

Haline Ballestero Fêo

**"ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DOS
TENDÕES CALCANEAR E FLEXOR DIGITAL
SUPERFICIAL DE FRANGOS DURANTE O
ENVELHECIMENTO"**

Campinas, 2013

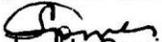
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Haline Ballestero Fêo

**“ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS
DOS TENDÕES CALCANEAR E FLEXOR DIGITAL
SUPERFICIAL DE FRANGOS DURANTE
O ENVELHECIMENTO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Haline Ballestero Fêo


e aprovada pela Comissão Julgara.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular E Estrutural, na
área de Biologia Tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes

Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F369a Fêo, Haline Ballestero, 1988-
Aspectos morfológicos e bioquímicos dos tendões calcâneo e flexor digital superficial de frangos durante o envelhecimento / Haline Ballestero Fêo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Laurecir Gomes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tendões - Morfologia. 2. Bioquímica. 3. Matriz extracelular. 4. Envelhecimento. I. Gomes, Laurecir, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Morphological and biochemical aspects of the calcaneal and the superficial digital flexor tendons of chickens during aging

Palavras-chave em inglês:

Tendons - Morphology

Biochemistry

Extracellular matrix

Aging

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Laurecir Gomes [Orientador]

Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

Frances Lilian Lanhellas Gonçalves

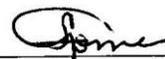
Data de defesa: 05-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 5 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laurecir Gomes (Orientadora)



Assinatura

Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto



Assinatura

Dra. Frances Lilian Lanhellas Gonçalves



Assinatura

Dra. Tatiana Carla Tomiosso

Assinatura

Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Assinatura

RESUMO

O tendão calcâneo e o tendão flexor digital superficial de frangos são estruturas adaptadas para resistir às forças de tensão geradas pelos músculos e transmitidas para os ossos. Em algumas regiões, estes tendões também suportam forças de compressão adicionais às de tensão. Durante o envelhecimento os tendões apresentam modificações nas regiões sujeitas à compressão e a tensão, com variações na composição da matriz extracelular, disposição de fibras de colágeno e celularidade, assim como em suas interações com outros componentes da matriz. O objetivo desse trabalho foi analisar a organização estrutural e a composição da matriz extracelular das regiões submetidas à tensão e a tensão-compressão em diferentes idades (1 mês, 5 meses e 8 meses). O tendão calcâneo e o tendão flexor digital superficial foram divididos em região proximal (tensão-compressão) e distal (tensão). Os resultados morfológicos, em ambos os tendões, mostraram presença de uma estrutura fibrocartilaginosa na região sujeita as forças de tensão-compressão. No tendão calcâneo foi possível observar ainda, presença de um coxim gorduroso, que se acentuou com o passar da idade. Esse coxim funciona como um amortecedor, uma vez que essa região é muito requisitada durante a locomoção do animal. Já a região que recebe apenas forças de tensão apresentou alterações marcantes nos diferentes tendões em relação aos animais mais jovens. No tendão calcâneo dos animais mais velhos, as fibras de colágeno estão mais compactadas exibindo poucas ondulações e células com núcleos alongados, enquanto que no tendão flexor digital superficial essa região apresentou-se com pontos de calcificação, de forma que essa morfologia pode indicar o início do estabelecimento de uma matriz óssea. Análises bioquímicas apresentaram, tanto no tendão calcâneo como no tendão flexor digital superficial, aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 comparados aos animais mais jovens, em ambas as regiões, indicando um processo de remodelamento no tecido. No SDS-PAGE do tendão calcâneo, componentes com migração eletroforética semelhante ao decorim e fibromodulim aumentaram com o avanço da idade, principalmente na região sujeita às forças de tensão, enquanto que no SDFT o decorim aparentemente diminuiu com o envelhecimento.

Palavras-chave: tendões, morfologia, bioquímica, matriz extracelular, envelhecimento.

ABSTRACT

The calcaneal and the superficial digital flexor tendons of chickens are structures adapted to resist to tensile forces generated by the muscles and transmitted to the bones. In some regions, these tendons also support compressive forces additional to the tension forces. During aging tendons exhibit modifications in regions subjected to compression and tension forces, with variations in the composition of the extracellular matrix, arrangement of collagen fibers and cellularity, as well as in its interactions with other matrix components. The aim of this study was to analyze the structural organization and composition of the extracellular matrix regions subjected to tension and tension-compression forces at different ages (1 month, 5 months, 8 months old). The calcaneal and the superficial digital flexor tendons were divided into proximal (tension-compression) and distal (tension) regions. The morphological results, in both tendons, showed presence of a fibrocartilage structure in the region subject to the compression-tension forces. In the calcaneal tendon was also observed the presence of a fat pad, that increased with age. This structure act absorbing the mechanical impacts, once this region is required during the locomotion of the animal. The region that receives only tension forces had marked alterations in different tendons compared to younger animals. In the calcaneal tendon of older animals, the collagen fibers are more compact exhibiting few ondulations and cells with elongated nuclei, whereas in the superficial digital flexor tendon this region exhibit calcification points. This morphology may indicate the beginning of the establishment of a bone matrix. Biochemical analyzes showed in both tendons, increased activity of MMP-2 and MMP-9 compared to younger animals, in both regions, indicating a remodeling process in the tissue. In SDS-PAGE of the calcaneal tendon, components with electrophoretic migration similar to decorin and fibromodulin increased with advanced age, especially in the area subject to tensile forces, whereas in the SDFT decorin apparently decreased with aging.

Keywords: tendons, morphology, biochemistry, extracellular matrix, aging.

SUMÁRIO

Resumo.....	6
Abstract.....	7
Abreviaturas.....	15
Introdução.....	17
Objetivos.....	26
Referências.....	27
Artigo I: Efeito da idade na matriz extracelular do tendão calcâneo de frango.....	39
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	44
Resultados.....	47
Discussão.....	50
Figuras e Legendas.....	54
Figura 1: Localização anatômica da região proximal.....	55
Figura 2: Prancha morfologia da região proximal.....	56
Figura 3: Prancha morfologia da região distal.....	57
Figura 4: SDS-PAGE.....	58
Figura 5 : Immunoblotting e Zimografia.....	59
Referências.....	60
Artigo II: Análise morfológica e bioquímica do tendão flexor digital superficial de frango durante o envelhecimento.....	70
Resumo.....	71
Introdução.....	72
Material e Métodos.....	73
Resultados.....	75
Discussão.....	76
Figuras e Legendas.....	79
Figura 1 : Prancha morfologia.....	80
Figura 2 : SDS-PAGE e Zimografia.....	81
Referências.....	83
Conclusões.....	89
Anexo I.....	90

Aos meus pais, Sérgio e Tere que me deram força e me incentivaram em cada etapa da minha vida. Sem vocês essa conquista definitivamente não seria possível!

Agradecimentos Especiais

À Deus, que me permitiu sonhar e realizar tudo de uma forma tão viva, estando sempre ao meu lado para as vitórias e as derrotas. Muito obrigado por tudo que vi, ouvi e aprendi. Graças ao Senhor pude buscar, conquistar e vencer mais uma etapa!

Aos meus pais, muito obrigada pelo amor, compreensão, incentivo e apoio durante toda esta jornada, e por acima de tudo acreditarem, sendo que em alguns momentos nem eu mesma o fiz. Essa fase reforçou a importância que vocês têm em minha vida. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Leandro, que foi minha fortaleza nessa jornada. Sempre me compreendeu, me ouviu (infinitas vezes), me amparou e me deu coragem para chegar até aqui. Te amo muito e acredito que nosso relacionamento cresceu muito nessa etapa, resultando em um fortalecimento ainda maior do que o já cultivado. Minha eterna gratidão!

*“Não importa o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.”
(Autor desconhecido)*

Agradecimentos

À Professora e orientadora Laurecir Gomes que foi a pessoa que me abriu as portas na Unicamp, me dando uma oportunidade única de realizar um sonho, de adquirir novos conhecimentos e de crescer e amadurecer tanto profissionalmente como pessoalmente. Obrigada pela orientação, dedicação, preocupação, confiança dentro do dia a dia do laboratório. Sem dúvida poucas pessoas dedicam tanta sabedoria e paixão pelo trabalho. Muito obrigada por tudo.

Ao técnico Francisco (Chico) que sempre esteve ao meu lado em momentos onde experimentos estavam prestes a dar errado e dias de trabalho serem jogados fora! Muito obrigada pela paciência em explicar tudo mais uma vez e pela valiosa ajuda diária no laboratório.

Aos novos amigos do laboratório Andrea, Flávia, Marcos, Cristiano, Mylena, Isabel e Neves pela amizade durante todo esse tempo, pelos ensinamentos técnicos, pela paciência, pelas risadas, por me incentivarem sempre a tentar novamente, e também (porque não?) pelos receios em utilizar a centrífuga, o nitrogênio líquido e os reagentes tóxicos. Sobre tudo pelo fundamental apoio que me cederam na nossa convivência diária tanto dentro quanto fora da Universidade.

Ao professor Edson pela amizade, paciência e disponibilidade em ajudar a buscar respostas aos problemas encontrados neste trabalho.

A Professora Heidi pela permissão para o uso de seu laboratório e pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Reprodutiva, Karine, Celina, Bruna, Cidinha, Pedro e Rodrigo pelo prazer da convivência.

À Mayara e a Letícia, pela companhia no congresso e pela ajuda nas disciplinas cursadas no cumprimento dos créditos.

Ao Wilson, que mesmo não estando mais no laboratório me cedeu o material para continuar o estudo e me deu conselhos extremamente valiosos que caminharam comigo até o final.

Aos meus eternos amigos Bertão e Marafon por sempre me ouvirem e me aconselharem em todos os momentos da minha vida!

As minhas primas Patrícia e Natália pela divertida amizade e companheirismo, desde os momentos mais fúteis aos mais importantes!

As minhas avós Mara e Rosa pelos sempre sábios conselhos e palavras de ternura.

Aos membros da banca Patrick, Taize e Heidi pelas considerações durante meu exame de qualificação.

A Liliam pela amizade, atenção e cuidado em resolver todos os problemas da pós-graduação.

Aos meus colegas do departamento de Biologia Celular pelo companheirismo e pela amizade.

Ao pessoal da van, pelas risadas e conversas descontraídas nas intermináveis horas de estrada.

A minha cunhada, Natália, pelas inúmeras conversas e apoio durante esse projeto. Coincidentemente entramos e estamos terminando juntas, embora em institutos diferentes.

Ao programa de pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural por ter me acolhido, dando-me a oportunidade de estudar e aprender.

Aos docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia.

Ao auxílio financeiro da CAPES/PROAP e a CAPES/DS pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos membros da banca pela atenção e análise desse trabalho.

*“A amizade é um amor que nunca morre.”
(Mario Quintana)*

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.”

Augusto Cury

*“A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe
mas no quanto ele tem consciência que não sabe.”*

Augusto Cury

ABREVIATURAS

CT – tendão calcanear

SDFT – tendão flexor digital superficial

MEC – matriz extracelular

M – meses

p – proximal

d – distal

fp – proximal da fibrocartilagem

fd – distal da fibrocartilagem

MMP – metaloproteinase

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinase

COMP – proteína da matriz da cartilagem oligomérica

Gly – glicina

Dec – decorim

FM – fibromodulim

DEAE-Sephacel – dietilaminoetil-sephacel

AT – azul de toluidina

XP – xylydine ponceau

HE – hematoxilina-eosina

β-Me – β-mercaptoetanol

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – gel de poliacrilamida com SDS

PBS – solução salina tamponada

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

Tris – tris-hidroximetilaminometano

HCl – ácido clorídrico

RPM – rotação por minuto

kDa – kiloDalton

μm – micrometro

μL – microlitro

μg - micrograma

nm – nanômetro

INTRODUÇÃO

A vida nos animais tem início no momento da concepção, envolvendo a diferenciação e a maturação do organismo e suas células. No entanto, em algum momento é iniciado um processo lento e progressivo de perda funcional que resultará na morte do indivíduo. Esse processo é conhecido como envelhecimento, sendo este universal, progressivo e intrínseco de todos os seres vivos (KANNUS *et al.*, 2005).

Antigas discussões sugerem que o acúmulo de mutações durante o envelhecimento resultaria em diminuição da função das proteínas, comprometendo a capacidade das células para desempenhar a sua função levando-as à morte celular (SZILARD, 1959). Mais tarde foi proposto que danos no DNA poderiam interferir na sua replicação e transcrição, prejudicando o desempenho celular e levando ao envelhecimento (LOMBARD *et al.*, 2005). Atualmente, o envelhecimento vem sendo descrito como um processo biológico caracterizado por um declínio nas funções fisiológicas e bioquímicas do organismo. Deste modo, várias modificações podem ser observadas, dentre as quais incluem redução da capacidade de uso do oxigênio, juntamente com uma circulação cardíaca prejudicada e adaptação respiratória, além de deterioração do sistema nervoso e degeneração da massa muscular (DORIA *et al.*, 2012).

O envelhecimento reflete a perda de homeostase prejudicando a capacidade funcional molecular e celular do organismo (KAVATHIA *et al.*, 2009). De acordo com Mendez e colaboradores (1998), fibroblastos cultivados a partir de pacientes com refluxo venoso, o que precede o desenvolvimento de úlceras venosas, apresentaram características semelhantes às células senescentes. Resultados semelhantes relacionam a senescência celular à aterosclerose (MINAMINO *et al.*, 2002), assim como a hiperplasia prostática benigna, uma das patologias mais comuns em homens idosos (CASTRO *et al.*, 2003).

Fatores ambientais contribuem para o processo de envelhecimento, enquanto que fatores intrínsecos e determinantes genéticos modulam tanto a saúde quanto o tempo de vida (LIONAKI *et al.*, 2012). O envelhecimento biológico é caracterizado por um declínio gradual na capacidade de responder aos desafios ambientais e quando esta diminuição atinge um determinado limite, a capacidade de sobrevivência do organismo é

comprometida. A redução da competência funcional dos sistemas no organismo, ao longo do tempo, é resultado de alterações graduais acumuladas nas células (GERSHON & GERSHON, 2000).

O acúmulo de células senescentes pode contribuir para as patologias relacionadas com a idade (CASTRO *et al.*, 2003), pois elas diminuem a capacidade de reparar danos genéticos, podendo ocorrer aberrações cromossômicas (WALTER *et al.*, 1997), além da perda da habilidade de rearranjo do esqueleto celular (STARODUBTSEVA, 2011) e da incapacidade de restaurar danos nos tecidos e organelas celulares (RAJAWAT *et al.*, 2009). De fato, evidências indicam que fibroblastos senescentes do estroma podem aumentar a proliferação e tumorigênese de células epiteliais pré-neoplásicas e modificadas, promovendo câncer em idosos (KRTOLICA *et al.*, 2001).

O envelhecimento celular leva a mudanças nos processos bioquímicos e morfológicos (DORIA *et al.*, 2012). A fosforilação oxidativa nas mitocôndrias é reduzida, o que proporciona um declínio bioenergético originando radicais livres, lipoperoxidação e danos no DNA mitocondrial (MAFTAH *et al.*, 1994). A síntese de DNA e RNA se encontra alterada, bem como atividades enzimáticas, absorção de nutrientes, processos de síntese e degradações, além da resposta celular a estímulos (HAYFLICK, 1984). O retículo endoplasmático pode sofrer estresse e acumular modificações prejudiciais, agregações, distúrbios na homeostase de Ca^{2+} e deficiência na síntese protéica. Além disso, devido ao declínio na degradação autofágica e proteossômica, as proteínas responsáveis pela limpeza tornam-se prejudicadas, ativando vias que implicariam numa função deficiente desse sistema (SALMINEN & KAARNIRANTA, 2010). Um acúmulo de evidências indica que esta redução gradual pode ter um papel deteriorante, sendo que a perda da função do gene da autofagia influencia significativamente na longevidade (LIONAKI *et al.*, 2012).

As alterações morfológicas consistem em acentuada redução do retículo endoplasmático rugoso e de microvesículas na periferia celular (ESQUISATTO *et al.*, 2003), além de um núcleo irregularmente lobulado e mitocôndrias vacuolizadas (MASORO, 1991). Concomitantemente há aumento no acúmulo de pigmentos tipo lipofuscina e de *cross-links* em moléculas da matriz extracelular, tal como colágeno. A síntese proteica e o *turnover* do colágeno se encontram alterados, assim como as

modificações pós-translacionais, como as glicosilações e as oxidações. Essas alterações levam a uma diminuição da capacidade de manter a homeostase e, portanto, reduzida capacidade de responder adaptativamente a estímulos ambientais. Como resultado, há aumento da vulnerabilidade a várias doenças, sendo que o acúmulo de danos inibe a função fisiológica levando a um envelhecimento progressivo e senescência (RAJAWAT *et al.*, 2009).

Alguns estudos têm mostrado que o envelhecimento pode tornar os tendões mais fortes, rígidos e resistentes (SHADWICK, 1990; FESSEL *et al.*, 2012), enquanto outros têm contestado esses resultados afirmando que os tendões se tornam menores, mais fracos e mais propensos à lesões (BUCKWALTER *et al.*, 1993; GOODMAN & CHOUEKA, 2005). A estrutura do tendão é formada por uma matriz extracelular composta por componentes fibrilares e componentes não-fibrilares (WANG, 2006), os quais sofrem alterações fisiológicas durante o envelhecimento. A rigidez dos tendões depende tanto da estrutura de suas fibras como da composição da matriz extracelular (ADDIS & LAWSON, 2010), sendo que a resposta dessas fibras à tração é diretamente dependente da idade (CRIBB & SCOTT, 1995).

Quando saudáveis, os tendões possuem coloração esbranquiçada e brilhante, podendo ser curtos, grossos e planos como o tendão quadríceps, ou longos, finos e cilíndricos como os tendões flexores dos dedos (JÓZSA & KANNUS, 1997). A forma de um tendão influencia diretamente nas suas propriedades biomecânicas, sendo que durante a locomoção, diferentes tipos de tendões estão sujeitos a diferentes cargas mecânicas (MAGANARIS & PAUL, 2002).

Os tendões são estruturas formadas por tecido conjuntivo fibroso denso altamente organizado (BENJAMIN & RALPHS, 2000), composto por fibras de colágeno dispostas longitudinalmente considerando o maior eixo do tendão. Essas fibras são bastante flexíveis e pouco extensíveis (O'BRIEN, 1997), o que permite aos tendões transmitirem ao osso forças tensionais exercidas pelos músculos, tornando possível o movimento (KANNUS, 2000). Dessa forma os tendões podem contornar uma articulação e atuar como um tecido de amortecimento (KIRKENDALL & GARRETT, 1997), possuindo capacidade de retornar a sua forma após ser tracionado (HAYEM, 2001).

O tendão possui uma bainha sinovial ou paratendinosa que permite seu deslizamento em superfícies ósseas e tecidos adjacentes evitando atritos. A bainha paratendinosa é também denominada paratendão, composta por colágeno tipo I e III e fibras elásticas (KANNUS, 2000). Sob o paratendão, há uma fina bainha de tecido conjuntivo, o epitendão, que é contínuo em toda sua superfície interna com o endotendão, o qual possui vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (KIRKENDALL & GARRETT, 1997; TUIITE *et al.*, 1997). O endotendão reveste fibras e fibrilas de colágeno formando assim os feixes (KANNUS, 2000), de forma que a fibrila pode ser considerada a unidade básica de transmissão de força do tendão (WANG, 2006; KONGSGAARD *et al.*, 2010).

O tendão apresenta uma estrutura hierárquica que é composta por moléculas de colágeno, fibrilas, feixes de fibras e fascículos. A fibrila, a menor unidade estrutural do tendão, consiste em grande parte de moléculas de colágeno alinhadas. Animais jovens apresentam fibrilas pequenas, enquanto que animais adultos possuem tanto fibrilas pequenas como grandes. Fibras formam o próximo estágio e são compostas por um conjunto de fibrilas de colágeno. Feixes de fibras formam fascículos e posteriormente, feixes de fascículos formam o tendão propriamente dito (figura 1). O tendão aparece como um padrão ondulado conhecido como *crimp* quando secções longitudinais são visualizadas principalmente em um microscópio de luz polarizada (WANG, 2006).

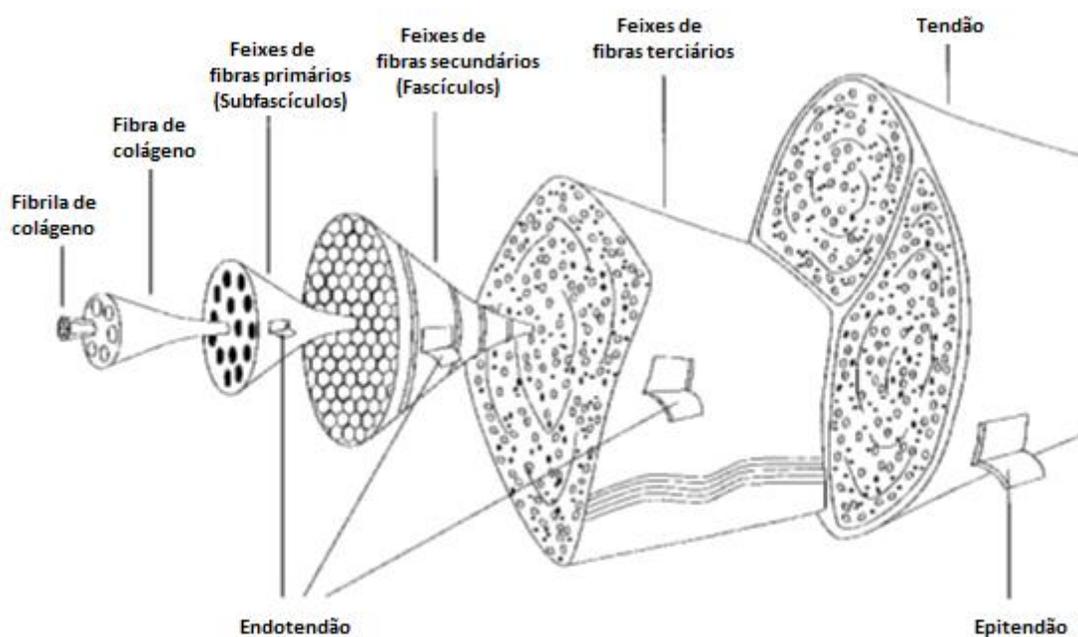


Figura 1: Organização hierárquica da estrutura do tendão (KANNUS, 2000).

As moléculas constituintes do tendão são colágeno, proteoglicanos e proteínas não colagênicas, sendo que todos esses componentes são sintetizados pelos tenócitos (KIRKENDALL & GARRETT, 1997). Esses elementos formam a matriz extracelular, a qual contém cerca de 68% de água (O'BRIEN, 1997). Tenócitos são fibroblastos especializados que em indivíduos em crescimento são denominados tenoblastos (HAYEM, 2001), encontrados entre as fibras de colágeno (TUIE *et al.*, 1997). Estas células compõem cerca de 90-95% dos elementos celulares do tendão, enquanto que os outros 5-10% incluem: células semelhantes à condrócitos, presentes em locais de compressão e inserção; células sinoviais na superfície do tendão e células vasculares no endotendão e epitendão (KANNUS, 2000). Estruturalmente, tenoblastos são caracterizados pela presença de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, ribossomos livres (BENJAMIN & RALPHS, 2000), além de numerosas vesículas periféricas (REDAELLI *et al.*, 2003). Estudos mostram que no início do desenvolvimento, quando há grande produção de fibrilas de colágeno, o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi são proeminentes, tornando-se reduzidos com a idade (IPPOLITO *et al.*, 1980; BENJAMIN & RALPHS, 2000; ESQUISATTO *et al.*, 2003).

O colágeno, a principal proteína, representa cerca de 90% da massa seca do tendão (KIRKENDALL & GARRETT, 1997; GELSE *et al.*, 2003). O tendão é formado por fibrilas que desempenham importante papel na estabilização da sua estrutura (KOLÁČNÁ *et al.*, 2007), sendo os colágenos mais abundantes os tipo I e II, estando também presentes os tipos III, V, VI, IX, X e XI embora em menores quantidades (FUKUTA *et al.*, 1998; SILVER & LANDIS, 2008). O colágeno é sintetizado como tropocolágeno, uma proteína extensa produzida no interior de uma célula, como e.g. fibroblastos, e secretada na matriz extracelular como procolágeno. Na matriz, as moléculas de procolágeno sofrem ação de proteases formando o tropocolágeno, que então se associa espontaneamente para formar as fibrilas de colágeno (WANG, 2006).

A molécula do colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas (unidades α), as quais formam uma tripla hélice e apresentam sequências repetidas de aminoácidos representadas por Gly-X-Y, onde X e Y são comumente prolina e hidroxiprolina respectivamente (VAN DER REST & GARRONE, 1991; VELLEMAN, 2000; GELSE *et*

al., 2003; KJAER, 2004). A estabilidade da molécula de colágeno é baseada em ligações cruzadas intra e intermoleculares (KJAER, 2004), sendo que a presença de grandes quantidades dessas ligações confere ao tendão força tênsil, tornando-o altamente resistente ao estresse mecânico (ESQUISATTO *et al.*, 2003).

Em contraste, a elastina presente nos tendões confere extensibilidade (BAILEY, 2001) e contribui para flexibilidade do tecido, constituindo aproximadamente 2% da sua massa seca (O'BRIEN, 1997). A baixa proporção de elastina é responsável pela baixa elasticidade do tendão, sendo que a elasticidade permite aos tendões resistirem à tração (HAYEM, 2001) caso contrário, o tecido poderia se alongar excessivamente com a contração muscular, impossibilitando o movimento.

Os proteoglicanos compõem aproximadamente 1% do peso seco dos tendões (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985; PARKINSON *et al.*, 2011) e são formados por uma cadeia protéica na qual se ligam vários glicosaminoglicanos (GAGs). As propriedades físicas dos proteoglicanos são ditadas pela presença de um grande número de GAGs carregados negativamente, que atraem íons e moléculas de água para o tecido, contribuindo com as propriedades de compressão (KOOB & VOGEL, 1987; KIRKENDALL & GARRETT, 1997; VELLEMAN, 2000; MELLO *et al.*, 2007), além de serem importantes para estabilização e fibrilogênese do colágeno (HEDBOM & HEINEGÅRD, 1989; KANNUS, 2000; PARKINSON *et al.*, 2011), a qual é reduzida com o envelhecimento (SILVER *et al.*, 2003).

Em um mesmo tendão é possível observar a presença de regiões sob tensão e tensão/compressão (BENJAMIN & RALPHS, 2000). Quando o tendão envolve uma extremidade óssea, ele se altera para se adaptar ao atrito e forças de compressão (CARVALHO, 1995), sendo caracterizado por uma matriz extracelular diferente que se assemelha a cartilagens em relação a síntese de proteoglicanos e presença de colágeno tipo II, apresentando uma estrutura fibrocartilaginosa (ESQUISATTO *et al.*, 2007). Nessa região, os proteoglicanos são em sua maioria chamados de grandes proteoglicanos, como agregam e versicam, o que confere resistência ao tecido (VOGEL *et al.*, 1994), sendo sua síntese estimulada pela compressão (FRIZZIERO *et al.*, 2011). Em contraste, regiões que estão sujeitas apenas a forças de tensão, contêm pequenas quantidades de proteoglicanos

(KOOB & VOGEL, 1987), sendo 80% decorim, um pequeno proteoglicano rico em leucina, estando também presentes outros pequenos proteoglicanos incluindo fibromodulim, biglicam e lumicam (PARKINSON *et al.*, 2011), bem como recentemente observado queratocam (REES *et al.*, 2009).

O fibromodulim possui resíduos de leucina em posições conservadas, de forma que as repetições têm sido implicadas nas suas interações. Sugere-se que essas repetições podem interagir com a membrana plasmática (OLDBERG *et al.*, 1989), como por exemplo, na superfície de plaquetas, onde repetições de leucina da proteína GPIb ligam-se ao fator von Willebrand e a trombina (TITANI *et al.*, 1987). A função da repetição de leucina no fibromodulim ainda é desconhecida, no entanto a relação estrutural e funcional com o decorim indica um papel na organização do colágeno (OLDBERG *et al.*, 1989). O decorim, ligado a uma tripla hélice de colágeno, possui importante função na formação do arranjo dessas moléculas dentro das microfibrilas, impedindo a sua fusão lateral (WEBER *et al.*, 1996). De acordo com Dourte e colaboradores (2012), tendões que não possuem decorim apresentaram diminuição significativa no diâmetro da fibrila, apesar de não manifestarem quaisquer alterações mecânicas. Além da sua função na fibrilogênese, o decorim parece ser importante também na organização do tecido durante o desenvolvimento, em reparos de feridas (DEL SANTO JR *et al.*, 2000) e na regulação da proliferação celular, podendo estar associado a fatores de crescimento, apresentando dessa forma função regulatória na matriz extracelular (OLDBERG *et al.*, 1989). O decorim parece desempenhar também importante papel na viscoelasticidade do tendão (DOURTE *et al.*, 2012), assim como o biglicam (DOURTE *et al.*, 2013), enquanto o lumicam tem sido descrito durante a cicatrização de feridas (SAIKA *et al.*, 2000).

Além de colágeno e proteoglicanos, as proteínas não colagênicas também estão presentes na matriz extracelular do tendão, compreendendo 0,5% do seu peso úmido (ALMEIDA *et al.*, 2010) sendo a COMP (DiCESARE *et al.*, 1994), a tenascina e a fibronectina (JÓZSA & KANNUS, 1997) algumas dessas proteínas. Essas moléculas possuem propriedades para se ligarem em outras moléculas e/ou superfícies celulares (KANNUS *et al.*, 1998), sendo importantes para interação com outros componentes da

matriz extracelular como elastina e colágeno tipo IX ou VI (CHIQUET-EHRISMANN *et al.*, 1991).

Em tendões normais existe um equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos, o qual é mantido por dois grupos de proteínas: as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (DAHLGREN *et al.*, 2007). As metaloproteinases são responsáveis pelo remodelamento da matriz (MARQUETI *et al.*, 2008), assim como pela degradação de colágeno, proteoglicanos (RILEY, 2008) e elastina (JANSSENS & LIJNEN, 2006). A família de MMPs pode ser dividida de acordo com sua especificidade ao substrato e/ou estrutura, como por exemplo, as colagenases e as gelatinases (SHARMA & MAFFULLI, 2005; VANHOUTTE *et al.*, 2006; KOLÁČNÁ *et al.*, 2007). Como MMPs degradam componentes da matriz extracelular, é essencial a prevenção da degradação excessiva, sendo essa função realizada pelas TIMPs, um grupo de proteínas endógenas que se ligam às MMPs bloqueando o acesso aos substratos e regulando a atividade da matriz extracelular (VANHOUTTE *et al.*, 2006). Perdas degenerativas da integridade funcional associadas à idade se desenvolvem a partir de mudanças sutis e efeitos cumulativos na matriz extracelular. Dudhia e coautores (2007) hipotetizam que tendões envelhecidos falham devido a danos cumulativos resultantes da combinação da diminuição do reparo da matriz e fragmentação de suas proteínas, induzidas principalmente por sobrecargas crônicas.

Durante o desenvolvimento, o tendão sofre constante remodelamento em resposta a mudanças das demandas mecânicas (BAILEY *et al.*, 1998), de forma que sua estrutura e composição bioquímica serão alteradas para promover seu funcionamento sob novas condições (YOON & HALPER, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2010). No envelhecimento também ocorre tais mudanças, incluindo modificações em macromoléculas da matriz extracelular e/ou em suas interações com outros componentes, contribuindo para alterações nas propriedades viscoelásticas e morfologia dos tendões (ESQUISATTO *et al.*, 2007).

As características estruturais dos tendões estão relacionadas com a matriz extracelular fibrosa e muitos eventos associados com a idade estão vinculados à molécula de colágeno (ESQUISATTO *et al.*, 2003). Cetta e colaboradores (1982) sugerem que diferentes interações entre colágeno e proteoglicanos ocorrem durante o envelhecimento,

assim como aumento da quantidade de *cross-links*, o qual está relacionado com a biomecânica do tecido (JIANG *et al.*, 2000; DRESSLER *et al.*, 2002), modificando sua rigidez (KJAER, 2004), aumento da quantidade de moléculas de colágeno, que se tornam mais compactas e orientadas, e diminuição da síntese de enzimas colagenolíticas (ESQUISATTO *et al.*, 2007). Diminuição nos conteúdos de GAGs, glicoproteínas, água, fibras elásticas e ainda ocorrência de calcificação também já foram descritas (IPPOLITO *et al.*, 1980; CETTA *et al.*, 1982; KANNUS *et al.*, 2005).

A calcificação é baseada em parte, pela interação do colágeno com os minerais, sendo que a mesma parece envolver a nucleação e aumento na quantidade de mineral, em associação com as superfícies da estrutura do colágeno (LANDIS *et al.*, 1993; SIPERKO & LANDIS, 2001). Assim os constituintes orgânicos e em grande parte proteicos desse tecido, são substituídos por uma matriz inorgânica (LANDIS & SILVER, 2002). Observações morfológicas indicam que a mineralização ocorre nas proximidades do centro do tendão (SIPERKO & LANDIS, 2001), onde há células com aumento de retículo endoplasmático, de complexo de Golgi e presença de vesículas contendo cálcio e fosfato (SILVER *et al.*, 2003). Essas vesículas brotam da membrana plasmática e são liberadas para a matriz orgânica pré-mineralizada, provocando a deposição mineral em locais específicos (RONCHETTI *et al.*, 2013). A calcificação em aves parece ser um processo adaptativo desenvolvido para prevenir possíveis lesões nos tendões, de forma que eles se tornam mais resistentes e impedem a distensão da região sob a ação de forças, podendo resistir ao aumento dessas forças durante o movimento (BLEDSOE *et al.*, 1993; BLEDSOE *et al.*, 1997).

Com base na literatura pôde ser observado que os tendões demonstram alterações bioquímicas que envolvem a matriz extracelular com o avanço da idade. Deste modo, a investigação de tendões de frangos durante o processo de desenvolvimento, maturação e envelhecimento oferece um excelente modelo biológico para o estudo de suas adaptações bioquímicas e funcionais requeridas em cada etapa.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os tendões calcâneo (CT) e flexor digital superficial (SDFT) de frangos em seus aspectos estruturais e bioquímicos visando correlacionar a composição da matriz extracelular e a estrutura dos tendões à sua fisiologia durante o envelhecimento.

Objetivos Específicos

- Analisar a organização da matriz extracelular do CT e do SDFT em diferentes idades.
- Através de métodos bioquímicos (cromatografia e eletroforese) analisar a atividade do fibromodulim e do decorim em diferentes idades.
- Analisar a atividade das metaloproteinases no CT e SDFT em diferentes idades.

REFERÊNCIAS

- ADDIS, P.R.; LAWSON, S.E.M. The role of tendon stiffness in development of equine locomotion with age. **Equine Vet J**, v. 38, p.556-560, 2010.
- ALMEIDA, F.M.; TOMIOSSO, T.C.; BIANCALANA, A.; MATTIELLO-ROSA S.M.; VIDAL, B.C.; GOMES, L.; PIMENTEL, E.R. Effects of stretching on morphological and biochemical aspects of the extracellular matrix of the rat calcaneal tendon. **Cell Tissue Res**, v. 342, n. 1, p.97-105, 2010.
- BAILEY, A.J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 7, p.735-755, 2001.
- BAILEY, A.J.; PAUL, R.G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mech Ageing Dev**, v. 106, n. 1-2, p.1-56, 1998.
- BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. The cell and development biology of tendons and ligaments. **Int Rev Cytol**, v. 196, p.85-130, 2000.
- BLEDSON, A.H.; RAIKOW, R.J.; CROWELL, L.S. Intraspecific variation and evolutionary reduction of tendon ossification in dendrocincla woodcreepers. **Condor**, v. 99, p.503-511, 1997.
- BLEDSON, A.H.; RAIKOW, R.J.; GLASGOW, A.G. Evolution and functional significance of tendon ossification in woodcreepers. **J Morpho**, v. 215, n. 3, p.289-300, 1993.

- BUCKWALTER, J.A.; WOO, S.L.; GOLDBERG, V.M.; HADLEY, E.C.; BOOTH, F.; OEGEMA, T.R.; EYRE, D.R. Soft-tissue aging and musculoskeletal function. **J Bone Joint Surg Am**, v. 75, n. 10, p.1533-1548, 1993.
- CARVALHO, H.F. Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. **J Theor Biol**, v. 172, n. 3, p.293-297, 1995.
- CASTRO, P.; GIRI, D.; LAMB, D.; ITTMANN, M. Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **Prostate**, v. 55, n. 1, p.30-38, 2003.
- CETTA, G.; TENNI, R.; ZANABONI, G.; de LUCA, G.; IPPOLITO, E.; de MARTINO, C.; CASTELLANI, A.A. Biochemical and morphological modifications in rabbit Achilles tendon during maturation and ageing. **Biochem J**, v. 204, n. 1, p.61-67, 1982.
- CHIQUET-EHRISMANN R.; MATSUOKA, Y.; HOFER, U.; SPRING, J.; BERNASCONI, C.; CHIQUET, M. Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. **Cell Regul**, v. 2, n. 11, p.927-938, 1991.
- CRIBB, A.M.; SCOTT, J.E. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen:proteoglycan interactions in stressed tendon. **J Anat**, v. 187, p.423-428, 1995.
- DAHLGREN, L.A. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**, DOI:10.1053/j.ctep.2007.08.002, 2007.
- DEL SANTO JR, M.; MARCHES, F.; NG, M.; HINTON, R.J. Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage. **Arch Oral Biol**, v. 45, n. 6, p.485-493, 2000.

- DICESARE, P.; HAUSER, N.; LEHMAN, D.; PASUMARTI, S.; PAULSSON, M.
Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon.
FEBS Lett, v. 354, n. 2, p. 237-240, 1994.
- DORIA, E.; BUONOCORE, D.; FOCARELLI, A.; MARZATICO, F. Relationship
between human aging muscle and oxidative system pathway. **Oxid Med Cell Longev**,
DOI: 10.1155/2012/830257, 2012.
- DOURTE, L.M.; PATHMANATHAN, L.; JAWAD, A.F.; IOZZO, R.V.;
MIENALTOWSKI, M.J.; BIRK, D.E., SOSLOWSKY, L.J. Influence of decorin on the
mechanical, compositional, and structural properties of the mouse patellar tendon. **J
Biomech Eng**, DOI: 10.1115/1.4006200, 2012.
- DOURTE, L.M.; PATHMANATHAN, L.; MIENALTOWSKI, M.J.; JAWAD, A.F.;
BIRK, D.E.; SOSLOWSKY, L.J. Mechanical, compositional, and structural properties
of the mouse patellar tendon with changes in biglycan gene expression. **J Orthop Res**,
DOI: 10.1002/jor.22372, 2013.
- DRESSLER, M.R.; BUTLER, D.L.; WENSTRUP, R.; AWAD, H.A.; SMITH, F.;
BOIVIN, G.P. A potential mechanism for age-related declines in patellar tendon
biomechanics. **J Orthop Res**, v. 20, n. 6, p.1315-1322, 2002.
- DUDHIA, J.; SCOTT, C.M.; DRAPER, E.R.C.; HEINEGÅRD, D.; PITSILLIDES, A.A.;
SMITH, R.K. Aging enhances a mechanically-induced reduction in tendon strength by
an active process involving matrix metalloproteinase activity. **Aging Cell**, v. 6, n. 4,
p.547-556, 2007.
- ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P.P.; PIMENTEL, E.R.; GOMES, L. Ultrastructural
characteristics of tensional regions and tendons from rats of different ages. **Braz J
Morfol Sci**, v. 20, n. 2, p.109-114, 2003.

- ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P.P.; PIMENTEL, E.R.; GOMES, L. The effect of age on the structure and composition of rat tendon fibrocartilage. **Cell Biol Int**, v. 31, n. 6, p.570-577, 2007.
- FESSEL, G.; GERBER, C.; SNEDEKER, J.G. Potential of collagen cross-linking therapies to mediate tendon mechanical properties. **J Shoulder Elbow Surg**, v. 21, n. 2, p.209-217, 2012.
- FRIZZIERO, A.; FINI, M.; SALAMANNA, F.; VEICSTEINAS, A.; MAFFULLI, N.; MARINI, M. Effect of training and sudden detraining on the patellar tendon and its enthesis in rats. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 19, p.12-20, 2011.
- FUKUTA, S.; OYAMA, M.; KAVALKOVICH, K.; FU, FH.; NIYIBIZI, C. Identification of types II, IX and X collagens at the insertion site of the bovine achilles tendon. **Matrix Biol**, v. 17, n. 1, p.65-73, 1998.
- GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens – structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, n. 12, p.1531-1546, 2003.
- GERSHON, H.; GERSHON, D. Paradigms in aging research: a critical review and assessment. **Mech Ageing Dev**, v. 117, n. 1-3, p.21-28, 2000.
- GOODMAN, H.J.; CHOUEKA, J. Biomechanics of the flexor tendons. **Hand Clin**, v. 21, n. 2, p.129-149, 2005.
- HAYEM, G. Tenology: a new frontier. **Joint Bone Spine**, v. 68, n. 1, p.19-25, 2001.
- HAYFLICK, L. Intracellular determinants of cell aging. **Mech Ageing Dev**, v. 28, n. 2-3, p.177-185, 1984.

- HEDBOM, E.; HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. **J Biol Chem**, v. 264, n. 12, p.6898-6905, 1989.
- IPPOLITO, E.; NATALI, P.G.; POSTACCHINI, F.; ACCINNI, L.; MARTINO, C. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. **J Bone Joint Surg Am**, v. 62, n. 4, p.583-598, 1980.
- JANSSENS, S.; LIJNEN, H.R. What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p.585-594, 2006.
- JIANG, S.T.; LIAO, K.K.; LIAO, M.C.; TANG, M.J. Age effect of type I collagen on morphogenesis of Mardin-Darby canine kidney cells. **Kidney Int**, v. 57, n. 4, p.1539-1548, 2000.
- JÓZSA, L.G., KANNUS, P. **Human tendons. Anatomy, Physiology and Pathology**. Champaign: Human Kinetics, 1997. 574p.
- KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports**, v. 10, n. 6, p.312-320, 2000.
- KANNUS, P.; JOZSA, L.; JÄRVINEN, T.A.H.; JÄRVINEN, T.L.N.; KVIST, M.; NATRI, A.; JÄRVINEN, M. Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. **Histochem J**, v. 30, n. 11, p.799-810, 1998.
- KANNUS, Pekka; PAAVOLA, Mika; JÓZSA, László. Aging and degeneration of tendons. In: MAFFULLI, N.; RENSTRÖM, P.; LEADBETTER, W.B. (ed.). **Tendon injuries**. London: Springer, 2005. p. 25- 31.

- KAVATHIA, N.; JAIN, A.; WALSTON, J.; BEAMER, B.A.; FEDARKO, N.S. Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. **Aging (Albany NY)**, v. 1, n. 7, p.652-663, 2009.
- KIRKENDALL, D.T.; GARRETT, W.E. Function and biomechanics of tendons. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, n. 2, p.62-66, 1997.
- KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**, v. 84, n. 2, p.649-698, 2004.
- KOLÁČNÁ, L., BAKEŠOVÁ, J., VARGA, F., KOŠŤÁKOVÁ, E., PLÁNKA, L., NEČAS, A., LUKÁŠ, D., AMLER, E., PELOUCH, V. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. **Physiol Res**, v. 56, n. 1, p.51-60, 2007.
- KONGSGAARD, M.; QYORTRUP, K.; LARSEN, J.; AAGAARD P.; DOESSING, S.; HANSEN, P.; KJAER, M.; MAGNUSSON, S.P. Fibril morphology and tendon mechanical properties in patellar tendinopathy: effects of heavy slow resistance training. **Am J Sports Med**, v. 38, n. 4, p.749-756, 2010.
- KOOB, T.J., VOGEL, K.G. Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. **Biochem J**, v. 246, n. 3, p.589-598, 1987.
- KRTOLICA, A.; PARRINELLO, S.; LOCKETT, S.; DESPREZ, P.Y.; CAMPISI, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p.12072-12077, 2001.

- LANDIS, W.J.; SILVER, F.H. The structure and function of normally mineralizing avian tendons. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n.4, p.1135-1157, 2002.
- LANDIS, W.J.; SONG, M.J.; LEITH, A; McEWEN, L.; McEWEN, B.F. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. **J Struct Biol**, v. 110, n. 1, p.39-54, 1993.
- LIONAKI, E.; MARKAKI, M.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy and ageing: insights from invertebrate model organisms. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 1, p.413-428, 2012.
- LOMBARD, D.B.; CHUA, KF.; MOSTOSLAVSKY, R.; FRANCO, S.; GOSTISSA, M.; ALT, F.W. DNA repair, genome stability, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p.497-512, 2005.
- MAFTAH, A.; RATINAUD, M.H.; DUMAS, M.; BONTÉ, F.; MEYBECK, A.; JULIEN, R. Human epidermal cells progressively lose their cardiolipins during ageing without change in mitochondrial transmembrane potential. **Mech Ageing Dev**, v. 77, n. 2, p.83-96, 1994.
- MAGANARIS C.N.; PAUL, J.P. Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon. **J Biomech**, v. 35, n. 12, p.1639-1646, 2002.
- MARQUETI, R.C.; PRESTES, J.; PASCHOAL, M.; RAMOS, O.H.P.; PEREZ, S.E.A.; CARVALHO, H.F.; SELISTRE-de-ARAÚJO, H.S. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol**, v. 104, n. 6, p.1087-1093, 2008.

- MASORO, E.J. Biology of aging: facts, thoughts and experimental approaches. **Lab Invest**, v. 65, n. 5, p.500-510, 1991.
- MELLO, M.L.; MICHELACCI, Y.M.; STOCKERT, J.C.; VIDAL, B.C. Optical anisotropy of alcian blue-stained acid glycosaminoglycans. **Acta Histochem**, v. 109, n. 1, p.78-85, 2007.
- MENDEZ, M.V.; STANLEY, A.; PARK, H.Y.; SHON, K.; PHILLIPS, T.; MENZOIAN, J.O. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. **J Vasc Surg**, v. 28, n. 5, p.876-883, 1998.
- MINAMINO, T.; MIYAUCHI, H.; YOSHIDA, T.; ISHIDA, Y.; YOSHIDA, H.; KOMURO, I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. **Circulation**, v. 105, n. 13, p.1541-1544, 2002.
- O'BRIEN, M. Structure and metabolism of tendons. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, n. 2, p.55-61, 1997.
- OLDBERG, A.; ANTONSSON, P.; LINDBLOM, K.; HEINEGÅRD, D. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). **The EMBO Journal**, v. 8, n. 9, p.2601-2604, 1989.
- PARKINSON, J.; SAMIRIC, T.; ILIC, M.Z.; COOK, J.; HANDLEY, C.J. Involvement of proteoglycans in tendinopathy. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 11, n. 2, p.86-93, 2011.
- RAJAWAT, Y.S.; HILIOTI, Z.; BOSSIS, I. Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. **Ageing Res Rev**, v. 8, n. 3, p.199-213, 2009.

- REDAELLI, A.; VESENTINI, S.; SONCINI, M.; VENA, P.; MANTERO, S.; MONTEVECCHI, F.M. Possible role of decorin glycosaminoglycans in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons – a computational study from molecular to microstructural level. **J Biomech**, v. 36, n. 10, p.1555-1569, 2003.
- REES, S.G.; WAGGETT, A.D.; KERR, B.C.; PROBERT, J.; GEALY, E.C.; DENT, C.M.; CATERSON, B.; HUGHES, C.E. Immunolocalisation and expression of keratocan in tendon. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17, n. 2, p.276-279, 2009.
- RILEY, G. Tendinopathy - from basic science to treatment. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 4, n. 2, p.82-89, 2008.
- RONCHETTI, I.; BORALDI, F.; ANNOVI, G.; CIANCIULLI, P.; QUAGLINO, D. Fibroblast involvement in soft connective tissue calcification. **Front Genet**, DOI: 10.3389/fgene.2013.00022, 2013.
- SAIKA, S.; SHIRAIISHI, A.; SAIKA, S.; LIU, C.Y.; FUNDERBURGH, J.L.; KAO, C.W.C.; CONVERSE, R.L.; KAO, W.W.Y. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. **J. Biol. Chem**, v. 275, n. 4, p. 2607-2612, 2000.
- SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. ER stress and hormetic regulation of the aging process. **Ageing Res Rev**, v. 9, n. 3, p.211-217, 2010.
- SHADWICK, R.E. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. **J Appl Physiol**, v. 68, n. 3, p.1033-1040, 1990.
- SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 1, p.187-202, 2005.

- SILVER, F.H.; FREEMAN, J.W.; SEEHRA, G.P. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. **J Biomech**, v. 36, n. 10, p.1529-1553, 2003.
- SILVER, F.H.; LANDIS, W.J. Viscoelasticity, Energy Storage and Transmission and Dissipation by Extracellular Matrices in Vertebrates. In: FRATZL, P. (ed.). **Collagen: Structure and Mechanics**. Germany: Springer, 2008. p.133-154.
- SIPERKO, L.M.; LANDIS, W.J. Aspects of mineral structure in normally calcifying avian tendon. **J Struct Biol**, v. 135, n. 3, p.313-320, 2001.
- STARODUBTSEVA, M.N. Mechanical properties of cells and ageing. **Ageing Res Rev**, v. 10, n. 1, p.16-25, 2011.
- SZILARD, L. On the nature of the aging process. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 45, n. 1, p.30-45, 1959.
- TITANI, K.; TAKIO, K.; HANDA, M.; RUGGERI, Z.M. Amino acid sequence of the von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. **Proc Natl Acad Sci of the USA**, v. 84, n. 16, p.5610-5614, 1987.
- TUITE, D.J.; RENSTRÖM, P.A.F.H.; O'BRIEN, M. The aging tendon. **Scand J Med Sci Sports**, v. 7, n. 2, p.72-77, 1997.
- VAN DER REST, M.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEB J**, v.5, n.13, p.2814-2823, 1991.
- VANHOUTTE, D.; SCHELLINGS, M.; PINTO, Y.; HEYMANS, S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p.604-613, 2006.

- VÉLEZ-delVALLE, C.; MARSCH-MORENO, M.; CASTRO-MUÑOZLEDO, F.; BOLIVAR-FLORES, Y.J.; KURI-HARCUCH, W. Fibromodulin gene is expressed in human epidermal keratinocytes in culture and in human epidermis in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 371, n.3, p.420-424, 2008.
- VELLEMAN, S. G. The role of the extracellular matrix in skeletal development. **Poult Sci**, v. 79, n. 7, p.985-989, 2000.
- VOGEL, K.G.; HEINEGÅRD, D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. **J Biol Chem**, v. 260, n. 16, p.9298-9306, 1985.
- VOGEL, K.G.; SANDY, J.D.; POGÁNY, G.; ROBBINS, J.R. Aggrecan in bovine tendon. **Matrix Biol**, v. 14, n. 2, p.171-179, 1994.
- WALTER, C.A.; GRABOWSKI, D.T.; STREET, K.A.; CONRAD, C.C.; RICHARDSON A. Analysis and modulation of DNA repair in aging. **Mech Ageing Dev**, v. 98, n. 3, p.203-222, 1997.
- WANG, J.H. Mechanobiology of tendon. **J Biomech**, v. 39, n. 9, p.1563-1582, 2006.
- WEBER, I.T.; HARRISON, R.W.; IOZZO, R.V. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. **J Biol Chem**, v. 271, n. 50, p.31767-31770, 1996.
- YOON, J.H.; HALPER, J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 5, n. 1, p.22-34, 2005.

Artigo I

Efeito da idade na matriz extracelular do tendão calcâneo de frango

Haline Ballesterio Fêo¹, Adriano Biancalana², Wilson Romero Nakagaki¹, Andrea Aparecida de Aro¹, Laurecir Gomes^{1*}

¹ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, IB, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Av. Bertrand Russel, s/no Cx. Postal 6109 13083-865, Campinas, SP, Brasil

² Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Pará - UFPA, Campus Marajó – Soure, Ilha de Marajó, Pará, Brasil

* Correspondent Author

Laurecir Gomes

Resumo

Os tendões são estruturas que transmitem forças de tração dos músculos aos ossos, promovendo o movimento articular. As regiões dos tendões que envolvem uma extremidade óssea se adaptam às forças de compressão, originando uma estrutura fibrocartilaginosa, com células semelhantes à condrócitos. Durante o envelhecimento, ocorrem modificações nas macromoléculas da matriz extracelular dos tendões, assim como em suas interações com outros componentes, alterando sua morfologia. Com o objetivo de estudar o efeito do envelhecimento em tendões, frangos da linhagem Pedrês foram sacrificados com 1, 5 e 8 meses de idade e tiveram o tendão calcâneo (CT) dividido em regiões de tensão/compressão (*p*) e de tensão (*d*). Em todas as idades a análise morfológica da região *p* mostrou a presença de uma fibrocartilagem. Na parte central da fibrocartilagem foi desenvolvido um coxim gorduroso que se acentuou com o passar da idade, com consequente diminuição da metacromasia. A região *d* apresentou fibras de colágeno alinhadas e células alongadas, características típicas dessa região. Animais com 5 e 8 meses apresentaram aumento da atividade da MMP-2 e MMP-9 comparados aos animais de 1 mês, em ambas as regiões. No SDS-PAGE, componentes com migração eletroforética semelhante ao decorim e fibromodulim aumentaram com o envelhecimento, principalmente na região *d*. Os resultados deste trabalho mostram que há diferenças bioquímicas e estruturais neste tendão quando analisamos regiões de compressão e de tensão em animais de diferentes idades. Assim, essas alterações marcam uma adaptação às necessidades de remodelamento requeridas pelo tendão durante o envelhecimento.

Palavras-chave: envelhecimento, fibrocartilagem, MMP, fibromodulim, coxim gorduroso, colágeno.

1. Introdução

Os tendões são estruturas de tecido conjuntivo denso que transmitem forças de tração dos músculos aos ossos (Józsa e Kannus 1997; Benjamin e Ralphs 2000; Almeida et al. 2010), promovendo o movimento articular (Kannus 2000). Em frangos, a contração do músculo gastrocnêmio permite ao tendão calcâneo (CT), que é laminar e biarticular, estender a articulação do tornozelo e, secundariamente, influenciar a flexão plantar dos dedos do pé. O CT se origina a partir da fusão das inserções aponeuróticas da cabeça do músculo gastrocnêmio e sua forma laminar resulta da sua inserção ao longo do osso tarsometatarsico (Nakagaki et al. 2007).

Os tendões contêm células cercadas por uma abundante matriz extracelular (MEC), especialmente rica em fibrilas de colágeno tipo I, orientadas ao longo do eixo mais longo do tendão (Tuite et al. 1997; Benjamin e Ralphs 2000). Além do colágeno tipo I, os tipos II, III e V também são encontrados, embora em menores quantidades (Silver e Landis 2008). O colágeno possui grande quantidade de ligações cruzadas em sua molécula, o que confere ao tendão força tênsil tornando-o altamente resistente ao estresse mecânico (Esquisatto et al. 2003). Outro componente da MEC é o proteoglicano, que consiste em uma cadeia protéica na qual se ligam vários GAGs (Kirkendall e Garrett 1997; Velleman 2000), encontrados especialmente em regiões submetidas a forças de compressão (Vogel et al. 1994). Decorim (Dec) e o fibromodulim (FM) são pequenos proteoglicanos que participam na estabilização e fibrilogênese do colágeno (Hedbom e Heinegård 1989; Kannus 2000; Parkinson et al. 2011), a qual se encontra reduzida com o envelhecimento (Silver et al. 2003).

Além de células, colágeno e proteoglicanos, o tendão possui proteínas não colagênicas as quais possuem propriedades para se ligarem em outras moléculas e/ou superfícies celulares (Kannus et al. 1998). Essas proteínas são importantes para interação com outros componentes da MEC, como elastina e colágeno tipo IX ou VI (Chiquet-Ehrismann et al. 1991). O tendão possui um *turnover* que varia de meses a anos (Bailey 2001), cujo remodelamento da sua matriz é dependente da ação de metaloproteinases (MMPs) (Kjaer 2004). As MMPs são proteínas que apresentam um papel importante na

degradação do colágeno, proteoglicanos (Riley 2008) e elastina (Janssens e Lijnen 2006). Tradicionalmente, as MMPs são subdivididas em colagenases, gelatinases, stromelisinases e MMPs do tipo transmembrana de acordo com a especificidade pelo substrato, localização celular e estrutura primária (Clark et al. 2008). As gelatinases, MMP-2 e MMP-9, são responsáveis pelo início da degradação do colágeno na MEC, de forma que moléculas de colágeno fragmentadas e denaturadas serão rapidamente degradadas durante os processos de *turnover* (Collier et al. 1988; Wilhelm et al. 1989; Kjaer 2004).

Em um mesmo tendão é possível observar regiões sob tensão e tensão/compressão (Benjamin e Ralphs 2000). A tensão ocorre quando as forças aplicadas são colineares e agem em direções opostas. A compressão está presente quando as forças aplicadas são colineares e age uma no sentido da outra, como por exemplo, a própria força exercida pelo peso de um animal sobre a sua face plantar (Gould III 1993). Características ultra-estruturais das células, da disposição dos feixes de colágeno e da matriz como um todo na área sob tensão/compressão são diferentes das características encontradas em regiões onde só existem forças de tensão, de forma que, as células nessas regiões, são sensíveis e respondem às mudanças de forças biomecânicas (Gillard et al. 1979; Merrilees e Flint 1980). Quando o tendão contorna uma região óssea, ele se altera para se adaptar ao atrito e às forças de compressão. Nessas regiões há alterações composicionais e estruturais da matriz, com presença de uma estrutura fibrocartilaginosa, e de células com morfologia semelhante à dos condrócitos (Vogel e Koob 1989; Carvalho 1995).

Durante o desenvolvimento, o tendão sofre constante remodelamento em resposta a mudanças das demandas mecânicas (Bailey et al. 1998), de forma que sua estrutura e composição bioquímica serão modificadas para promover seu funcionamento sob novas condições (Buchanan e Marsh 2002; Almeida et al. 2010). No envelhecimento também ocorre tais mudanças, incluindo modificações em macromoléculas da MEC e/ou em suas interações com outros componentes, contribuindo para alterações nas propriedades viscoelásticas e morfologia dos tendões (Esquisatto et al. 2007).

Geralmente, o conteúdo total de colágeno aumenta com a idade (Shadwick 1990), as moléculas sofrem maior compactação, as fibras se tornam cristalinas (Baer et al. 1988) e as enzimas colagenolíticas sofrem uma redução na sua síntese (O'Brien 1997). No entanto,

outras alterações foram observadas durante o envelhecimento, tais como, diminuição nos conteúdos de GAGs, água e teor de elastina (Ippolito et al. 1980). O estudo de diferentes idades em frangos domésticos (com 6, 8 e 12 semanas), feito por Curwin et al. (1994), demonstrou que a densidade de colágeno se altera de forma diferente para cada região do tendão estudado e o diâmetro das fibras de colágeno são maiores nos tendões mais velhos. De acordo com Esquisatto et al. (2007), a região de compressão do CT de ratos, também apresentou diferenças organizacionais com a idade, com aumento na espessura das fibras de colágeno nos animais de 30 e de 180 dias, seguida de uma diminuição nos animais de 730 dias de idade.

Deste modo, a investigação das características em tendões de frangos durante o processo de desenvolvimento, maturação e envelhecimento, oferece um excelente modelo biológico para o estudo de suas adaptações funcionais, bioquímicas e morfológicas. O objetivo do presente estudo foi investigar as alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem no CT de frangos com 1, 5 e 8 meses de idade.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção do Material

O CT foi retirado de frangos da linhagem Pedrês (*Gallus domesticus*) criados no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e sacrificados com 1, 5 e 8 meses de idade. O CT foi dividido em regiões de tensão/compressão ou região proximal (*p*) e de tensão ou região distal (*d*), conforme Nakagaki et al. (2007). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP) em 24 de Setembro de 2012. Protocolo 2839-1.

2.2 Análises de Microscopia Óptica

As regiões de tensão e compressão do CT, após a dissecação, foram fixadas em solução de formol a 10% em tampão Millonig pH 7.4, lavadas em água corrente, desidratadas em série alcoólica crescente em banhos de 15 min em álcool 70%, 80%, 90% e 100%, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em Paraplast. A partir dos blocos obtidos foram feitos cortes com 7 µm de espessura. Os cortes foram corados com azul de Toluidina (AT) 0.0025% em tampão Macllvaine pH 4.0 (Mello e Vidal, 2003), para analisar a presença de proteoglicanos, Xylidine Ponceau (XP) para colágeno (Mello e Vidal 1980) e Hematoxilina/Eosina (HE) para análise da morfologia geral tecidual.

2.3 Extração da Matriz Extracelular

Os componentes da matriz extracelular presentes nas regiões *p* e *d*, das diferentes idades, foram extraídos com 25 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4 M em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 5.8 contendo inibidores de protease (0.05 M EDTA e 1mM de PMSF) (Heinegård e Sommarin 1987), durante 24 horas a 4°C sob agitação constante. Após extração o material foi centrifugado a 20.000 RPM durante 60 minutos a 4°C (Centrífuga Beckaman - Rotor JA 20).

2.4 Fracionamento e análise

Amostras obtidas das duas regiões (*p* e *d*) nas 3 diferentes idades (1, 5 e 8 meses) foram submetidas a quantificação de proteínas segundo o método de Bradford (1976) com modificações, tendo albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura das amostras foi feita a 595 nm. Amostras contendo 3 mg de proteína foram dialisadas contra uréia 7 M em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 7.5. Em seguida, foram aplicadas a uma coluna de DEAE-Sephacel (4 x 1.5 cm) previamente equilibrada com o tampão acima. Após lavagem com o tampão descrito anteriormente, o material retido na coluna foi eluído com um gradiente de cloreto de sódio (0 – 1.5 M). Para cada fração coletada foi determinada a absorbância em 280 nm. Alíquotas com 114 µL de cada fração foram precipitadas com etanol e tampão acetato de sódio 1M pH 7.4. Após centrifugação, ao precipitado obtido de cada fração foi adicionado 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 % com ou sem β-mercaptoetanol 5% e incubadas durante 5 minutos a 96°C. As amostras foram analisadas em gel de SDS-Poliacrilamida 4 – 16% (SDS-PAGE) de acordo com Zingales (1984). Os géis foram impregnados com nitrato de prata segundo Blum et al. (1987).

2.5 Western blotting

Frações da cromatografia que apresentaram o componente polidisperso com 60 kDa foram precipitadas (3 x 114 µL) com etanol e tampão acetato de sódio 1 M pH 7.4. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% e depois transferidas para membrana de nitrocelulose de acordo com Towbin et al. (1979). Após transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada com soro total de coelho anti-fibromodulim de frango produzido em nosso laboratório (1:20), seguido de incubação com soro total de cabra anti-Ig de coelho marcado com peroxidase (1:500, Sigma). A reação foi desenvolvida com diaminobenzidino e H₂O₂.

2.6 Zimografia para gelatinases

Amostras do extrato total contendo 20 µg de proteínas foram preparadas e aplicadas em SDS-PAGE 10% contendo 0.1% de gelatina (Sigma-Aldrich). A eletroforese foi realizada à 4°C. A seguir o gel foi lavado com Triton X-100 a 2.5% e incubado a 37°C, sob agitação durante 21 horas em Tris-HCl (0.05 M pH 7.4, NaCl 0.1 M e azida sódica 0.03%). O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0.2% por 1 hora. A seguir o gel foi descorado com metanol (50%) e ácido acético (10%) para observação das bandas negativas resultantes da atividade das enzimas (Silva et al. 2008).

3. Resultados

3.1 Análise Morfológica

A morfologia do CT de frangos foi analisada levando em consideração uma fibrocartilagem (*p*) com duas regiões: uma que recebe forças de tensão na região distal da fibrocartilagem (*fd*), a qual está mais distante do osso, e uma outra região (proximal da fibrocartilagem) que recebe forças de tensão-compressão (*fp*), localizada mais próxima ao osso. Seguindo os parâmetros descritos anteriormente, as regiões do tendão foram analisadas separadamente com relação à organização histológica, de acordo com as diferentes idades.

Na figura 1, um esquema da fibrocartilagem dos animais com 8 meses ilustra como os cortes dessa região foram feitos, identificando a morfologia que se modifica à medida que se aproxima do osso. As figuras A, B, C e D representam a morfologia encontrada na parte central do tendão no sentido pósterio-anterior; enquanto que A', B', C' e D' representam a parte mais periférica da região fibrocartilaginosa. As figuras E e F foram elaboradas para melhor compreensão do que será observado na morfologia deste tendão, além de mostrar a localização do mesmo ao redor da articulação.

Podemos notar que as camadas mais afastadas do osso (Figura 1: A e A') apresentam estrutura bastante similar a uma região que sofre exclusivamente forças de tensão, com as fibras de colágeno alinhadas. À medida que os cortes se aprofundam (B e B') há o aparecimento de tecido fibrocartilaginoso entre as fibras de colágeno, o que compõe a estrutura central dessa região. Em uma camada mais profunda em direção ao osso (C e C') ocorre o aumento da região fibrocartilaginosa, onde as fibras de colágeno estão dispersas pelo tecido. Em B, B', C e C' há muitas células semelhantes à condrócitos e com núcleos corados fortemente pelo AT. Na porção próxima ao osso, na região central da fibrocartilagem (D), há o aparecimento de um tecido adiposo, onde podemos observar espaços celulares cercados por uma matriz metacromática. Na região periférica (D') observamos uma fibrocartilagem característica, constituída por uma rede de fibras de colágeno que se dispõem perpendicularmente às fibras alinhadas da periferia do tendão.

Na figura 2, a região *p* do CT das diferentes idades estudadas foram coradas com HE (A, D, G), XP (B, E, H) e AT (C, F, I). A coloração com HE mostra a presença de duas regiões distintas, independentemente da idade: uma região que apresenta células alongadas e enfileiradas, com núcleo acompanhando o formato da célula; ao passo que na outra região, bem distinta da anterior, são encontradas células com núcleos arredondados semelhantes à condrócitos, caracterizando assim uma região fibrocartilaginosa (A, D, G). A coloração com XP mostra a distribuição do colágeno que apresenta uma compactação maior de fibras na periferia da região fibrocartilaginosa, quando comparado com a região mais central, onde aparecem poucas fibras coradas dando lugar a uma fibrocartilagem (B, E, H). A coloração com AT detectou uma gradual substituição da região fibrocartilaginosa pelo coxim gorduroso com o envelhecimento, assim como diminuição da metacromasia (C, F, I).

Analisando a região *d* do CT que recebe forças de tensão, pode ser observado que nos animais de 1 mês (figura 3 A, B) o padrão de disposição das fibras de colágeno é de forma alinhada, com ondulações e com grande quantidade de células alongadas e enfileiradas. Essa região de tensão nos animais com 5 meses (figura 3 C, D) e 8 meses (figura 3 E, F) são muito semelhantes, mas apresentam diferenças marcantes com relação aos animais mais jovens (A). As fibras de colágeno estão mais compactadas e com poucas ondulações nos animais mais velhos (C, E). As células típicas dessa região apresentam núcleos alongados, embora grupos de células com núcleos mais arredondados foram frequentemente observados (D, F).

3.2 Análise Bioquímica

As frações obtidas pelo fracionamento em DEAE-Sephacel dos extratos provenientes dos tendões e analisadas em SDS-PAGE (figura 4A), apresentaram componentes que variaram entre 43 e 300 kDa em ambas regiões de todas as idades. Uma proteína em torno de 70 kDa e outra em torno de 60 kDa, apresentaram comportamentos eletroforéticos semelhantes ao decorim e fibromodulim, respectivamente. A proteína com 60 kDa, o fibromodulim, aumentou com o envelhecimento ficando mais evidente nos animais de 8 meses, principalmente na região *d*. Bandas polidispersas com peso em torno de 300 kDa desaparecem na presença de β -mercaptoetanol, sugerindo autoagregação do fibromodulim. Immunoblotting confirmou que o componente de 60kDa corresponde ao fibromodulim no SDS-PAGE (figura 4B).

As regiões *p* e *d* do CT analisadas separadamente em gel para zimografia (figura 5) mostram que em ambas as regiões houve um aumento das isoformas intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) da MMP-2 em animais de 5 e 8 meses, quando comparados aos animais de 1 mês. Com relação à isoforma ativa (82 kDa) da MMP-9, os animais de 5 e 8 meses também apresentaram maiores quantidades em relação aos animais de 1 mês.

4. Discussão

A função dos tendões no sistema músculo-esquelético é transmitir as forças de contração geradas pelo músculo aos ossos, proporcionando na maioria dos casos, a movimentação das juntas. A capacidade que os tendões apresentam de resistir às diferentes forças biomecânicas tais como tensão, torção, fricção e em casos especiais a compressão, tem uma relação direta com a composição e a organização estrutural da MEC (Viidik 1980). A combinação dessas forças em diferentes intensidades é capaz de promover alterações no citoesqueleto das células e provavelmente, ativar genes que irão desencadear uma resposta adaptativa das células (Slack et al. 1984; Giori et al. 1993).

O remodelamento do tendão ocorre de acordo com a demanda mecânica, assim as modificações observadas no presente trabalho são resultado de estímulos sofridos pelo tendão durante o envelhecimento. Os animais estudados não foram submetidos a qualquer tipo de exercício físico adicional, sendo portanto, considerados sedentários. Nossos resultados estão de acordo com Vogel e Koob (1989) e Carvalho e Felisbino (1999), que também identificaram uma região fibrocartilaginosa em tendões bovinos e rãs.

A presença de regiões fibrocartilaginosas em tendões parece estar relacionada em primeiro plano com a ação moduladora de forças compressivas. A variação no fluxo de fluidos durante o ciclo de compressão influenciaria o transporte de nutrientes para o interior do tecido fibroso (Manske et al. 1978; Manske e Lesker 1983; Hannafin e Arnoczky 1994), assim como as condições aeróbicas teciduais (Basset e Herrmann 1961). A literatura apresenta diversos trabalhos que investigam tendões que, em alguma região, suportam forças compressivas adicionais às forças de tensão. Adaptado à essas forças combinadas, o tecido fibroso passa a exibir alterações metaplásicas na região de contato com a estrutura compressora. A região é semelhante a uma fibrocartilagem, apresentando fibras de colágeno com espessura intermediária entre tendão e cartilagem, deposição de grande quantidade de proteoglicanos, assim como células com morfologia semelhante a dos condrócitos (Vogel e Koob 1989; Carvalho 1995).

Essas regiões fibrocartilaginosas, descritas em diferentes animais, apresentam diversidade fenotípica celular havendo variações nos seus aspectos composicionais e

estruturais (Rufai et al. 1992, Mills e Daniel 1993; Carvalho e Vidal 1994). Uma estrutura comum no tendão calcâneo de frangos e no tendão patelar de humanos é o coxim gorduroso espesso. Esta estrutura não faz parte do corpo do tendão sendo anatomicamente uma estrutura vizinha que facilita a distribuição de líquido sinovial e intervém na absorção de forças através da articulação do joelho (Clockaerts et al. 2010). Esse coxim está encapsulado por uma estrutura fibroelástica que se insere na camada mais profunda do tendão, e assim pode absorver até 25% da força de contato ocorrida em algum tipo de injúria sofrida pelo tendão, funcionando como uma estrutura mecanosensorial (Shaw et al., 2007). A co-localização de filamentos de actina e vinculina ao redor dos adipócitos indica a presença de contatos focais, que ligam mecanicamente os microfilamentos de actina à MEC através de receptores na membrana. Os sinais trocados entre células e MEC levaria o coxim a atuar como um amortecedor (Jahss et al. 1992). Desse modo a gordura contribui para dissipar o stress mecânico na interface tendão-osso (Benjamin et al. 2004).

Nossos resultados mostraram que na região *p* dos animais mais velhos, que sofre compressão e fricção do osso, pode ser observado o limite do coxim gorduroso, o qual ocupa a área central do tendão e é formado por células arredondadas. Nessas estruturas as células apresentam núcleo deslocado para a periferia e vesículas em seu interior que não são observadas em animais mais jovens. Vale ressaltar ainda que nos animais com 1 mês de idade, o tendão apresentou uma morfologia diferenciada na região *p*, com formação de fibrocartilagem na porção mais central. Ao passo que na região periférica, foram observadas células mais alongadas muito semelhantes às células presentes na região *d*. Nossos resultados mostraram ainda que durante o envelhecimento, houve o aparecimento de uma rede de fibrilas de colágeno no coxim gorduroso. Esses resultados estão de acordo com Jozsa e Kannus (1997), que verificaram em tendão a presença de células adiposas envoltas por uma fina rede de fibrilas de colágeno desorganizadas.

Intensa metacromasia na fibrocartilagem dos tendões foram observadas nos animais de 1 mês, indicando grande quantidade de proteoglicanos. A alta celularidade presente nesses tendões, assim como a metacromasia, demonstra que o tendão necessita da síntese de muitas moléculas para sua maturação. De acordo com Esquisatto et al. (2003), uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso foi observada em tendões de ratos

jovens, indicando intensa síntese protéica. Com o envelhecimento, a metacromasia diminuiu na região com células gordurosas, demonstrando alterações na síntese de alguns componentes de matriz durante a maturação. Os proteoglicanos participam na manutenção e regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno entre outros eventos teciduais (Iozzo e Murdoch 1996). Proteoglicanos ricos em dermatan sulfato foram encontrados em tendão de ratos jovens (Scott et al. 1981), enquanto que proteoglicanos ricos em queratan sulfato foram encontrados em tendão bovino adulto (Vogel e Heinegård 1985).

Nossos resultados mostraram a presença do fibromodulim em todas as idades e regiões analisadas, com ligeiro aumento nos animais de 8 meses na região **d**, sujeita às forças de tensão. Outro componente observado em SDS-PAGE, com migração eletroforética de 70 kDa, indica a possível presença de decorim nas regiões **p** e **d** de todas as idades. A literatura mostra a ação moduladora do fibromodulim e do decorim na fibrilogênese do colágeno e, conseqüentemente, no diâmetro dessas fibrilas (Vogel et al. 1984; Hocking et al. 1998). A presença de um componente de 300 kDa que desapareceu na presença de β -Me, sugere fortemente a autoagregação do fibromodulim. Este estado de autoagregação foi descrito por Gomes et al. (1996) em cartilagem de boi e de frango, relacionando essa autoagregação com a presença de pontes S-S presentes no fibromodulim, as quais desaparecem na presença do agente redutor.

O aumento na atividade das MMPs-2 e -9 com o envelhecimento pode estar relacionado com a hipótese de que tendões envelhecidos, ao sofrerem danos cumulativos provenientes de microlesões, combinados com uma diminuição da capacidade de reparo da matriz, sofram fragmentação de suas proteínas induzida por sobrecargas crônicas (Dudhia et al. 2007). Essas microlesões poderiam desencadear tanto rupturas como processos inflamatórios, os quais promoveriam a síntese dessas MMPs pelos macrófagos, neutrófilos ou mesmo pelos fibroblastos (Clutterbuck et al. 2010). Segundo Jacob (2003), a MMP-9 é liberada por macrófagos e neutrófilos em tecidos lesionados. Nossos dados corroboram ainda com Burke et al. (1994), que observou aumento na expressão de MMPs em células senescentes comparadas as células jovens. Yu et al. (2013), também comprovou que a atividade da MMP-2 e -9 em tenócitos *in vitro* aumentaram com a idade, fato que pode

contribuir com o aparecimento de tendinopatias ou rupturas tendíneas durante o envelhecimento.

Segundo Little et al. (2002), as MMPs parecem ser responsáveis pela proteólise do agreca em cartilagens, o que contribui para uma diminuição dos glicosaminoglicanos, levando a perda da função tecidual durante o envelhecimento. Esse estudo corrobora com a diminuição da metacromasia observada em nossos resultados nos animais mais velhos, indicando a degradação de glicosaminoglicanos. A presença de fibrocartilagem em tendões é considerada por alguns autores como um sítio provável de alterações degenerativas com o envelhecimento (Rooney 1994), somada a alguns fatores tais como: variações das forças que atuam sobre os tendões, os hábitos do animal, os diferentes ambientes de criação (Nakagaki et al. 2007; 2010), as variações na intensidade de exercício físico (Frizziero et al. 2011), entre outros fatores.

Em conclusão, nossos resultados mostram que o envelhecimento leva ao aparecimento de um coxim gorduroso na região central da fibrocartilagem do CT de frango, com diminuição da quantidade de glicosaminoglicanos e aumento da atividade de MMPs. Entretanto, estudos posteriores deverão ser realizados com o objetivo de elucidar se a presença do coxim gorduroso é resultado da ocorrência crônica de microlesões na região fibrocartilaginosa, cujo processo de reparo provavelmente se tornou deficiente com a idade; ou se o aparecimento do coxim gorduroso é resultado de uma adaptação biomecânica tecidual em resposta à intensa compressão do osso na região fibrocartilaginosa do tendão, devido à crescente demanda mecânica durante o envelhecimento do animal.

Agradecimentos: Este trabalho em parte foi apoiado pela FAPESP (2006/00044-4) e os autores agradecem à Capes pela bolsa de Haline Fêo.

FIGURAS E LEGENDAS

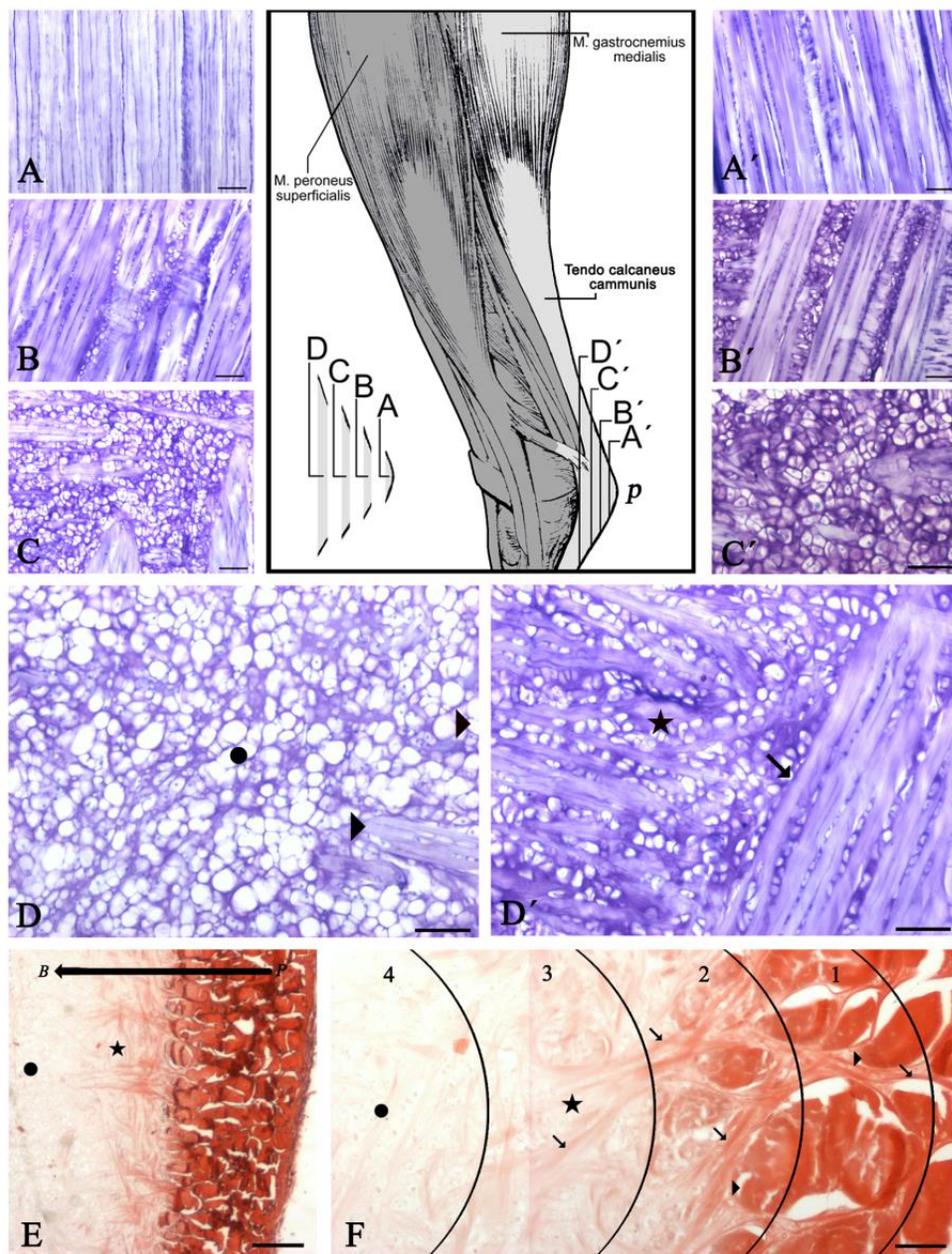


Figura - 1 - Localização anatômica da região que recebe forças de tensão-compressão (*p*) dos animais com 8 meses do CT de frango. O esquema mostra modificações morfológicas dessa região nos cortes longitudinais, em relação ao maior eixo do tendão em diferentes profundidades. As figuras **A**, **B**, **C**, **D** correspondem à região central, enquanto **A'**, **B'**, **C'**, **D'** correspondem a periferia do tendão. As figuras **A** e **A'**, apresentam estrutura similar a uma região que sofre exclusivamente forças de tensão, com as fibras de colágeno alinhadas. Em **B** e **B'**, há o aparecimento de tecido fibrocartilaginoso entre as fibras de colágeno, o que compõe a estrutura central dessa região. **C** e **C'** apresentam uma região fibrocartilaginosa, onde as fibras de colágeno se encontram dispersas pelo tecido. As figuras **D** e **D'** ilustram a constituição do tendão próximo ao osso, onde são observadas regiões distintas: em **D'** a seta (↔) indica uma região de transição das fibras de colágeno alinhadas para uma região de fibrocartilagem típica (★). Em **D** há uma região de transição (▶) da fibrocartilagem para o coxim gorduroso (●). Coloração: AT. Aumentos: a barra corresponde à 75 µm. (**E**, **F**) Corte transversal do CT na região proximal (*p*). Em **E** a seta maior indica o sentido do corte no tendão, da periferia (*P*) em direção ao osso (*B*). Em **F** as divisões 1, 2, 3 e 4 correspondem as diferentes estruturas observadas na periferia e região central do tendão, similar ao que é esquematizado em **A**, **B**, **C** e **D**, mas em um plano de corte transversal. Observe uma região de fibrocartilagem típica (★), o coxim gorduroso (●) e os feixes de colágeno (▶) envolvidos pelo epitendão (↔) que ancora esses feixes à região de fibrocartilagem. Coloração: XP. Aumento: a barra corresponde a 75 µm em A-D e A'-D', 300 µm em E e 75 µm em F. Figura adaptada de Ghetie et al. (1981)

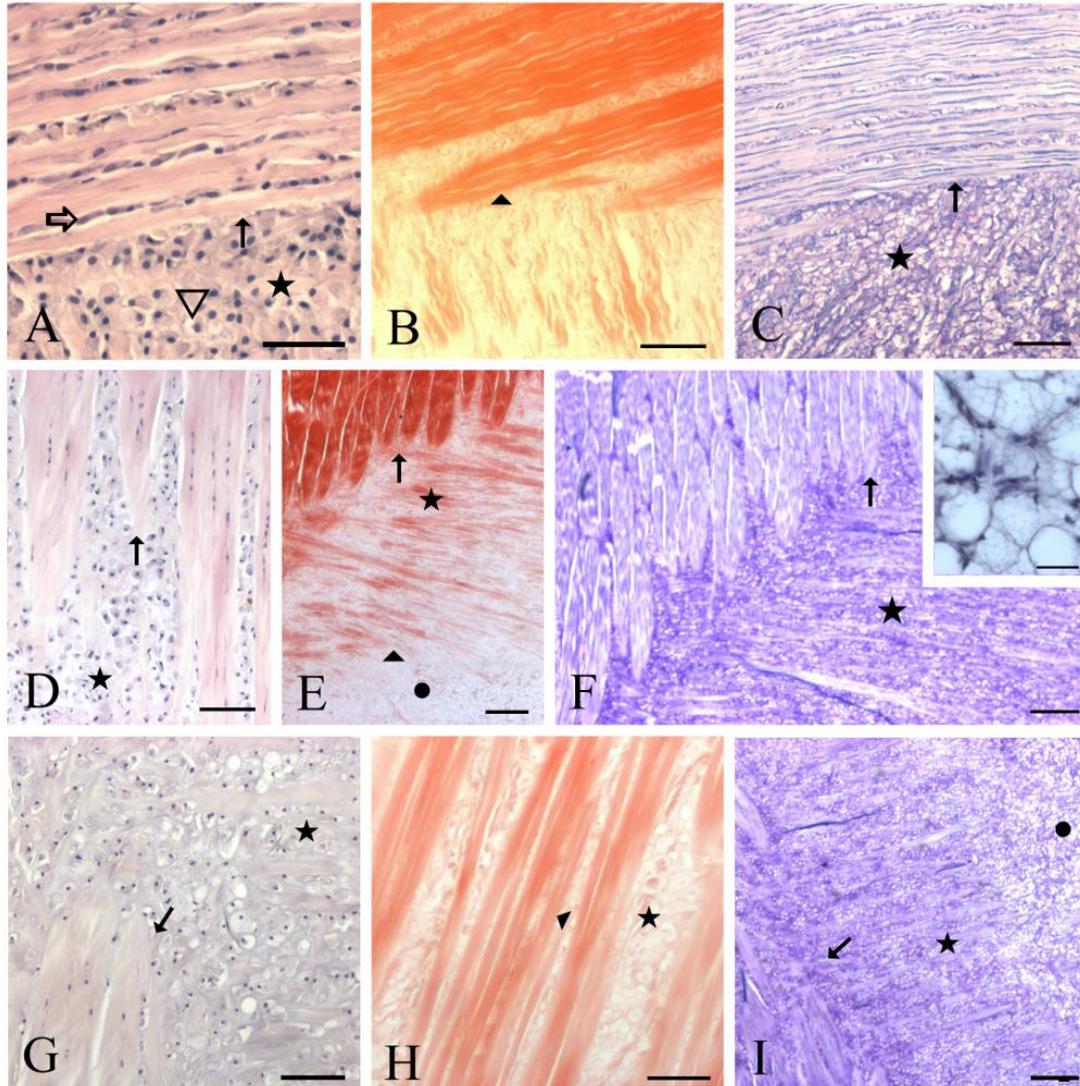


Figura 2 – Cortes longitudinais do CT na região *p*: estão representadas as três idades analisadas e os três corantes utilizados, HE (A, D, G), XP (B, E, H) e AT (C, F, I). **(A, B, C) Animais de 1 mês:** observe a região de transição bem definida (→) e células mais alongadas (⇨) na região mais periférica, com núcleo acompanhando o formato da célula, e matriz colagênica (▶) intensamente corada pelo XP. Na região da fibrocartilagem (★), as células apresentam núcleos arredondados (▷), bem característicos dessa região. **(D, E, F) Animais de 5 meses e (G, H, I) Animais de 8 meses:** observe a gradual substituição da região da fibrocartilagem (★) pelo coxim gorduroso (●) com o envelhecimento, assim como diminuição da metacromasia. É marcante a presença da região de transição (→) em ambas as idades. Observe ainda a formação das fibrilas de colágeno (▶) na região periférica e na região da fibrocartilagem dos tendões. (F) Inset: células adiposas. Aumento: a barra corresponde a 75 µm em A-I e 45 µm inset em F.

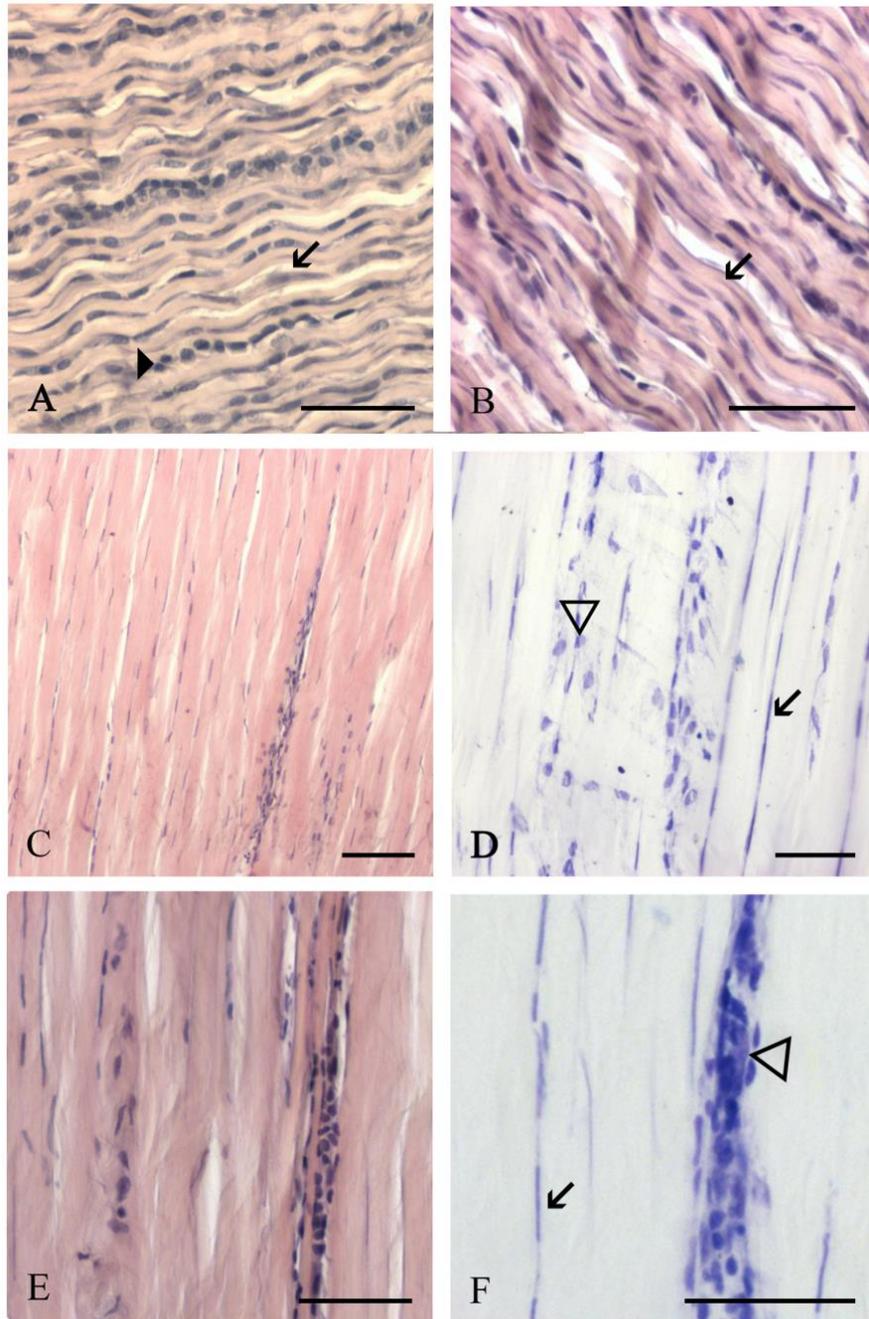


Figura 3 - Cortes longitudinais do CT na região *d*: estão representadas as três idades analisadas e os dois corantes utilizados, HE (A, C, E) e AT (B, D, F). (A, B) **Animais de 1 mês**: observe a disposição unidirecional típica das fibras de colágeno bem alinhadas, com ondulações (→). Observe ainda um grande número de células com os núcleos alongados e enfileirados (▶). (C, D) **Animas de 5 meses** e (E, F) **Animais de 8 meses**: observe que as fibras se tornam menos onduladas e com menor número de células, com o envelhecimento, sendo que seus núcleos apresentam morfologia típica alongada (→). Note que em algumas regiões há acúmulos de células arredondadas (▷). Aumento: a barra corresponde a 75 µm em A-F.

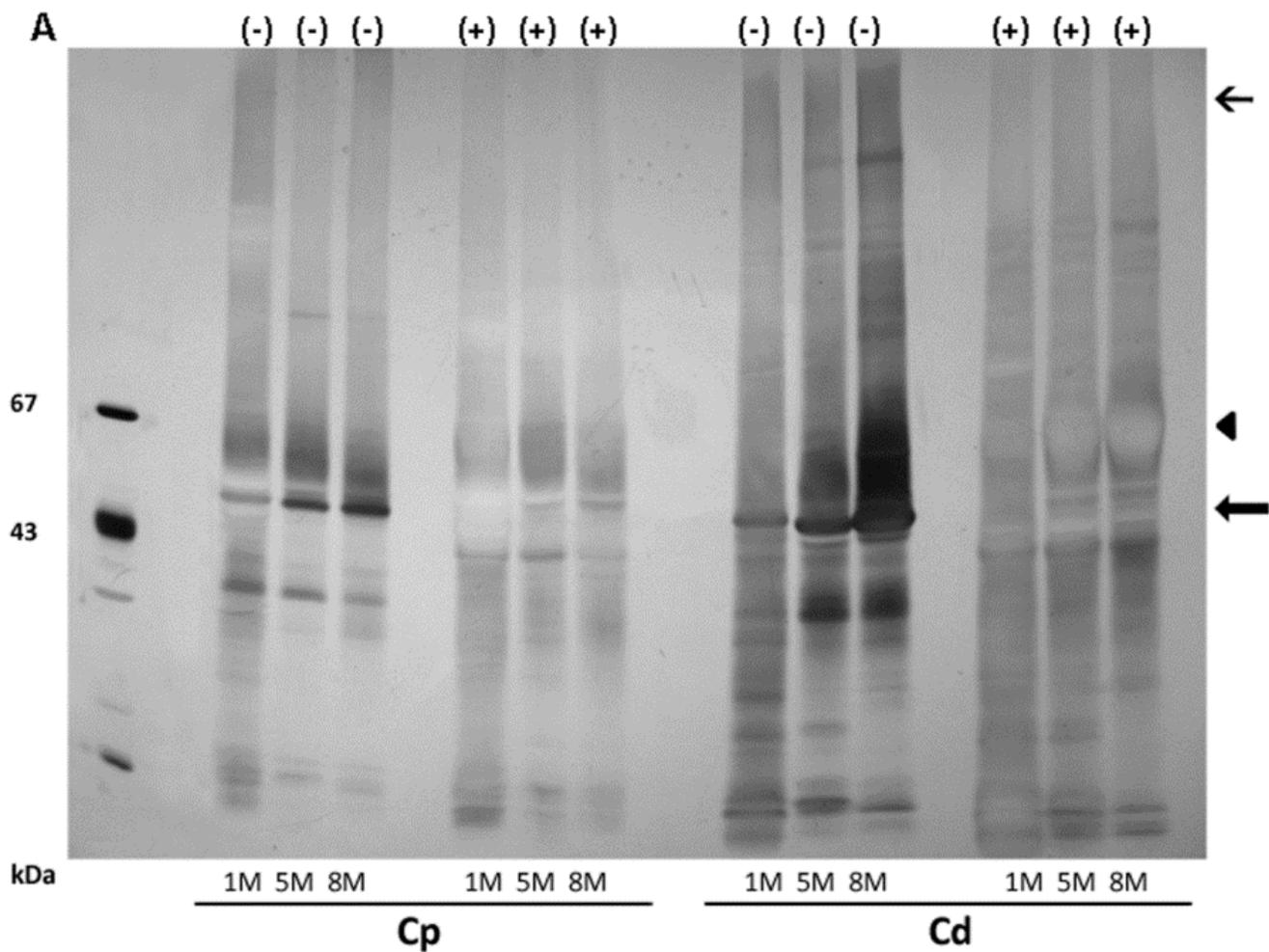


Figura 4 - A SDS PAGE (gradiente 4 – 16%) das frações obtidas após cromatografia em DEAE-Sephacel das regiões *p* e *d* do CT de animais nas 3 idades estudadas. As amostras foram tratadas (+) ou não (-) com β -Me. Na região de 60 e de 70 kDa nas amostras sem β -Me (-) podem ser observadas bandas com comportamento semelhante tanto a FM (\rightarrow) como ao Dec (\blacktriangleright) em todas as idades. Presença de bandas polidispersas em torno de 300 kDa (\rightarrow) também foram visualizadas na ausência do agente redutor. Para as duas regiões, a banda correspondente a 60 kDa se encontra aumentada nos animais com 8 meses; enquanto que o Dec está mais evidente nos animais com 5 e 8 meses na região *d*. Padrão de peso molecular: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactolbumina (14,4 kDa).

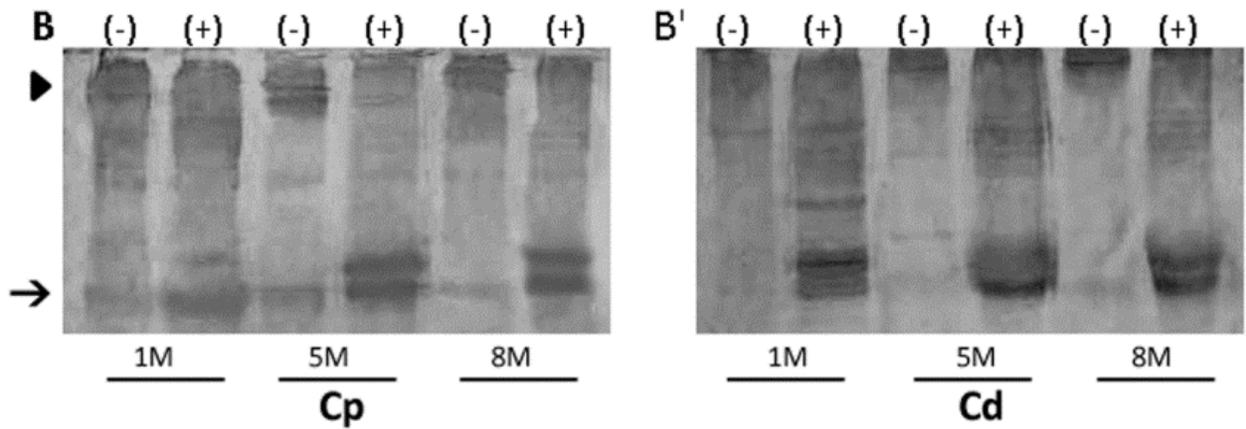


Figura 4 - B) Immunoblotting confirmando que o componente de 60 kDa (→) corresponde ao fibromodulim no SDS-PAGE, presente em todas as idades e regiões analisadas. Na ausência de β -Me pode ser vista uma banda em torno de 300 kDa que desaparece na presença de β -Me (▶), aparecendo mais intensa em 60 kDa.

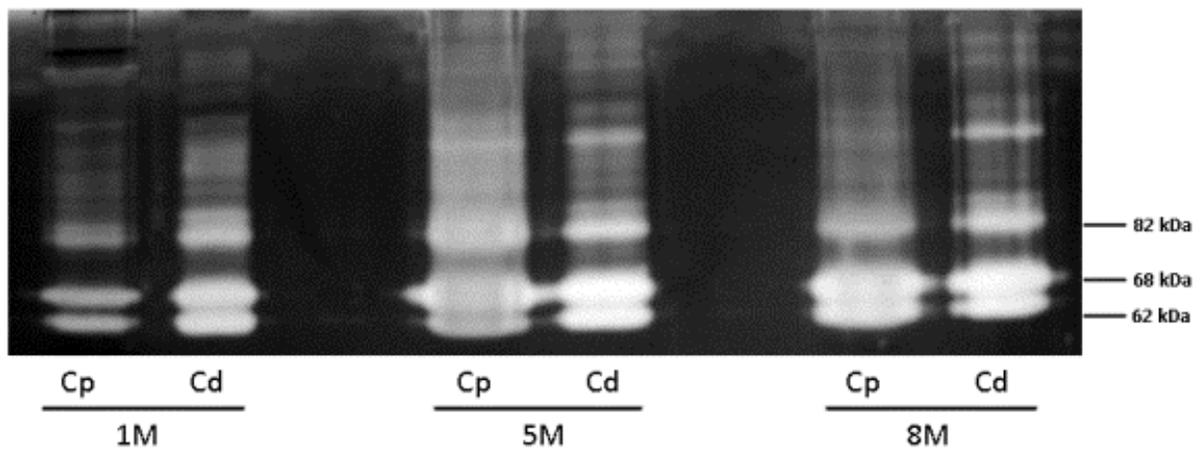


Figura 5 - A zimografia das regiões de compressão (*p*) e de tensão (*d*), obtidos a partir do CT de animais com 1 mês (1M), 5 meses (5M) e 8 meses (8M) de idade, mostra que as isoformas intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) da MMP-2 são observadas em todos os grupos, estando aumentadas em 5 e 8 meses. A isoforma ativa da MMP- 9 (82 kDa), está presente em todas as idades e regiões.

Referências

- Almeida FM, Tomiosso TC, Biancalana A, Mattiello-Rosa SM, Vidal BC, Gomes L, Pimentel ER (2010) Effects of stretching on morphological and biochemical aspects of the extracellular matrix of the rat calcaneal tendon. *Cell Tissue Res* 342(1):97-105
- Baer E, Cassidy JJ, Hiltner A (1988) Hierarchical structure of collagen and its relationship to the physical properties of tendon. In: Nimni, ME (ed) *Collagen: Biochemistry and Biomechanics, Vol II*. Boca Raton, USA, pp 177-199
- Bailey AJ (2001) Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* 122:735-755
- Bailey AJ, Paul RG, Knott L (1998) Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev* 106:1-56
- Bassett CAL, Herrmann I (1961) Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissue in vitro. *Nature* 190:460-461
- Benjamin M, Ralphs JR (2000) The cell and development biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol* 196:85-130
- Benjamin M, Redman S, Milz S, Büttner A, Amin A, Moriggl B, Brenner E, Emery P, McGonagle D, Bydder G (2004) Adipose tissue at entheses: the rheumatological implications of its distribution. A potential site of pain and stress dissipation? *Ann Rheum Dis* 63(12):1549-55
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Buchanan CI, Marsh RL (2002) Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133(4):1101-1107
- Burke EM, Horton WE, Pearson JD, Crow MT, Martin GR (1994) Altered transcriptional regulation of human interstitial collagenase in cultured skin fibroblasts from older donos. *Exp Gerontol* 29:37-53
- Carvalho HF (1995) Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. *J Theor Biol* 172(3):293-297
- Carvalho HF, Felisbino SL (1999) The development of the pressure-bearing tendon of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat Embryol* 200:55-64
- Carvalho HF, Vidal BC (1994) Structure and histochemistry of a pressure-bearing tendon of the frog. *Annals Anat* 176:161-170
- Chiquet-Ehrismann R, Matsuoka Y, Hofer U, Spring J, Bernasconi C, Chiquet M (1991) Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul* 2:927-938
- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR (2008) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1362-1378
- Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Runhaar J, Van Osch GJ, Van Offel JF, Verhaar JA, De Clerck LS, Somville J (2010) The infrapatellar fat pad should be considered

as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage* 18(7):876-882

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

Collier IE, Wilhelm SM, Elisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (ATE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263:6579-6587

Curwin SL, Roy RR, Vailas AC (1994) Regional and age variations in growing tendon. *J Morphol* 221:309-320

Dudhia J, Scott CM, Draper ERC, Heinegård D, Pitsillides AA, Smith RK (2007) Aging enhances a mechanically-induced reduction in tendon strength by an active process involving matrix metalloproteinase activity. *Aging Cell* 6:547-556

Esquisatto MAM, Joazeiro PP, Pimentel ER, Gomes L (2003) Ultrastructural characteristics of tensional regions and tendons from rats of different ages. *Braz J Morphol Sci* 20(2):109-114

Esquisatto MAM, Joazeiro PP, Pimentel ER, Gomes L (2007) The effect of age on the structure and composition of rat tendon fibrocartilage. *Cell Biol Int* 31:570-577

Frizziero A, Fini M, Salamanna F, Veicsteinas A, Maffulli N, Marini M (2011) Effect of training and sudden detraining on the patellar tendon and its enthesis in rats. *BMC Musculoskelet Disord* 19:12-20

- Ghetie V, Chitescu ST, Cotofan V, Hillebrand A (1981) Atlas de anatomia de las aves domesticas. Zaragoza and Madrid, España
- Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, Flint MH (1979) The influence of mechanical forces on the glicosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect Tissue Res* 7: 37-46
- Giori NJ, Beaupré GS, Carter DR (1993) Cellular shape and pressure may mediate mechanical control of tissue composition in tendons. *J Orthop Res* 11:581-591
- Gomes L, Esquisatto MAM, Belline P, Pimentel ER (1996) Is there a relationship between the state of aggregation of small proteoglycans and the biomechanical properties of tissues? *Braz J Med Biol Res* 29:1243-1246
- Gould III JA (1993) *Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte*. Manole, São Paulo
- Hannafin JA, Arnoczky SP (1994) Effect of cyclic and static tensile loading on water content and solute diffusion in canine flexor tendons: an in vitro study. *J Orthop Res* 12(3):350-356
- Hedbom E, Heinegård D (1989) Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem* 264(12):6898-6905
- Heinegård D, Sommarin Y (1987) Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods Enzymol* 144:319-373
- Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 17:1-19

- Iozzo RV, Murdoch AD (1996) 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
- Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accinni L, Martino C (1980) Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg Am* 62A(4):583-598
- Jacob MP (2003) Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 57:195-202
- Jahss MH, Michelson JD, Desai P, Kaye R, Kummer F, Buschman W, Watkins F, Reich S (1992) Investigations into the fat pads of the sole of the foot: anatomy and histology. *Foot Ankle* 13(5):233-242
- Janssens S, Lijnen HR (2006) What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? *Cardiovasc Res* 69:585-594
- Józsa LG, Kannus P (1997) *Human tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaigne, IL
- Kannus P (2000) Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10:312-320
- Kannus P, Józsa L, Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kvist M, Natri A, Järvinen M (1998) Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. *Histochem J* 30: 799-810.

- Kirkendall DT, Garrett WE (1997) Function and biomechanics of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 7:62-66
- Kjaer M (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 84:649-698
- Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Janusz MJ, Bohne R, Wang-Weigand S, Taiwo YO, Mitchell PG, Otterness IG, Flannery CR, Caterson B (2002) Matrix metalloproteinases are involved in C-terminal and interglobular domain processing of cartilage aggrecan in late stage cartilage degradation. *Matrix Biol* 21(3):271-288
- Manske PR, Bridwell K, Lesker PA (1978) Nutrient pathways to flexor tendons of chickens using tritiated proline. *J Hand Surg* 3:352-357
- Manske PR, Lesker PA (1983) Comparative nutrient pathways to flexor tendons in zone II of various experimental animals. *J Surg Res* 34:83-93
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chrigger RS, Perez SE, Celistre-de-Araujo HS (2006) Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am J Sports Med* 34:1274–1280
- Mello MLS, Vidal BC (1980) *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher, Campinas
- Melo MLS, Vidal BC (2003) Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. *Cell Mol Biol* 49(4):579–585
- Merrilees MJ, Flint MH (1980) Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat* 157:87-106

- Mills DK, Daniel JC (1993) Development of functional specializations within the maturing rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect Tissue Res* 30(1):37-57
- Nakagaki WR, Biancalana A, Benevides GP, Gomes L (2007) Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. *Connect Tissue Res* 48:219–228
- Nakagaki WR, Pimentel ER, Benevides GP, Gomes L (2010) The effect of age and spontaneous exercise on the biomechanical and biochemical properties of chicken superficial digital flexor tendon. *Connect Tissue Res* 51:265–273
- O'Brien, M. 1997. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 7:55-61
- Parkinson J, Samiric T, Ilic MZ, Cook J, Handley CJ (2011) Involvement of proteoglycans in tendinopathy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 11(2):86-93
- Riley G (2008) Tendinopathy - from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(2):82-89
- Rooney P (1994) Intratendinous ossification In: Hall BK (ed.) *Mechanisms of Bone Development and Growth, Vol VIII* Boca-Raton, USA, pp 47-83
- Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR (1992) Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. *Anat Embryol* 186(6):611-8
- Scott JE, Orford CR, Hughes EW (1981) Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tails tendon. An electron-microscopical and biochemical investigation. *Biochem J* 195:573-581

- Shadwick RE (1990) Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J Appl Physiol* 68(3):1033-1040
- Shaw HM, Santer RM, Watson AH, Benjamin M (2007) Adipose tissue at entheses: the innervation and cell composition of the retromalleolar fat pad associated with the rat Achilles tendon. *J Anat* 211(4):436-43
- Silva JAF, Lorencini M, Peroni LA, De La Hoz CLR, Carvalho HF, Stach-Machado DR (2008) The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases -2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontal Res* 43(1):48-54
- Silver FH, Freeman JW, Seehra GP (2003) Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech* 36:1529-1553
- Silver FH, Landis WJ (2008) Viscoelasticity, energy storage and transmission and dissipation by extracellular matrices in vertebrates. In: Peter F (ed.) *Collagen: Structure and Mechanics*, 1st edn. Springer, US, pp 133-154
- Slack C, Flint MH, Thompson BM (1984) The effect of tensional load on isolated embryonic chick tendon. *Connect Tissue Res* 12:229-247
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354
- Tuite DJ, Renström PAFH, O'Brien M (1997) The aging tendon. *Scand J Med Sci Sports* 7:72-77

- Velleman SG (2000) The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult Sci* 79:985-989
- Viidik A (1980) Mechanical properties of parallel-fibred collagenous tissue. In: Viidik A, Vuust J (eds) *Biology of Collagen*, 1st edn. Academic Press, London, pp 237-255
- Vogel KG, Heinegård D (1985) Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* 260(16):9298-9306
- Vogel KG, Koob TJ (1989) Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol* 115:267-293
- Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D (1984) Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223:587-597
- Vogel KG, Sandy JD, Pogány G, Robbins JR (1994) Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol* 14:171-179
- Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264:17213-17221
- Yu TY, Pang JH, Wu KP, Chen MJ, Chen CH, Tsai WC (2013) Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 14:2
- Zingales B (1984) Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: Morel CM (ed) *Genes and Antigens of Parasite*, 1st edn. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp 357-363

Artigo II

**Análise morfológica e bioquímica do tendão flexor digital superficial de frango
durante o envelhecimento**

Haline Ballesterio Fêo¹, Adriano Biancalana², Wilson Romero Nakagaki¹, Andrea Aparecida de Aro¹, Laurecir Gomes^{1*}

¹ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, IB, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Av. Bertrand Russel, s/no Cx. Postal 6109 13083-865, Campinas, SP, Brasil

² Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Pará - UFPA, Campus Marajó – Soure, Ilha de Marajó, Pará, Brasil

* Correspondent Author

Laurecir Gomes

Resumo

O tendão flexor digital superficial (SDFT) liga o músculo flexor digital superficial aos dígitos e sua principal função é participar da flexão dos dedos. O SDFT apresenta diferentes regiões ao longo da sua extensão que se adaptam a diferentes forças biomecânicas. Durante o envelhecimento os tendões apresentam modificações nas regiões sujeitas à compressão e a tensão, com variações na composição da matriz extracelular, disposição de fibras de colágeno e celularidade, assim como em suas interações com outros componentes da matriz. Com o objetivo de analisar o efeito do envelhecimento nas diferentes regiões do SDFT, os animais foram sacrificados com 1, 5 e 8 meses de idade e tiveram o tendão dividido em regiões de tensão/compressão (*Sp*) e de tensão (*Sd*). A partir de 1 mês de idade a região *Sp* já apresentou características de fibrocartilagem, com células semelhantes aos condrócitos, enquanto que com 5 meses a região *Sd* exibiu calcificação, com grande modificação da matriz extracelular. No SDS-PAGE, componente com migração eletroforética semelhante ao decorim diminuiu com o envelhecimento. Animais com 5 e 8 meses apresentaram aumento da atividade da MMP-2 e -9 comparados aos animais de 1 mês, principalmente na região *Sp*. Assim, essas alterações marcam uma adaptação às necessidades requeridas pelo SDFT durante o envelhecimento, contribuindo para uma melhor compreensão do aumento da incidência de tendinopatias com o passar da idade.

Palavras-chave: tendão, envelhecimento, fibrocartilagem, MMP.

1. Introdução

O tendão flexor digital superficial (SDFT) liga o músculo flexor digital superficial aos dígitos e sua principal função é participar da flexão dos dedos (Nakagaki et al., 2010). Tendões são formados por uma matriz extracelular abundante composta principalmente por colágeno tipo I, proteoglicanos e proteínas não colagênicas (Benjamin and Ralphs, 1997). Esses elementos são produzidos por fibroblastos e fibrócitos que se encontram entre as fibras de colágeno (Kannus, 2000).

O colágeno, devido a grande quantidade de ligações cruzadas em sua molécula, constitui uma estrutura altamente resistente às forças de tensão (Esquisatto et al., 2003). Os proteoglicanos, por outro lado, consistem de uma molécula proteica ligada covalentemente a glicosaminoglicanos (Velleman, 2000). Esses componentes são responsáveis tanto pela resistência do tecido à compressão (Koob and Vogel, 1987) quanto pela estabilização e fibrilogênese do colágeno (Hedbom and Heinegård, 1989; Parkinson et al., 2011). Os proteoglicanos, assim como o colágeno, são degradados por proteínas denominadas metaloproteinases (MMPs), que apresentam um importante papel no *turnover* do tendão (Janssens and Lijnen 2006; Riley 2008) o qual se encontra modificado durante o envelhecimento (Kjaer, 2004).

As moléculas presentes na matriz são altamente organizadas, formando estruturas supramoleculares responsáveis por atenderem as propriedades biomecânicas requeridas nas diferentes regiões desse tecido (Aro et al., 2012). O SDFT apresenta diferentes regiões ao longo da sua extensão que se adaptam a diferentes forças biomecânicas (Covizi et al., 2001; Benevides et al., 2004). A região proximal (*Sp*), recebe forças de compressão somadas às de tensão, enquanto a região distal (*Sd*) está sujeita apenas as forças de tensão (Benevides et al., 2004; Nakagaki et al., 2010). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito do envelhecimento em diferentes regiões do SDFT de frangos, com 1, 5 e 8 meses de idade.

2. Materiais e métodos

2.1 Grupos Experimentais

O SDFT foi retirado de frangos da linhagem Pedrês, criados no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e sacrificados com 1, 5 e 8 meses de idade. Os animais tiveram o SDFT dividido em duas regiões: proximal (*Sp*), que contorna a tróclea da tíbia e a distal (*Sd*), que está sobre os outros dois terços distais do osso metatarso (Koch, 1973; Ghetie et al., 1981). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP) em 24 de Setembro de 2012. Protocolo 2839-1.

2.2 Microscopia Óptica

Para o estudo histológico, as regiões do tendão foram fixadas em solução de formol a 10% em tampão Millonig (0.13 M fosfato de sódio, 0.1 M de NaOH - pH 7.4), durante 24 hr, na geladeira. As amostras foram lavadas em água, desidratadas em etanol, diafanizadas com xilol e incluídas em Paraplast (Merck). Para região *Sd* dos animais de 5 meses, que apresentou calcificação, os tendões foram fixados e mantidos em solução descalcificadora (PBS, ácido acético 3% e EDTA) por 10 dias, sendo renovada no quinto dia. A partir dos blocos obtidos foram feitos cortes com 7 µm de espessura e os cortes foram corados com azul de Toluidina (AT) 0.025% em tampão MacIlvaine (0.03 M ácido cítrico, 0.04 M fosfato de sódio dibásico - pH 4.0) (Mello and Vidal, 2003), Xylidine Ponceau (XP) 1% em solução de ácido acético 2% pH 2.5 (Vidal and Mello, 2005) e Hematoxilina/Eosina (HE) (Kiernan, 1981).

2.3 Extração da Matriz Extracelular

Os componentes da matriz extracelular presentes nas amostras das diferentes idades, foram extraídos com 25 volumes de cloreto de guanidina (Gu-HCl) 4 M em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 5.8 contendo os inibidores de protease EDTA 0.05 M e PMSF 1mM (Heinegård and Sommarin, 1987), durante 24 horas a 4°C sob agitação constante. Após extração o material foi centrifugado a 20.000 RPM durante 60 minutos a 4°C (Centrífuga Beckaman - Rotor JA 20).

2.4 Fracionamento e análise

Extratos obtidos das diferentes idades foram submetidos a quantificação de proteínas segundo o método de Bradford (1976) com modificações, tendo albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura das amostras foi feita a 595 nm. Amostras contendo 2.3 mg de proteína foram dialisadas contra uréia 7 M em tampão acetato de sódio 0.05 M pH 7.5 e aplicadas a uma coluna de DEAE-Sephacel (4 x 1.5 cm) previamente equilibrada com o tampão acima. O material retido na coluna foi eluído com um gradiente de cloreto de sódio (0 – 1.5 M) e para cada fração coletada foi determinada a absorbância em 280 nm. Alíquotas com 114 µL de cada fração foram precipitadas com etanol e tampão acetato de sódio 1 M pH 7.4. Após centrifugação, foi adicionado tampão de amostra, ao precipitado obtido de cada fração, contendo Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1 mM em pH 6.8 e azul de bromofenol 0.01 % com ou sem β-mercaptoetanol 5% ao precipitado obtido de cada fração e incubadas durante 5 minutos a 96°C. As amostras foram analisadas em gel de SDS-Poliacrilamida 4 – 16% (SDS-PAGE) de acordo com Zingales (1984). Os géis foram impregnados com nitrato de prata segundo Blum et al. (1987).

2.5 Zimografia

Amostras do extrato total contendo 20 µg de proteínas foram preparadas e aplicadas em SDS-PAGE 10% contendo 0.1% de gelatina e a eletroforese foi realizada à 4°C. O gel foi lavado com Triton X-100 a 2.5% e incubado a 37°C, sob agitação durante 21 horas em Tris-HCl (0.05 M pH 7.4, NaCl 0.1 M e azida sódica 0.03%). Posteriormente o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0.2% por 1 hora e descorado com metanol (50%) e ácido acético (10%) para observação das bandas negativas resultantes da atividade das enzimas (Silva et al., 2008).

3. Resultados

3.1 Análise morfológica

Os resultados mostram nos cortes corados com HE dos animais de 1 mês, na região ***Sd***, a qual recebe apenas forças de tensão, células com núcleos alongados, típicos de fibroblastos (figura 1A) enquanto que a região ***Sp*** apresenta uma pequena porção de células arredondadas, indicando formação de uma fibrocartilagem no tendão (dados não mostrados). Nos animais com 5 meses, figura 1B e C, nos cortes corados respectivamente com HE e AT, a região ***Sd*** apresentou células com núcleos arredondados (figura 1B) e formação de uma nova estrutura, correspondendo provavelmente ao início do estabelecimento uma matriz óssea. Ainda na região ***Sd*** foi observada intensa metacromasia na matriz (figura 1C). Na região ***Sp***, a qual recebe forças de compressão adicionais as de tensão, observamos além de células semelhantes aos fibroblastos (figura 1D), a consolidação de uma estrutura fibrocartilaginosa (figura 1E e F), onde as células se apresentaram com aspecto arredondado semelhante aos condrócitos. Nos cortes corados com XP (figura 1F), pode-se observar a direção e a distribuição das fibras de colágeno. Essa região apresentou ainda, uma matriz bem corada com AT e células organizadas em grupos isógenos (figura 1G), com vesículas em seu interior (figura 1H), as quais não são observadas em animais mais jovens. Os animais com 8 meses apresentaram cortes com imagens semelhantes à dos animais com 5 meses (dados não mostrados).

3.2 Análise bioquímica

Após obtenção de amostras em cromatografia, foi observado em SDS-PAGE uma proteína em torno de 70 kDa e outra em torno de 60 kDa que apresentaram comportamentos eletroforéticos semelhantes ao decorim e fibromodulim, respectivamente, sendo que no fibromodulim aparentemente não houve diferença entre os diferentes grupos. Enquanto que com relação ao decorim, parece haver uma diminuição com 8 meses quando comparado com 5 e 1 mês (figura 2A). Na zimografia foi possível observar aumento da quantidade da isoforma intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) de MMP- 2 em todos os grupos, com o envelhecimento. Presença da isoforma ativa da MMP-9 (82 kDa) também foi observada em 5 e 8 meses de ambas as regiões analisadas, estando mais evidente no grupo ***p*** de 8 meses (figura 2B).

4. Discussão

Neste trabalho pôde ser analisada as regiões de tensão e compressão do tendão flexor digital superficial em animais com 1, 5 e 8 meses de idade. Os resultados mostram que com 1 mês de idade, os animais exibem uma estrutura fibrocartilaginosa na região *Sp* do tendão, que também pode ser observada com 5 meses. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores realizados em rãs (Carvalho, 1999) e em bovinos (Voguel and Koob, 1989), os quais afirmam que uma região submetida às forças adicionais de compressão, apresenta alterações bioquímicas e morfológicas que a caracterizam como uma fibrocartilagem. Nessas regiões ocorre o estímulo para a síntese de proteoglicanos, enquanto que a força de tensão, também presente, pode desempenhar um papel regulatório na determinação do tipo de proteoglicanos produzido pelo tendão (Vogel and Heinegård, 1985; Koob and Vogel; 1987; Evanko and Vogel, 1990). As células nessa região apresentaram vesículas no seu interior sugerindo a presença de gordura. Este resultado corrobora com Józsa e Kannus (1997) que relatam o aparecimento de gotículas de lipídeos com o envelhecimento. Considerando o aparecimento de tecido adiposo durante o envelhecimento, estudo prévio realizado em nosso laboratório mostrou o surgimento de um coxim gorduroso no tendão calcâneo de frangos mais velhos (dados não publicados).

Na região sujeita apenas as forças de tensão, região *Sd*, observa-se um grande número de células cubóides e arredondadas, podendo se tratar de osteoblastos secretando matriz óssea, assim como osteócitos já consolidados com seus inúmeros prolongamentos. Um estudo feito com pássaros mostrou que os tendões dos membros inferiores, responsáveis pela flexão da perna e dos dedos apresentam ossificação. Os autores acreditam que essa ossificação aumenta a rigidez do tendão, fazendo com que a região não se estire, sendo esta uma adaptação para resistir ao aumento de forças que agem distendendo os membros durante a escalada vertical da ave (Bledsoe et al., 1993).

A análise bioquímica através do SDS-PAGE mostrou proteínas que apresentaram comportamentos eletroforéticos semelhantes ao decorim e ao fibromodulim, corroborando com a caracterização desses componentes em estudos anteriormente realizados em nosso laboratório (Gomes et al., 1996). No componente semelhante ao decorim, parece haver uma

diminuição na intensidade da banda de acordo com o envelhecimento. De acordo com estudo realizado por Nakagaki et al. (2010) foi observado uma diminuição da concentração de glicosaminoglicanos sulfatados totais em frangos com até 8 meses. A literatura mostra uma ação moduladora do fibromodulim e principalmente do decorim na fibrilogênese do colágeno e, conseqüentemente, na formação do diâmetro final das fibrilas (Hedbom and Heinegård, 1989; Yoon and Halper, 2005; Dourte et al., 2012). O decorim, ligado a uma tripla hélice de colágeno, parece ter um papel importante na formação do arranjo dessas moléculas dentro das microfibrilas, impedindo a sua fusão lateral (Weber et al., 1996). Segundo Dourte et al. (2012), tendões que não possuem decorim apresentaram diminuição significativa no diâmetro da fibrila, sendo que além da sua função na fibrilogênese, esse proteoglicano parece ser importante também na organização do tecido durante o desenvolvimento (Del Santo Jr et al., 2000).

No curso normal do seu desenvolvimento, o tendão será remodelado de forma que tanto sua estrutura como sua composição serão alteradas para facilitar a sua função sob novas condições (Almeida, 2010). Durante o envelhecimento, o remodelamento das fibras de colágeno é modificado, e embora a função mecânica do tendão dependa de um alinhamento preciso das fibrilas, são os proteoglicanos que regulam essas moléculas, atuando portanto, na biomecânica do tendão (Yoon and Halper, 2005). Como foi observada uma diminuição na intensidade da banda, que provavelmente corresponde ao decorim, principalmente nos animais mais velhos, é plausível reforçar a possibilidade de um envolvimento mais direto dessa molécula no arranjo das fibrilas de colágeno conforme o envelhecimento, sendo que uma alteração na fibrilogênese do colágeno pode diminuir a resistência dos tendões às deformidades impostas por forças compressivas (Buckwalter et al., 1993; Goodman and Choueka, 2005; Yu et al., 2013). Vale ressaltar que nossos resultados morfológicos também comprovaram que o envelhecimento afeta a matriz do tendão através de uma possível calcificação e deposição de lipídeos, o que contribui com o aumento da incidência de tendinopatias no envelhecimento.

Já na zimografia foi possível observar aumento da quantidade da isoforma intermediária e ativa da MMP- 2 em todos os grupos, com o envelhecimento. Também foi detectada a presença da isoforma ativa da MMP-9, que está mais evidente na região de

compressão dos animais mais velhos. Esses resultados podem estar relacionados com o fato de que tendões sofrem acúmulo de microlesões durante o envelhecimento, levando a instalação de pequenos processos inflamatórios que atuam na ativação de MMPs (Dudhia et al., 2007). Outro fator que atua durante o envelhecimento é o desequilíbrio dessas MMPs (Dean et al., 1989; Sharma and Maffulli, 2005) e possivelmente de seus inibidores teciduais (TIMPs) (Bullen et al., 1995; Yu et al., 2013), podendo levar a uma degradação exacerbada dos componentes da matriz. Nossos resultados estão de acordo com Yu et al. (2013) que também verificou aumento dessas enzimas em tenócitos envelhecidos *in vitro*, além de reduzidas expressões de TIMPs. Estudos constataram ainda um aumento similar na atividade de MMP-2 ou -9 dependentes da idade em amostras da pele, coração, cartilagem articular, e até mesmo do cérebro (Gepstein et al., 2002; Lindsey et al., 2005; Mine et al., 2008; Lee et al., 2012). Dessa forma, é razoável postular que a degeneração do tendão pode resultar também do aumento da atividade de gelatinases ativadas durante o envelhecimento, o que pode contribuir com um tendão biomecanicamente menos resistente (Yu et al., 2013).

Em conclusão, nossos resultados mostram que o envelhecimento leva ao desenvolvimento de uma estrutura fibrocartilaginosa no SDFT de frangos, assim como calcificação, provável diminuição de decorim e aumento da atividade das MMPs -2 e -9.

Agradecimentos

Este trabalho em parte foi apoiado pela FAPESP (2006/00044-4) e os autores agradecem à Capes pela bolsa de Haline Fêo.

FIGURAS E LEGENDAS

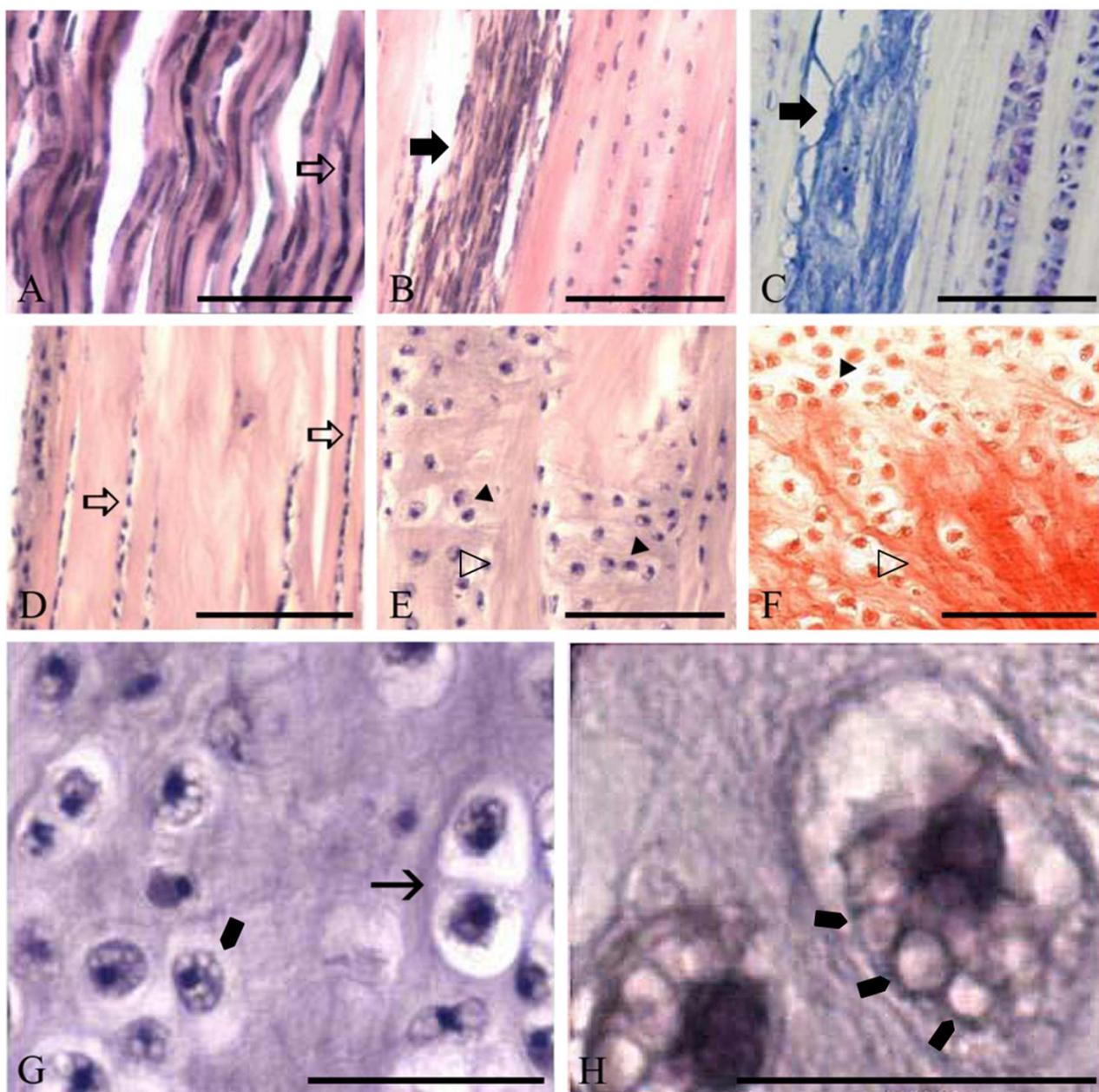


Figura 1- Cortes histológicos de tendões dos animais em duas diferentes idades analisadas. O tendão foi dividido em regiões que recebem forças de compressão *Sp* e de tensão *Sd*. Para análise foram realizadas três colorações HE (A, B, D, E), AT (C, G, H) e XP (F). (A) Animais com 1 mês mostrando na região *Sd* as células com núcleos alongados, característicos de fibroblastos (⇒). (B e C) Animais com 5 meses, exibindo na região *Sd*, uma estrutura com pontos de calcificação e grande celularidade (➔), podendo ser o início do estabelecimento de uma matriz óssea. (D, E, F, G e H) Animais com 5 meses exibindo na região *Sp*, células alongadas e enfileiradas típicas de fibroblastos (⇒) e células arredondadas semelhantes a condrócitos caracterizando uma fibrocartilagem, onde podemos observar fibras de colágeno (▷), com uma organização irregular, envolvendo os condrócitos (▶). Essa região apresentou células com formação de grupos isógenos (→) e presença de vesículas em seu interior (◼).

A)

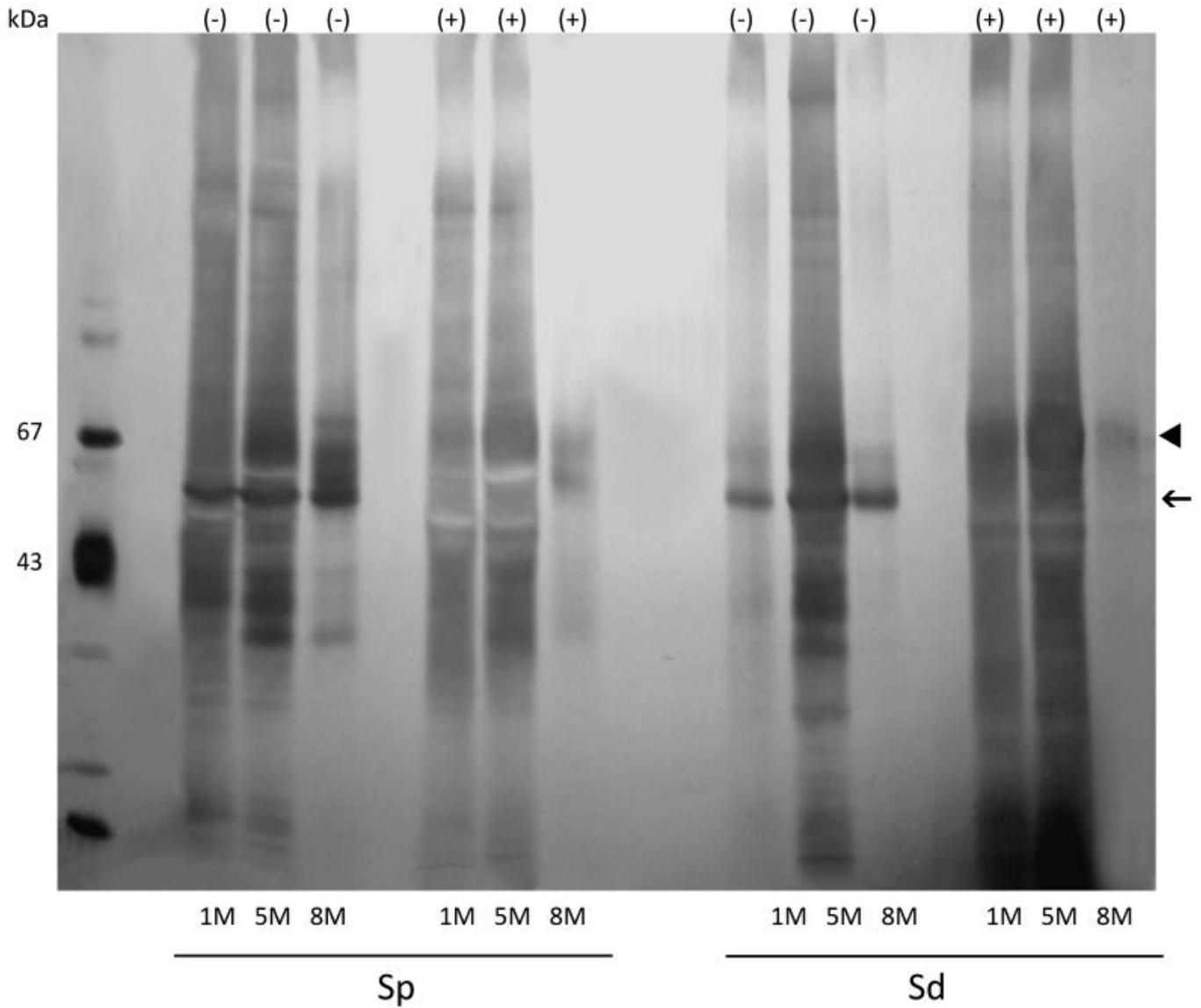


Figura 2 - A) SDS PAGE (gradiente 4 – 16%) das frações obtidas após cromatografia em DEAE-Sephacel das regiões *Sp* e *Sd* do SDFT. As amostras foram tratadas (+) ou não (-) com β -Me. Na região de 60 e de 70 kDa nas amostras sem β -Me (-) podem ser observadas bandas com comportamento semelhante tanto ao fibromodulim (\rightarrow) como ao decorim (\blacktriangleright) em todas as idades. Para as duas regiões, principalmente na presença de β -Me, a banda de 70 kDa correspondente ao decorim parece diminuir com 8 meses quando comparado com 5 e 1 mês. Padrão de peso molecular: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

B)

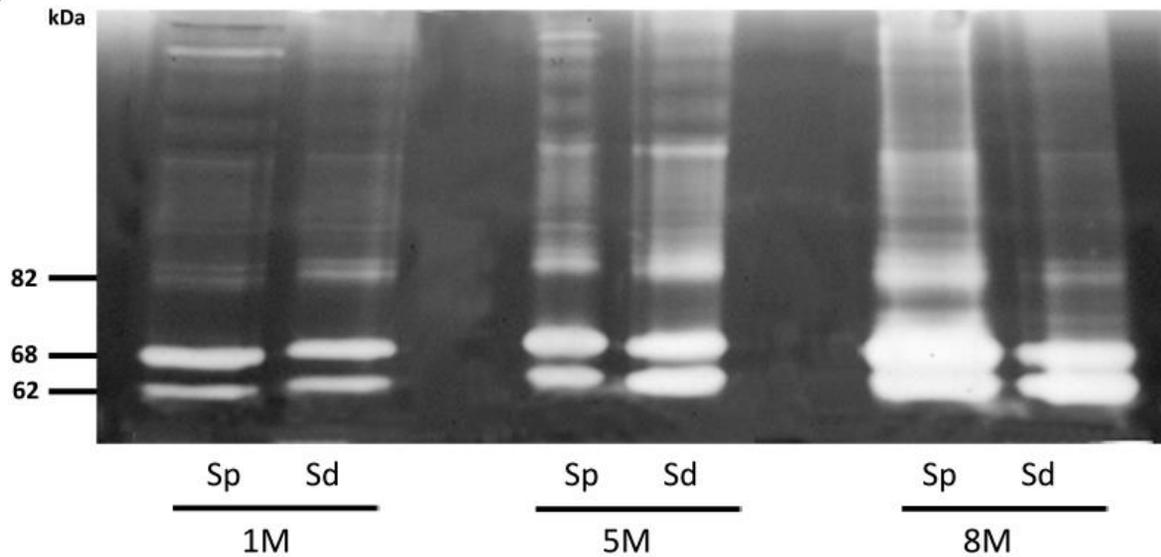


Figura 2 - B) Zimografia das regiões de compressão (*Sp*) e tensão (*Sd*), obtidos a partir do SDFT de animais com 1 mês (1M), 5 meses (5M) e 8 meses (8M) de idade. Observe o aumento da quantidade da isoforma intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) da MMP- 2 em todos os grupos, conforme houve envelhecimento. Presença da isoforma ativa da MMP-9 (82 kDa) também foi observada nos animais de 1, 5 e 8 meses de idade em ambas as regiões, estando mais evidente no grupo *Sp* de 8 meses.

Referencias

- Almeida FM, Tomiosso TC, Biancalana A, Mattiello-Rosa SM, Vidal BC, Gomes L, Pimentel ER. (2010). Effects of stretching on morphological and biochemical aspects of the extracellular matrix of the rat calcaneal tendon. *Cell Tissue Res*;342:97–105.
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Gomes L. (2004). Biochemical and biomechanical analysis of tendons of Caged and Pinned chickens. *Connect Tissue Res*;45:206–15.
- Benjamin M, Ralphs JR. (1997). Tendons and ligaments: An overview. *Histol Histopathol*;12:1135–144.
- Bledsoe AH, Raikow RJ, Glasgow AG. (1993). Evolution and functional significance of tendon ossification in woodcreepers. *J Morphol*;215(3):289–300.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. (1987). Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*;8:93–99.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*;72:248–54.
- Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR. (1993). Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am*; 75(10):1533–548.
- Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, Howard EW. (1995). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol*;104(2):236–40.

- Carvalho HF, Felisbino SL. (1999). The development of the pressure-bearing tendon of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat Embryol*;200:55–64.
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF. (2001). Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cell*;33(5):483–90.
- de Aro AA, Vidal BC, Biancalana A, Tolentino FT, Gomes L, Mattiello SM, Pimentel ER. (2012). Analysis of the deep digital flexor tendon in rats submitted to stretching after immobilization. *Connect Tissue Res*;53:29–38.
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. (1989). Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*;84(2):678–85.
- Del Santo Jr M, Marches F, Ng M, Hinton RJ. (2000). Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol*;45(6):485–93.
- Dourte LM, Pathmanathan L, Jawad AF, Iozzo RV, Mienaltowski MJ, Birk DE, Soslowsky LJ. (2012). Influence of decorin on the mechanical, compositional, and structural properties of the mouse patellar tendon. *Journal of Biomechanical Engineering*;134(3):031005.
- Dudhia J, Scott CM, Draper ERC, Heinegård D, Pitsillides AA, Smith RK. (2007). Aging enhances a mechanically-induced reduction in tendon strength by an active process involving matrix metalloproteinase activity. *Aging Cell*;6:547–556
- Esquisatto MAM, Joazeiro PP, Pimentel ER, Gomes L. (2003). Ultrastructural characteristics of tensional regions and tendons from rats of different ages. *Braz J Morphol Sci*;20(2):109–14.

- Evanko SP, Vogel KG. (1990). Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous regions of bovine tendon. *Matrix*;10:420–36.
- Gepstein A, Shapiro S, Arbel G, Lahat N, Livne E. (2002). Expression of matrix metalloproteinases in articular cartilage of temporomandibular and knee joints of mice during growth, maturation, and aging. *Arthritis Rheum*;46(12):3240–250.
- Ghetie V, Chitescu S, Cotofan V, Hillebrand A. (1981). *Atlas de Anatomia de las Aves Domésticas*. Madrid, España: Acribia.
- Goodman HJ, Choueka J. (2005). Biomechanics of the flexor tendons. *Hand Clin*; 21(2):129–49.
- Gomes L, Esquisatto MA, Belline P, Pimentel ER. (1996). Is there a relationship between the state of aggregation of small proteoglycans and the biomechanical properties of tissues? *Braz J Med Biol Res*;29(9):1243–246.
- Hedbom E, Heinegård D. (1989). Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem*;264(12):6898–905.
- Heinegård D, Sommarin Y. (1987). Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods Enzymol*;144:319–73.
- Janssens S, Lijnen HR. (2006). What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? *Cardiovasc Res*;69:585–94.
- Józsa LG, Kannus P. (1997). Spontaneous rupture of tendons. In: *Human tendons. Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaign: Human Kinetics, pp. 254–325.

- Kannus P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*;10:312–20.
- Kiernan JA. (1981). *Histological and histochemical methods: Theory & Practice*. New York, NY: Pergamon Press.
- Kjaer M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*;84:649–98.
- Koch T. (1973). Locomotion system. In: Skold BH, DeVires L, editors. *Anatomy of the Chicken and Domestic Birds*. Ames: The Iowa University Press, pp. 6–65.
- Koob TJ, Vogel KG. (1987). Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. *J Biochem*;246:589–98.
- Lee P, Kim J, Williams R, Sandhir R, Gregory E, Brooks WM, Berman NE. (2012). Effects of aging on blood brain barrier and matrix metalloproteinases following controlled cortical impact in mice. *Exp Neurol*;234:50–61.
- Lindsey ML, Goshorn DK, Squires CE, Escobar GP, Hendrick JW, Mingoia JT, Sweterlitsch SE, Spinale FG. (2005). Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovasc Res*;66(2):410–19.
- Mello MLS, Vidal BC. (2003). Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. *Cell Mol Biol*;49(4),579–85.
- Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. (2008). Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One*;3(12):e4066.

- Nakagaki WR, Pimentel ER, Benevides GP, Gomes L. (2010). The effect of age and spontaneous exercise on the biomechanical and biochemical properties of chicken superficial digital flexor tendon. *Connect Tissue Res*;51:265–73.
- Parkinson J, Samiric T, Ilic MZ, Cook J, Handley CJ. (2011). Involvement of proteoglycans in tendinopathy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*;11(2):86–93.
- Riley G. (2008). Tendinopathy - from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*;4(2):82-89.
- Sharma P, Maffulli N. (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*;87:187–202.
- Silva JAF, Lorencini M, Peroni LA, De La Hoz CLR, Carvalho HF, Stach-Machado DR. (2008). The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases -2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontal Res*;43:48–54.
- Velleman SG. (2000). The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult Sci*;79(7):985–89.
- Vidal BC, Mello MLS. (2005). Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye ponceau SS to collagen fibers. *Biopolymers*;78(3):121–28.
- Vogel KG, Heinegård D. (1985). Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem*;260(16):9298–306.
- Vogel KG, Koob TJ. (1989). Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol*;115:267–93.

- Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. (1996). Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*;271(50):31767–1770.
- Yoon JH, Halper J. (2005). Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*;5:22–34.
- Yu TY, Pang JH, Wu KP, Chen MJ, Chen CH and Tsai WC. (2013). Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord*; doi: 10.1186/1471-2474-14-2
- Zingales B. (1984). Analysis of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: Morel CM, Editor. *Genes and Antigens of Parasite*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, pp. 357–63.

CONCLUSÕES

- Durante o processo de envelhecimento, o tendão calcâneo e o tendão flexor digital superficial apresentaram alterações estruturais e bioquímicas que marcam adaptações imprescindíveis às necessidades de remodelamento requeridas pelo tendão.
- A região que recebe forças de tensão-compressão (**p**) do CT apresentou tecido fibrocartilagenoso entre as fibras de colágeno. Com o envelhecimento, há uma gradual substituição dessa região por um coxim gorduroso.
- Na região que recebe apenas forças de tensão (**d**) do CT, a compactação das fibras de colágeno é acentuada, havendo um aumento do fibromodulim com o envelhecimento.
- MMP-2 e -9, no CT, apresentaram maiores quantidades em ambas as regiões, em 5 e 8 meses quando comparados aos animais de 1 mês.
- No SDFT a região **p** apresentou fibrocartilagem bem característica nos animais de 5 meses, enquanto que a região **d** apresentou indícios de calcificação.
- MMP-2, no SDFT, mostrou aumento de atividade em todos os grupos conforme o envelhecimento, enquanto a MMP-9 se apresentou mais evidente no grupo **p** de 8 meses.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada "ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DOS TENDÕES CALCANEAR E FLEXOR DIGITAL SUPERFICIAL DE FRANGOS DURANTE O ENVELHECIMENTO":

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

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2839-1, Instituição: UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

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

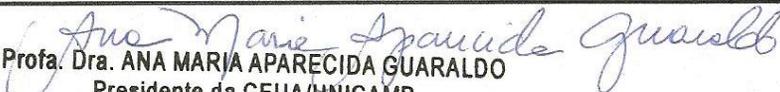

Aluna: Haline Ballestero Fêo


Orientadora: Laurecir Gomes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura