J e M (▲). Observe ainda em J células maiores e semelhantes a condrócitos com metacromasia no citoplasma e cromatina aparentemente menos condensada (▶). Em D, note ausência de material metacromático (←). Note a MEC mais fortemente corada (*) na região de compressão de todos os grupos e a presença de células semelhantes a condrócitos. Em K (↔), observe uma camada de células na periferia da fibrocartilagem. Na região de tensão de todos os grupos, note a MEC fracamente corada e maior quantidade de células alongadas em L. Barra = 50 μ m (B, E, H, K, N) e barra = 25 μ m (A, C, D, F, G, I, J, L, M, O).

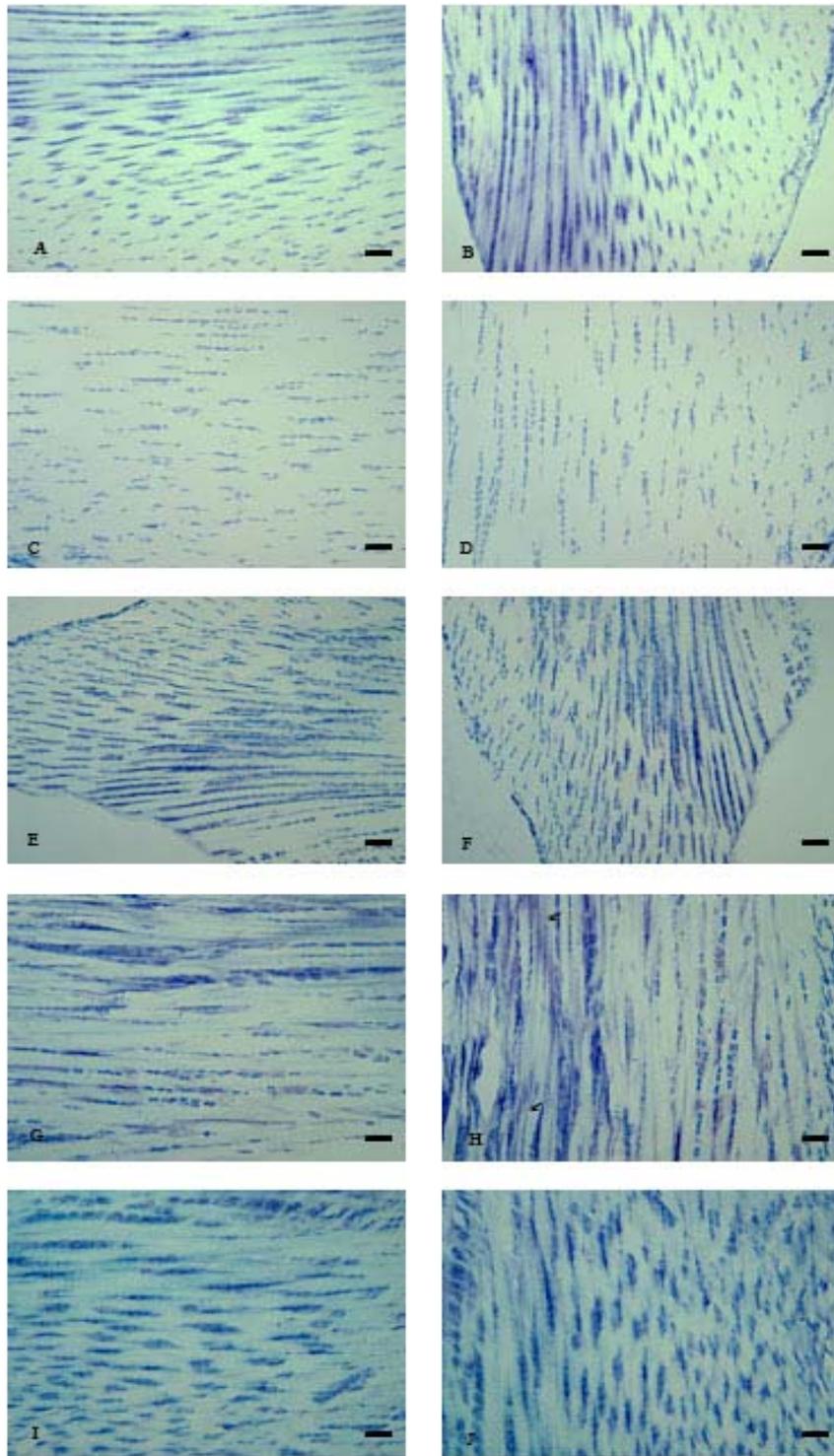


Figura 14: Cortes longitudinais de tendões corados com AT observados ao microscópio de polarização. A, C, E, G e I correspondem aos grupos controle I, I, controle IA/IL, IA e IL na posição paralela em relação ao polarizador. B, D, F, H e J correspondem aos grupos controle I, I, controle IA/IL, IA e IL na posição perpendicular ao polarizador. Note o DL aparentemente mais intenso no grupo IA (↙H). Barra = 50 µm.

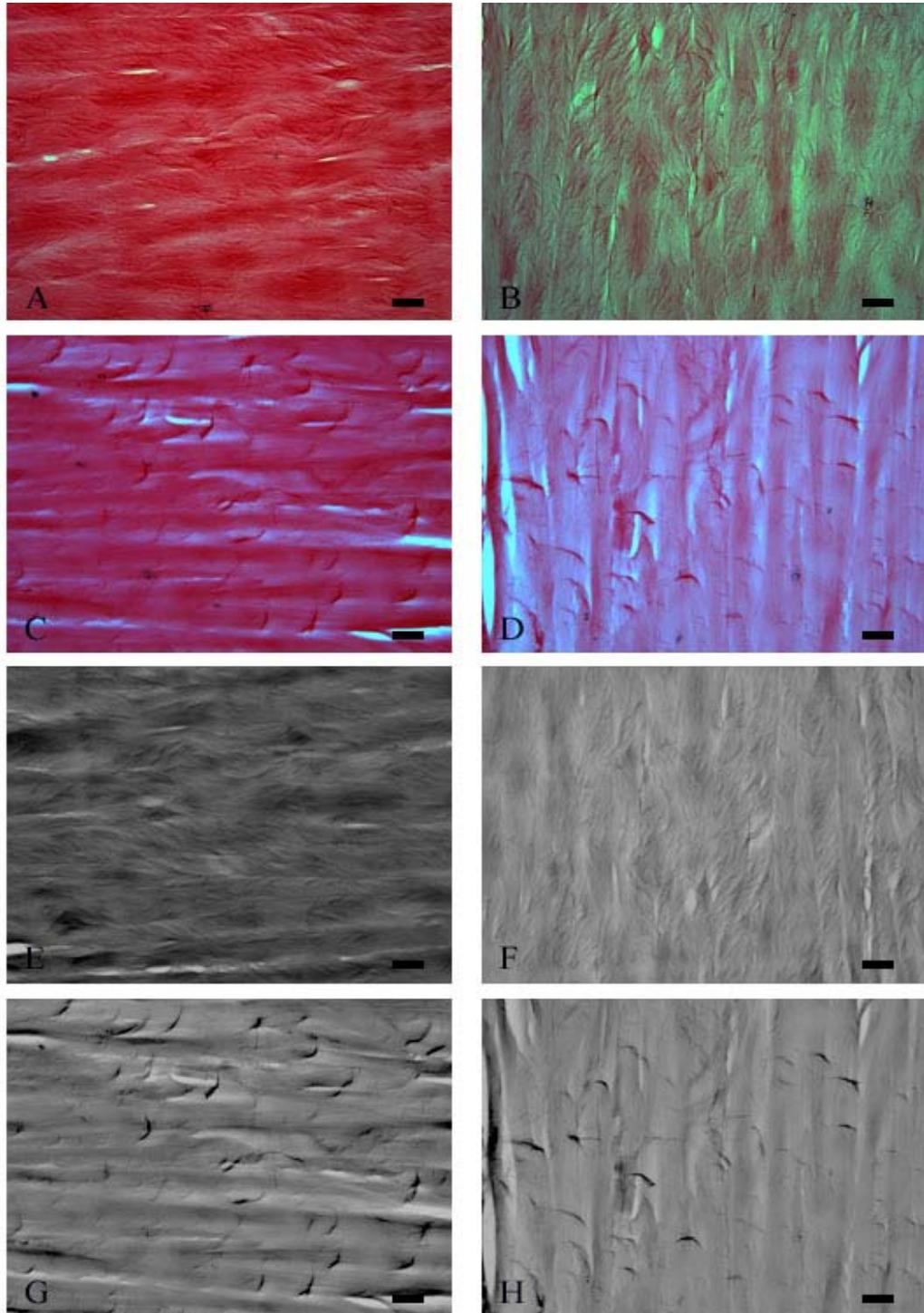


Figura 15: Cortes longitudinais dos tendões corados com PSS observados ao microscópio de polarização. A, B, E e F correspondem ao Controle I, nas posições PA (A, E) e PE (B, F) em relação ao plano de polarização. C, D, G e H correspondem ao grupo I nas posições PA (C, G) e PE (D, H). Note o DL menos intenso do grupo I (C,G, D e H) em relação ao seu controle. Barra = 25 μ m.

Tabela 1: Valores médios de absorvância obtidos pelas medidas nas posições paralela (A_{PA}) e perpendicular (A_{PE}) do maior eixo do tendão em relação ao plano de polarização. DR = índice dicróico obtido pela razão entre A_{pa} e A_{pe} (A_{pa}/A_{pe}) e significativo (* e ** $p < 0,05$) entre os grupos e seus respectivos controles. DP= desvio padrão.

GRUPOS	A_{PA}	A_{PE}	DR (A_{pa}/A_{pe})	DP
CONTR I	0,6966	0,3381	1,99 *	$\pm 0,496$
I	0,59	0,3384	1,75 *	$\pm 0,269$
CONTR A/IL	0,76349	0,3502	2,20 **	$\pm 0,319$
IA	0,7775	0,4052	2,01 **	$\pm 0,391$
IL	0,98822	0,47167	2,12 **	$\pm 0,370$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHTIKOSKI AM, KOSKINEM SOA, VIRTANEM P, KOVANEM V and TAKALA TES. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, 172: 131-140, 2001.

AKESON WH, WOO SLY, AMIEL D, COUTTS RD and DANIEL D. The connective tissue response to immobility: Biochemical changes in periarticular connective tissue of immobilized rabbit knee. **Clin Orthop**, 93: 356-362, 1973ecf.

ALMEIDA FM *et al.*, 2006. Tese de mestrado da UNICAMP: Efeito do alongamento sobre o tendão calcâneo de ratos (manuscrito em preparação).

AMIEL D, WOO SL, HARWOOD FL and AKESON WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: A biochemical-biomechanical correlation. **Acta Orthop Scand**, 53(3): 325-32, 1982.

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

ARCHAMBAULT JM, ELFERVIG-WALL MK, TSUZAKI M, HERZOG W and BANES AJ. Rabbit tendon cells produce MMP-3 in response to fluid flow without significant calcium transients. **J Biomech**, 35: 303-309, 2002 a.

ARCHAMBAULT JM, TSUZAKI M, HERZOG W and BANES AJ. Stretch and interleukin-1 β induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro. **J Orthop Res**, 20: 36-39, 2002 b.

BANES AJ, HORESOVSKY G, LARSON C, TSUZAKI M, JUDEX S, ARCHAMBAULT J, ZERNICKE R, HERZOG W, KELLEY S and MILLER L.

Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells. **Osteoarthritis cartilage**, 7: 141-143, 1999.

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

BENJAMIN M & EVANS EJ. Fibrocartilage. **J Anat**, 171: 1-15, 1990.

BENJAMIN M & RALPHS JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments- an adaptation to compressive load. **J Anat**, 193: 481-494, 1998.

BIRK DE, HAHN RA, LINSEMAYER CY and ZYCBAND EI. Characterization of fibril segments from chicken embryo cornea, dermis and tendon. **Matrix Biol**, 15: 111-18, 1996.

BIRK DE & IRELSTAD RL. Extracellular compartments in tendons morphogenesis: collagen fibril, bundle and macroaggregate formation. **J Cell Biol**, 103: 231-40, 1986

BIRK DE, NURMINSKAYA MV and ZYCBAND EI. Collagen fibrillogenesis in situ: Fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. **Dev Dyn**, 202: 229-243, 1995.

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

CARVALHO CMM. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Tese de Mestrado**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2001.

COOPER RR. Alterations during immobilization and regeneration of skeletal muscle in cats. **J Bone Joint Surg**, 54A: 919-925, 1972.

COUTINHO EL, GOMES ARS, FRANÇA C and SALVINI TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35: 1329-1332, 2002.

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

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

D'SOUZA D & PATEL K. Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development. **Anat Embryol**, 200: 367-375, 1999.

ENGLES M. Tissue response. In: DONATELLI, R.A.; WOODEN, MJ. **Orthopaedic Physical Therapy**. Philadelphia: Churchill Livingstone. 3ed. cap.1 p.1-24, 2001.

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

FEITOSA VLC, ESQUISATTO MAM, JOAZEIRO PP, GOMES L, FELISBINO SL and PIMENTEL ER. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. **Cellular and Molecular Biology**, 48: online, OL359-367, 2002.

FEITOSA VLC, ESQUISATTO MAM, JOAZEIRO PP, GOMES L, FELISBINO SL and PIMENTEL ER. Physicochemical and structural analysis of three s of the deep digital flexor tendon of pigs. **Braz J morphol Sci**, 22(2): 113-119, 2005.

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

HANSON AN & BENTLEY JP. Quantitation of type I and type III collagen ratios in small samples of human tendon, blood vessels and atherosclerotic plaque. **Anal Biochem**, 130: 32-40, 1983.

HEBEL R & STROMBERG MW. Anatomy and embryology of the laboratory rat. Biomed Verlag, 1986.

HEDBOM E & HEINERDARD D. Interaction of a 59-Kda connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. **J Biol Chem**, 264: 6898-6905, 1989.

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

IOZZO RV & MURDOCH AD. Proteoglycans of the extracellular environment: Clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. **FASEB J**, 10: 598-614, 1996.

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

JOZSA L. Morphological and biochemical alteration in hypokinetic human tendons. **Fn Sports Exerc Med**, 3: 111-114, 1984.

JOZSA L, KANNUS P, JARVINEN M, KVIST M and LEHTO M. Denervation and immobilization induced changes in myotendinous junction. A comparative histological, histochemical study on the muscle-tendons unit of humans and rats. **Eur J Exp Musculoskeletal Res**, 1: 105-112, 1992.

KARPAKKA VÄÄNÄNEN , VIRTANEN P, SAVOLAINEN, ORAVA S and TACALA TES. The effects of remobilization and exercise on collagen biosynthesis in rat tendon. **Acta Phys. Scand**, 139: 139-145, 1990.

KANNUS P, JOZSA L, KRIST M, LEHTO M and JARVINEN M. The effect of immobilization on myotendinous junction: an ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. **Acta Physiol Scand**, 144: 387-394, 1992.

KELLET J (1986). Acute Soft tissue injuries-review of the literature. **Med Sci Sports Exerc**, 16: 489-500, 1986.

KIERNAN JA. Histological and histochemical methods. **Theory and practice**. Pergamo Press. 3ed: 81-82, 1981.

KJAER M, LANGBERG H, MILLER BF, BOUSHEL R, CRAMERI R, KOSKINEN S, HEINEMEIER K, OLESEN JL, DOSSING S, HANSEN M, PEDERSEN SG, RENNIE MJ and MAGNUSSON P. Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, 5(1): 41-52, 2005.

KOOB TJ & VOGEL KG. Site- related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. **J Orthop Res**, 5: 414-24, 1987.

KOSKINEN SOA, KJAER M, MOHR T, BIERING SORENSEN F, SUURONEN T and TAKALA TES. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. **Muscle Nerve**, 23: 580-589, 2000.

KOVANEN V. Effects of ageing and physical training on rat skeletal muscle. **Doctoral thesis**. Acta Physiol Scand, 577(Suppl.): 1-56, 1989.

KUBO K, HAMESHIKA H and FUKUNAGA T. Effects on transient muscle contractions and stretching on the tendon structure *in vivo*. **Acta Physiol Scand**, 175: 157-164, 2002.

LAEMMLI VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage Ty. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LANGBERG H, SKOVGAARD D, PETERSEN LJ, BULOW J and KJAER M. Type-1 collagen turnover in peritendinous connective tissue after exercise determined by microdialysis. **J Physiol**, 521: 299-306, 1999.

LANGBERG H, ROSENDAL L and KJAER M. Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in human. **J Physiol**, 534: 297-302, 2001.

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

NAGASE H & WOESSNER JF. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, 274: 21491-21494, 1999.

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

OLDBERG A, ANTONSSON P, LINDBLON K and HEINERGDARD D. A collagen-binding 59-Kda protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). **EMBO J**, 8: 2601-04, 1989.

PARRY DA, CRAIG AS and BARNES GR. Tendon and ligament from the horse: an ultrastructural study of collagen fibers and elastic fibers as a function of age. **Pro R Soc Lond B Biol Sci**, 203: 293-303, 1978.

RENNER AF, CARVALHO E, SOARES E and MATTIELLO-ROSA S. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. **OsteoArthritis and Cartilage**, 14: 196-202, 2006.

ROSENBERG LC, CHOI HV, IANG L, JOHNSON TL, PAL S, WEBBER C, REINER A and POOLE AR. Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. **J Biol Chem**, 260: 6304-6313, 1985.

SAVOLAINEN J, MYLLYLÄ R, VIHKO V, VÄÄNÄNEM K and TAKALAINEN TES. Effects of denervation and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. **Am J Physiol**, 254: R897-902, 1988.

SCOTT JE. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. **J Anat**, 187: 259-269, 1995

SCOTT PG, NAKANO T and DODD CM. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. **Biochim Biophys Acta**, 1336: 254-262, 1997.

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

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

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

VIDAL BC & MELLO MLS. Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye ponceau SS to collagen fibers. **Published online** 22 march, 2005.

VIDAL BC & VOLPE PLO. Differential scanning calorimetry and optical properties of collagen-dichroic azo Ponceau SS Complexes. **Braz J Morphol Sci**, 22(3): 49-153, 2005.

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

VILARTA R and VIDAL BC. Anisotropic and biochemical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregational state and macromolecular order. **Matrix Biology**, 9(1): 55-61, 1989.

VIOLA M, BARTOLINI B, SONAGGERE M, GIUDICI C, TENNI R and TIRA ME. Fibromodulin interactions with type I and II collagens. **Connective Tissue Research**, 48: 141-148, 2007.

VOGEL KG & HEINEGARD D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. **J Biol Chem**, 260: 298-306, 1985.

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

WOESSNER JF. Matrix metalloproteinases and their on hibitors in connective tissue remodelling. **FASEB J**, 5: 2145-2154, 1991.

ZAMORA AJ & MARINI JF. Tendon and myo-tendinous junction in an overload skeletal muscle of the rat. **Anat Embryol**, 179: 89-96, 1988.

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

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada “Efeito da imobilização seguida de alongamento sobre a matriz extracelular do tendão calcâneo de ratos”:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1254-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).

Andrea Aparecida de Aro

Aluno(a): Andrea Aparecida de Aro

Edson Rosa Pimentel

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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Anamaria Aparecida Guaraldo

Nome:

Função: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP