

Universidade Estadual de Campinas

Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

Aspectos morfológicos, bioquímicos e biomecânicos de tendões de ratos púberes, adultos e senis sujeitos a diferentes forças mecânicas

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Marcelo Augusto Marretto</i>
<i>Esquisatto</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.

07/05/99 - Laurecir Gomes

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Biologia Celular

Orientadora - Profa. Dra. Laurecir Gomes

- 1999 -

9913818

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	ESGR&A
V.	Es
TOMBO Nº/	38094
PROC	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/07/99
N.º CPD	

CM-00125577-9

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Esquisatto, Marcelo Augusto Marretto

Es696a Aspectos morfológicos, bioquímicos e biomecânicos de tendões de ratos púberes, adultos e senis sujeitos a diferentes forças mecânicas/ Marcelo Augusto Marretto Esquisatto. -- Campinas, SP. [s.n.], 1999. 102f.:ilus.

Orientadora: Laurecir Gomes

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Envelhecimento. 2. Matriz extracelular. 3. Proteoglicanos.
I. Gomes, Laurecir. II. Universidade Estadual de Campinas.
III. Título.

Banca Examinadora:

Titulares

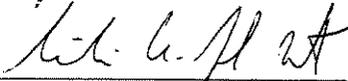
Profa. Dra. Laurecir Gomes (orientadora)



Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



Prof. Dr. Emílio Antonio Jeckel-Neto



Prof. Dr. Gregório Santiago Montes



Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro



Suplentes

Prof. Dr. Áureo Tisumi Yamada

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Local e Data: Campinas, 07 de Maio de 1999.

Dedicatória:

**A Deus, fonte da vida
À minha querida Família, pelo apoio incondicional
Aos meus verdadeiros Mestres, pelo incentivo e colaboração**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laurecir Gomes pela grande amizade, incentivo e orientação consciente durante todos estes anos de convívio na Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pela presença amiga e constante disposição para discussão de todos os problemas relacionados com a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro pela dedicação e competência na colaboração para o desenvolvimento dos estudos morfológicos realizados neste trabalho bem como das sugestões indicadas na análise prévia do manuscrito.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pela paciência e competência com que analisou todos os relatórios anuais e o manuscrito inicial deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Gregório Montes, Emílio Jeckel Neto e Áureo Tatsumi Yamada por aceitarem o convite para participação da Banca Examinadora e pelas contribuições acrescentadas ao manuscrito final deste trabalho.

À todos os Docentes e Técnicos do Departamento de Biologia Celular que contribuíram de alguma maneira para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários da secretaria, Liliam, Sidnei e Cidinha, pelos incontáveis favores.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, em especial a Vera, Nazário, Edson, Daniela, Sérgio, Lino, Patrícia e João Batista pela amizade do dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares pelo auxílio na realização dos testes estatísticos.

A Profa. Dra. Sonia Malmonge pela acessoria na realização dos experimentos biomecânicos e orientação na análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Francesco Langone pelos inumeráveis ensinamentos em informática e incontáveis palavras de incentivo.

Às técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Adriene e Antonia pelo apoio na realização de parte desse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e à FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, que permitiram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
Abreviaturas	01
Lista de Figuras e Tabelas	03
Resumo	05
Summary	07
Introdução	09
Objetivo	19
Material e Métodos	20
Resultados	26
Discussão	77
Conclusão	89
Referências Bibliográficas	92

ABREVIATURAS

AH	Ácido Hialurônico
AT	Azul de Toluidina
AU	Ácido Urônico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEC	Concentração Crítica de Eletrólitos
CS	Condroitim Sulfato
<i>d</i>	Distal
DAB	n,n-Diaminobenzidina
DEAE-Sepacel	Dietilaminoetil-Sepacel
Dec	Decorim
DMMB	Azul de Dimetilmetileno
DS	Dermatam Sulfato
<i>e</i>	Epitenônio
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
F	Fibroblastos
Fc	Fibrocondrócitos
FM	Fibromodulim
G	Gradiente
GAG	Glicosaminoglicano
HE	Hematoxilina e Eosina
HS	Heparam Sulfato
<i>i</i>	Intermediária
kDa	kiloDalton
mA	miliAmpère
MEC	Matriz Extracelular
MPa	megaPascal
Mr	Massa Molecular Aparente
2-Me	2-Mercaptoetanol
<i>p</i>	Proximal

PBS	Solução Salina Tamponada
PG	Proteoglicano
PM	Padrão de Massa Molecular
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
QS	Queratam Sulfato
R _r	Distância Relativa de Migração
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida com SDS
TC	Tendão Calcanear
TFDP	Tendão Flexor Digital Profundo
Tris	Tris-hidroximetilaminometano

LISTA de FIGURAS e TABELAS

	Pág.
Tabela 01 – Medidas biométricas das regiões do TC e TFDP	27
Figura 01 – Fotomicrografias da região de tensão e compressão do TC (H/E)	31
Figura 02 – Fotomicrografias da região de tensão e compressão do TC (Picrossirius-Hematoxilina)	33
Figura 03 - Fotomicrografias da região de tensão e compressão do TC (Azul de Alcian solução pH 2,5)	35
Figura 04 - Fotomicrografias da região de tensão e compressão do TFDP (H/E)	37
Figura 05 – Fotomicrografias da região de tensão e compressão do TFDP (Picrossirius-Hematoxilina)	39
Figura 06 - Fotomicrografias da região de tensão e compressão do TFDP (Azul de Alcian: solução pH 2,5)	41
Figura 07 – Micrografias eletrônicas da região de tensão do TC	45
Figura 08 - Micrografias eletrônicas da região de compressão do TC	47
Figura 09 - Micrografias eletrônicas da região de tensão do TFDP	49
Figura 10 - Micrografias eletrônicas da região de compressão do TFDP	51
Tabela 02 – Medidas dos diâmetro das fibrilas de colágeno das regiões do TC e TFDP	53

Tabela 03 – Teste de Intumescimento, Conteúdo de água, GAG total	55
Tabela 04 – Conteúdos de proteína, ácido urônico e GAGs sulfatados no extrato	57
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose dos GAG das diferentes regiões dos tendões	59
Figura 12 – Cromatogramas e eletroforeses da região <i>p</i> do TC (30,180 e730d)	62
Figura 13 – Cromatogramas e eletroforeses da região <i>d</i> do TC (30,180 e730d)	64
Figura 14 – Cromatogramas e eletroforeses da região <i>p</i> do TFDP (30,180 e730d)	66
Figura 15 – Cromatogramas e eletroforeses da região <i>i</i> do TFDP (30,180 e730d)	68
Figura 16 – Cromatogramas e eletroforeses da região <i>d</i> do TFDP (30,180 e730d)	70
Figura 17 – Teste imunológico para FM e Dec das diferentes regiões do TC e TFDP	73
Tabela 05 – Teste de Viscoelasticidade (Tensão de Ruptura e Módulo Elástico)	76

RESUMO

O tendão calcâneo e o tendão flexor digital profundo de ratos são estruturas adaptadas para resistir às forças de tensão. Em algumas regiões, estes tendões também suportam forças de compressão. Nestes locais o tecido fibroso desenvolve uma metaplasia fibrocartilaginosa. O objetivo desse trabalho foi analisar o comportamento mecânico dos tendões, bem como a organização estrutural e a composição da matriz extracelular das regiões submetidas à tensão e tensão/compressão em três idades diferentes (30d/180d/730d). O tendão calcâneo foi dividido em região proximal (tensão) e distal (compressão) e o tendão flexor digital profundo em duas regiões de tensão (proximal e distal) e uma de compressão (intermediária). A área ocupada pela fibrocartilagem no tendão calcâneo apresentou crescimento longitudinal com a idade, enquanto que no tendão flexor digital profundo o desenvolvimento ocorreu transversalmente. Os proteoglicanos estão concentrados na matriz pericelular das células diferenciadas nos dois tendões. A presença de proteoglicanos entre as fibras colágenas parece diminuir nos indivíduos mais velhos no tendão calcâneo e aumentar no tendão flexor digital profundo. As regiões de tensão não apresentaram variações entre as idades quanto à organização das fibras colágenas e basofilia na matriz extracelular. A ultraestrutura das células da região de compressão apresentou um citoplasma rico em filamentos do citoesqueleto. A matriz pericelular dos fibrocondrócitos no tendão flexor digital profundo, rica em proteoglicanos e fibrilas de colágeno, apresentou aumento na espessura nos animais mais velhos. No tendão calcâneo, nas mesmas idades, a matriz pericelular passa por alterações progressivas, resultando numa malha de fibrilas de colágeno nos indivíduos idosos. Nas regiões de tensão as células apresentaram citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso. No tendão calcâneo a capacidade de síntese das células parece diminuir antes que no tendão flexor digital profundo. Em ambos os tendões as fibrilas de colágeno apresentaram diâmetros menores na região de compressão em relação a de tensão. As médias dos diâmetros das fibrilas de colágeno de todas as regiões apresentaram aumento entre as idades de 30 e 180d com diminuição nos indivíduos de 730d. As regiões de tensão do tendão calcâneo e flexor digital profundo apresentaram intumescimento mais acentuado em ácido acético que as de compressão. O conteúdo de água apresentou valores semelhantes entre as todas regiões e

idades. A presença de glicosaminoglicanos foi maior nos indivíduos mais jovens. Contudo, nos animais mais velhos foram detectados conteúdos maiores nas regiões de compressão. O conteúdo de proteínas solúveis foi maior nas regiões de tensão enquanto que os conteúdos de ácido urônico e glicosaminoglicanos sulfatados foram mais proeminentes nas regiões de compressão. O glicosaminoglicano predominante em todas as regiões do tendão calcâneo e flexor digital profundo foi o dermatam sulfato. O condroitim sulfato também foi detectado, mas somente na região de compressão de indivíduos com 30d. Fibromodulim e o decorim foram detectados em todas as regiões e idades. O teste imunológico para fibromodulim demonstrou diferentes graus de associação com o colágeno entre as idades. O decorim parece mais evidente nas regiões de compressão de animais com 180d. O tendão calcâneo apresentou aumento progressivo da tensão de ruptura e módulo elástico durante o envelhecimento enquanto que no tendão flexor digital profundo foram observados aumento nos valores entre 30d e 180d e diminuição aos 730d. Os tendões analisados parecem apresentar respostas biológicas semelhantes aos diferentes tipos de forças a que são submetidos, no entanto, as variações qualitativas e quantitativas observadas devem estar relacionadas às diferenças na exigência funcional durante o envelhecimento.

Summary

The rat calcaneal and digital flexor tendons are structures which are adapted to resist tension forces. In some regions, these tendons also support compression forces. In these areas the fibrous tissue develops a fibrocartilage metaplasia. The aim of this work was to analyse the mechanic behaviour of these tendons, structural organization and extracellular matrix composition of the different regions subjected to tension and tension/compression of the tendons during aging (30/180/730 days old). The calcaneal tendon was divided into the proximal region (tension) and distal region (compression) and digital flexor tendon into two tension areas (proximal and distal) and one compression area (intermediate). The fibrocartilage of calcaneal tendon increased longitudinally with age, while in the digital flexor tendon, it developed transversally. Proteoglycans are concentrated in the pericellular matrix of both tendons' differentiated cells. The presence of the proteoglycans in the collagen fibres seem to decrease during aging in the calcaneal tendon and increase in the digital flexor tendon. The collagen fibres organization and basophilia in the extracellular matrix of tension regions did not change during aging. The ultrastructure of the cells in the compression region revealed a cytoplasm rich in cytoskeleton filaments. The pericellular matrix, rich in proteoglycans and fibrils, progressively increases with aging in the flexor digital tendon. During this period, it undergoes progressive alterations in calcaneal tendon which result in a network of fine fibrils in older individuals. In the tension region, cells present a cytoplasm rich in rough endoplasmic reticulum. Cells from calcaneal tendon seem decrease their synthetic metabolism before those in the digital flexor tendon. Collagen fibrils in compression regions from both tendons present smaller diameters. The mean diameter from fibrils in all regions show an increase among 30d and 180d and a decrease within 730 days old animals. In relation to compression regions, the tension regions from both tendons show a swelling increment in acetic acid. Water content was similar in all regions and ages. Glycosaminoglycan content was higher in young animals. During aging, however, the compression regions showed higher glycosaminoglycan content. The content of soluble protein was higher in tension regions, whereas in compression regions was observed a prominent content of uronic acid and glycosaminoglycan in the extracts. Dermatan sulfate

was the most abundant glycosaminoglycan found in all regions from calcaneal and digital flexor tendon. Chondroitin sulfate was only detected in compressive regions of 30 days old rats. Fibromodulin and decorin were present in all regions and ages. Fibromodulin's immunoblotting demonstrated different degrees of association with collagen during aging. Decorin seems to be more prominent in compression regions from 180 days old animals. The calcaneal tendon presents a progressive rise in tension of rupture and elastic modulus during aging whereas in the digital flexor tendon it was observed a progressive rise in the values among 30 and 180 days and a decrease in 730 days old rats. The tendons seem to present similar biological responses to different types of forces which they were submitted. The observation of quantitative and qualitative variations, however, must be related to differences in functional stress during aging.

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. O envelhecimento é, portanto, universal, progressivo e intrínseco de todos os seres vivos (Lane et al., 1987). Com a idade, ocorrem alterações estruturais e fisiológicas em todos os sistemas orgânicos. O envelhecimento é resultado de fatores genéticos, dietéticos, ambientais e sociais (Collins & Exton-Smith, 1986). Os processos primários de envelhecimento são diferentes entre as espécies animais e suas alterações morfológicas e fisiológicas são reflexos desses processos (Hart & Turturro, 1985; Hayflick, 1985 e Medvedev, 1990).

Nos mamíferos, de uma maneira geral, o envelhecimento é caracterizado por declínio geral na competência funcional do organismo e redução da capacidade de resposta eficiente ao estresse ambiental (Rose, 1991). A redução da competência funcional dos sistemas no organismo, ao longo do tempo, é resultado de alterações acumuladas nas células (Schneider, 1987).

O envelhecimento celular pode ser apresentado como um acúmulo progressivo de injúrias subletais que induzem a morte celular ou no mínimo diminuem sua capacidade de responder às agressões do meio (Olson, 1987; Masoro, 1991). A fosforilação oxidativa das mitocôndrias é reduzida bem como a síntese de DNA, RNA, enzimas, receptores de superfície e fatores de transcrição. As células senescentes diminuem a capacidade de absorver nutrientes e reparar danos cromossômicos. As alterações morfológicas mais comuns incluem núcleo irregularmente lobulado, mitocôndria vacuolizadas e diminuição de organelas relacionadas a síntese de macromoléculas (Masoro, 1991). Concomitantemente, há um acúmulo permanente de pigmentos tipo lipofuscina, o qual representa um produto do acúmulo de lipídios peroxidados, evidenciando danos oxidativos. Subprodutos da oxidação de carboidratos são capazes de promover ligações cruzadas entre proteínas alterando sua estrutura terciária (Gilchrest & Bohr, 1997). As glicosilações relacionadas a danos causados pelo envelhecimento em proteínas do cristalino pode induzir a catarata senil (Bucala & Cerami, 1992).

Embora muitos mecanismos tenham sido propostos para explicar o envelhecimento celular, trabalhos recentes centralizam em dois processos interrelacionados: a existência de um “relógio” geneticamente determinado que programaria o envelhecimento, e os efeitos contínuos da exposição ao meio ambiente que resultaria no acúmulo progressivo de danos celulares e moleculares. O conceito de um “relógio” foi desenvolvido a partir de experimentos envolvendo modelos de envelhecimento. Fibroblastos humanos normais quando colocados em cultura de tecido têm um potencial de divisões celulares limitado (Hayflick & Moorhead, 1961). Células jovens apresentam um número maior de divisões que as coletadas de indivíduos idosos. Ao contrário, células de pacientes com síndrome de Werner, uma doença rara caracterizada pelo envelhecimento prematuro, têm uma drástica redução na expectativa de vida “in vitro”. Após um número fixo de divisões as células entram em um processo de não divisão chamado de senescência celular e em seguida degeneram. Muitas alterações na expressão gênica ocorrem durante o envelhecimento celular, mas a questão chave é: quais seriam as relacionadas com a senescência celular. Por exemplo, algumas proteínas que inibem a progressão do ciclo celular, como os produtos da quinase dependente de ciclina (p21), são abundantes em células senescentes (Smith & Smith, 1996). No entanto a capacidade das células em controlar o número de replicações parece ser o mecanismo mais evidente no processo de envelhecimento.

O conceito de um “relógio” geneticamente determinado no controle do processo de senescência tem sido suportado por trabalhos recentes envolvendo análise de genes em invertebrados. Um gene, *clk-1*, do nematóide *Caenorhabditis elegans*, altera a taxa de crescimento e organiza temporalmente os processos de desenvolvimento (Lakowski & Hekini, 1996). Os vermes que apresentam uma forma mutante do gene têm uma expectativa de vida 50% maior que os outros indivíduos. No entanto, apresentam uma taxa de desenvolvimento menor e uma atividade rítmica (locomoção) mais lenta em relação aos adultos normais. Os mamíferos e *Caenorhabditis elegans* apresentam genes homólogos, que estão sendo intensamente estudados (Pennisi, 1996).

Atualmente as regiões teloméricas dos cromossomos têm recebido especial atenção. Os telômeros são pequenas seqüências repetidas de DNA (TTAGGG) que compõem as regiões terminais dos cromossomos e asseguram a sua divisão completa além de protegerem os terminais dos mesmos contra fusões e degradações (Blackburn & Greider,

1995). As sequências teloméricas são sintetizadas por uma ribonucleoproteína, a telomerase. Essa enzima mantém estável o comprimento do telômero pela adição de sequências terminais aos cromossomos (Morin, 1991). A atividade da telomerase é reprimida por proteínas reguladoras, que restringem a elongação do telômero, deste modo é criado um mecanismo sensível ao comprimento (van Steensel & Lange, 1997). A atividade telomerásica é intensa nas células primordiais (blastômeros), está presente em pequenos níveis em células tronco (mesenquimais indiferenciadas), mas está ausente em células somáticas (fibroblastos). Quando as células somáticas se dividem, uma pequena porção do telômero não é replicada, e se tornam progressivamente menores. Telômero menor é sinal indicativo da linhagem celular em senescência. Por outro lado, em linhagens imortais de células tumorais, a telomerase é reativada, e os telômeros não diminuem. Este fato sugere que a elongação pode ser importante para formação de tumores e talvez essencial para manutenção da viabilidade celular (Kim, 1994 e Holt, 1996)

Em adição ao controle genético, a expectativa de vida da célula também é determinado por um balanço entre os danos celulares, resultados de eventos metabólicos dentro da célula, e a resposta celular em reparo ao dano. Pequenos animais têm geralmente uma expectativa de vida menor e um metabolismo mais acelerado, sugerindo que a expectativa de vida de uma espécie é limitada ao consumo metabólico total ao longo da vida (Sohal & Weindruch, 1996). Um grupo de produtos do metabolismo normal muito estudado quanto ao envelhecimento, é o dos metabólitos reativos de oxigênio. Estes produtos são originados a partir da fosforilação oxidativa na mitocôndria e causam sérias modificações estruturais em lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. A soma dos danos oxidativos com o aumento da idade parece um importante componente da senescência. O acúmulo de lipofuscina com o envelhecimento parece ser um sinal claro da importância desse evento (Weindruch & Sohal, 1997).

Diversas observações experimentais suportam a idéia de uma relação inversamente proporcional entre a taxa metabólica e a longevidade. A restrição calórica em mamíferos diminui os níveis de danos oxidativos, reduzindo as alterações senis e ampliando a expectativa de vida. A variação na longevidade entre espécies é inversamente relacionada com a taxa de produção de radical ânion superóxido (Weindruch & Sohal, 1997). O aumento na expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e

catalase estendem a vida em formas transgênicas de *Drosophila* (Gilchrest & Bohr, 1997). A relação entre envelhecimento e taxa metabólica ficou reforçada pela descoberta de um gene que auxilia o controle da expectativa de vida de *Caenorhabditis elegans*, o daf-2. Este gene transcreve uma versão do receptor para insulina, associando deste modo, o envelhecimento ao metabolismo da glicose (Kimura, 1997). O aumento de danos oxidativos podem também ser resultado de exposições ambientais repetidas a radiação ionizante, ou redução progressiva de mecanismos de defesa antioxidante, como SOD por exemplo, ou ambos (Gilchrest & Bohr, 1997).

O número de respostas protetoras disponíveis deve contrabalançar os danos sofridos pelas células. Um dos mais importantes é o reconhecimento e reparo de DNA danificado (Gilchrest & Bohr, 1997). Embora a maioria do DNA modificado seja reparado por enzimas endógenas, algumas alterações persistem e acumulam com a idade. Várias evidências confirmam a importância do reparo do DNA no processo de envelhecimento. Pacientes com síndrome de Werner apresentam envelhecimento prematuro e um produto genético defeituoso. Este produto é uma enzima chamada DNA helicase, envolvida na replicação, reparo e abertura da dupla fita (Yu, 1996). Um defeito nesta enzima causa um rápido acúmulo de danos cromossômicos que mimetizam as alterações que normalmente acumulam durante o envelhecimento celular. A instabilidade do genoma em células somáticas é também característica de pacientes que apresentam manifestações de envelhecimento acelerado como a síndrome de Cockayne (Nance & Berry, 1994). Estudos experimentais em mutantes de leveduras mostraram que a expectativa de vida é ampliada se a resposta ao DNA danificado é aumentada (Jazwinski, 1996). Assim, o balanço entre danos metabólicos acumulados e a resposta ao dano podem determinar a taxa de envelhecimento (Guarente, 1997).

Os processos de envelhecimento promovem grandes alterações fisiológicas nos tecidos ricos em matriz extracelular (MEC). Com o aumento da idade, por exemplo, aumenta a rigidez das paredes dos vasos, há perda da elasticidade dos pulmões e da pele, diminuição da motilidade articular e ainda redução da permeabilidade da membrana basal a certos solutos (Kohn, 1978). Estas alterações estão associadas às modificações das macromoléculas que compõem a MEC. O metabolismo alterado, associado a meia-vida

longa dessas moléculas no tecido, contribui para aumentar a susceptibilidade às modificações estruturais (Sell & Monnier, 1995).

Particularmente, tendões guardam complexas relações estruturais e organizacionais entre os componentes da MEC, que permitem que eles desempenhem suas funções mecânicas com ampla margem de segurança. Contudo, o seu comportamento viscoelástico também sofre alterações com o envelhecimento (Viidik, 1973). Dessa maneira, o tendão é um modelo valioso para estudo do envelhecimento da MEC, uma vez que pode ser obtido livre da contaminação de outros tecidos.

Anatomicamente, os tendões são estruturas integrantes do sistema músculo-esquelético. De caráter fibroso, eles são altamente resistentes e ligam os músculos aos ossos, transmitindo sua ação. Apresentam coloração esbranquiçada e brilhante devido aos espessos feixes de fibras colágenas. O estudo histológico mostra um arranjo denso e paralelo de feixes de fibras de colágeno associados às células que se posicionam, obedecendo a direção dos feixes (Williams et al., 1989). Estes feixes quando em repouso apresentam arranjos regulares e sinuosos denominados de “crimp”. A periodicidade e amplitude do “crimp” parece ser espécie-específico (Kastelic et al., 1978). As células jovens dos tendões, ou tenoblastos, apresentam características fibroblásticas, com grande quantidade de organelas responsáveis pela síntese e exportação das macromoléculas da MEC. As células maduras, ou tenócitos, possuem uma estrutura alongada com numerosos prolongamentos celulares ao longo do seu comprimento. Estas expansões citoplasmáticas aparecem envolvendo as fibras de colágeno. Em vários casos foram freqüentemente observadas fibras elásticas associadas com as células (O'Brien, 1992).

Todo feixe de fibras de colágeno é envolvido por uma rede de tecido conjuntivo frouxo chamado endotenônio. Este envoltório une os feixes de colágeno e permite algum movimento entre eles, conduzindo a entrada de vasos sanguíneos e nervos no interior do tendão. O tendão, por sua vez, está completamente envolvido por uma fina bainha de tecido conjuntivo chamada epitenônio, contínuo com a superfície interna do endotenônio. Além dessas bainhas, existe uma membrana externa de tecido conjuntivo frouxo e adiposo que envolve o tendão chamada paratenônio. Esta última é facilmente removível e facilita o deslizamento do tendão contra as superfícies laterais (Kastelic et al., 1978).

Com o envelhecimento a população de células sofre muitas mudanças subcelulares e ao mesmo tempo ocorre uma diminuição na densidade das mesmas por unidade de superfície de tendão (Moore & De Beaux, 1987). O tenócito fica mais alongado e fino e a relação núcleo/citoplasma dessas células aumenta sendo que a maior parte do volume celular é ocupado pelo núcleo. A cromatina ao mesmo tempo vai sofrendo uma compactação crescente, e a atividade citoplasmática vai diminuindo, particularmente, a síntese de proteínas (Ippolito et al., 1980; Moore & De Beaux, 1987 e Best & Garret, 1994). Também foi observado que com o aumento da idade as vias metabólicas aeróbias para produção de ATP sofrem um declínio considerável (Best & Garret, 1994).

O estudo qualitativo e quantitativo da MEC de tendões revelou que a molécula mais abundante é o colágeno. Ele é o responsável por 65 a 80% do peso seco do tecido. O restante é representado por células, proteoglicanos (PGs) e outras proteínas da matriz (Liu et al., 1995).

As células do tecido conjuntivo produzem tipos particulares de colágeno dependendo das circunstâncias fisiológicas a que são submetidas (Nimni & Harkness, 1988).

Atualmente, dezenove tipos geneticamente distintos de colágeno foram identificados. A distinção entre eles é baseada na composição de aminoácidos e de domínios dentro da molécula (van der Rest & Garrone, 1991; Burgeson & Nimni, 1992 e Mayne & Brewton, 1993). Os tipos de colágeno apresentam diferentes arranjos o que permite agrupá-los de acordo com aspectos estruturais.

As moléculas de colágeno compreendem três cadeias polipeptídicas (cadeias α) que formam uma única estrutura em tripla hélice. Cada cadeia α é composta pelo triplete repetitivo Gly-X-Y onde X e Y podem ser outros aminoácidos mas com uma grande frequência correspondem a prolina e hidroxiprolina, respectivamente. As moléculas apresentam alto grau de organização estrutural e suas triplas hélices são formadas em sentido anti-horário (Kadler et al., 1996).

Os colágenos dos tipos I,II,III,V e XI se agregam em fibrilas que apresentam estriações periódicas de cerca de 67 nm, e são os mais abundantes em vertebrados. As moléculas desses colágenos fibrilares consistem de uma tripla hélice ininterrupta de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, com terminais N- e C- não apresentando tripla-

hélice (telopeptídeos). Os telopeptídeos não apresentam as sequências triplete repetitivas e compreendem 2% da molécula e são críticos para a formação da fibrila (van der Rest & Garrone, 1991).

Por outro lado, os colágenos tipos IV, VI ao X e XII ao XIX não são fibrilares. Os tipos IX, XII, XIV, XVI e XIX não formam estruturas supramoleculares entre eles próprios, mas são encontrados integrados em fibrilas heteropoliméricas. Eles apresentam ainda pequenos domínios globulares intercalados por outros em tripla hélice. Por isso, esses tipos são conhecidos por FACIT, ou seja, colágenos associados às fibrilas com triplas hélices interrompidas. Vale ressaltar ainda alguns aspectos característicos de determinados colágenos não-fibrilares. Os tipos IV, VIII e X se agregam em estruturas semelhantes a lâminas, o tipo VI em filamentos com contas e o tipo VII como estruturas semelhantes a âncoras que contribuem para a aderência da membrana basal ao tecido conjuntivo subjacente (van der Rest & Garrone, 1991, Burgeson & Nimni, 1992 e Mayne & Brewton, 1993).

Nos tendões, há uma predominância do colágeno tipo I, mas o tipo III já foi detectado (Hermann et al., 1980 e Brodsky & Eikenberry, 1985). A presença do colágeno V (Jimenez et al., 1978) e os da classe FACIT, especialmente os tipos XII e XIV (Sugrue et al., 1989 e Castagnola et al., 1992) foram detectados em tendões de feto bovino, mas não em adultos.

A capacidade de auto-agregação lateral das fibrilas depende das características da molécula de colágeno, como a sua semelhança com um bastão rígido e a presença de sítios de interação intermolecular com espaços regulares (Miller, 1985). Esta última é resultado da sequência primária de aminoácidos com sítios ricos em resíduos polares e hidrofóbicos (Hofmann et al., 1978).

As fibrilas de colágeno do tipo I variam em diâmetro dependendo do tecido (Piez, 1984). Na córnea elas apresentam diâmetros extremamente pequenos e distribuição uniforme. Na pele e ossos apresentam valores intermediários, mas com grande variação. Já nos tendões, estes valores são bem maiores e apresentam distribuição heterogênea (Parry et al., 1978a e Brodsky & Eikenberry, 1985). Há variações freqüentes entre tendões em diferentes estados fisiológicos (Parry et al., 1978a) e no mesmo tendão submetido a diferentes forças mecânicas ao longo do sua extensão (Merrilles & Flint, 1980).

O controle do diâmetro das fibrilas reside também em fatores extrínsecos à própria sequência primária das cadeias α , como o processamento extracelular específico na superfície celular e a presença de diferentes tipos de colágenos na mesma fibrila (Brodsky & Eikenberry, 1985). Outro fator essencial é a extensão das modificações pós-traducionais que as moléculas de colágenos estão sujeitas. Para a formação da tripla hélice são fundamentais as hidroxilações, os níveis de glicosilação bem como as ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno (Eyre et al., 1984 e Miller, 1984).

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

Como a fisiologia e as características estruturais dos tendões estão relacionados a uma MEC fibrosa, é natural que grande parte dos eventos associados ao envelhecimento dessas estruturas estejam ligados à molécula de colágeno. De um modo geral o conteúdo total e a densidade dessas moléculas aumentam com a idade (Shadwick, 1990). Isso se deve a dois fatos principais: diminuição do “turnover” do colágeno e a diminuição da síntese de enzimas colagenolíticas durante o envelhecimento (O’Brien, 1997). Devido a essa redução, o reparo dos tecidos nos indivíduos idosos é grandemente prejudicada.

Outro parâmetro modificado durante o envelhecimento nas fibras colágenas é o diâmetro das fibrilas. Estas, em geral, aumentam de diâmetro e apresentam maior variabilidades de diâmetros. No entanto estas características podem variar dependendo da fonte tecidual e de acordo com a espécie analisada (O’Brien, 1992; 1997). Do mesmo modo, as fibras passam a apresentar uma diminuição do ângulo do “crimp” em relação a um plano horizontal, e a periodicidade dessas estruturas aumenta com o passar da idade. Porém, o comprimento do “crimp” não depende somente da idade mas do estresse físico ao qual a fibra foi submetida “in situ” (Diament et al., 1972; O’Brien, 1992 e 1997). Outro fator modificador da estrutura da fibra com a senescência é o aumento do número de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno (Viidik, 1979 e Shadwick, 1990). Durante o envelhecimento as propriedades físico-químicas e mecânicas das fibras

colágenas sofrem alterações importantes. Estas modificações incluem: aumento da resistência a enzimas degradativas (Viidik, 1979), redução da solubilidade do colágeno (Viidik, 1979 e Shadwick, 1990), aumento da estabilidade térmica e rigidez mecânica (Viidik, 1979 e O'Brien, 1997), além do aumento da birrefringência de forma e intrínseca do colágeno (Vidal & Carvalho, 1990).

Outro componente da matriz fibrosa dos tendões são os PGs. Estes são importantes na manutenção e regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno e em outros eventos no tecido (Iozzo & Murdoch, 1996). Os PGs representam menos de 1% do peso seco nos tecidos fibrosos. São moléculas constituídas basicamente por um esqueleto protéico central e por pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAG) covalentemente ligada. A enorme variabilidade molecular observada, tanto no esqueleto protéico quanto nas diferentes classes de GAGs ligados, permite aos PGs desempenharem diversas funções nos tecidos (Iozzo & Murdoch, 1996).

A presença de PGs contendo dermatam sulfato (DS) em animais recém-nascidos foi demonstrada em tendões de cauda de rato (Scott et al., 1981). Vogel & Heinegård (1985) demonstraram a presença de grandes e pequenos PGs em tendões bovinos adultos. A preocupação destes autores estava em distinguir as regiões sujeitas a tensão daquelas sujeitas também a compressão. Nas regiões sujeitas a compressão os grandes PGs detectados foram ligeiramente menores que os obtidos de cartilagem. Outra particularidade detectada nos PGs desses tendões foi a presença de queratam sulfato (QS) (Vogel & Thonar, 1988).

Os pequenos PGs, decorim (Dec) e biglicam, descritos primeiramente em cartilagem articular de boi (Heinegård et al., 1986), também foram descritos em tendões de bovinos adultos (Vogel & Heinegård, 1985). Essas moléculas possuem porções protéicas com grande homologia na composição e na sequência de aminoácidos e apresentam uma ou duas cadeias de DS, decorim e biglicam, respectivamente (Heinegård & Pimentel, 1992). O Dec interage com as fibrilas de colágeno e regula a fibrilogênese "in vitro". O biglicam não interage com colágeno, ficando disperso nos espaços entre as fibrilas (Fleischmajer et al., 1985 e 1991). A ligação do Dec com o col não depende da cadeia de GAG mas do esqueleto protéico (Vogel et al., 1984). A estabilidade da interação é dependente da conformação nativa do Dec estabilizada por pontes dissulfeto (Scott et al., 1986).

Além dos DS-PG, o fibromodulim (FM) foi detectado em tendões. Este pequeno PG possui quatro cadeias de QS e seu esqueleto protéico apresenta homologia com os do DS-PG (Oldberg et al., 1989). Como o Dec, FM interage com o colágeno, regulando também sua fibrilogênese (Hedbom & Heinegård, 1989). A associação entre PGs e colágeno ocorre de forma ordenada e promove a integridade e a manutenção das propriedades de diferentes estruturas (Scott, 1988).

A associação entre biglicam e as fibrilas de colágeno não ocorre, mas há necessidade de condições drásticas para sua remoção do tecido, sugerindo assim uma associação com outros elementos da matriz (Oldberg et al., 1989).

Embora os eventos relacionados com o colágeno recebam maior destaque na fisiologia do tendão durante o envelhecimento, os PGs também sofrem alterações importantes neste período. De um modo geral, o volume do tendão aumenta, porém o conteúdo de PGs e água diminui com a senescência (Ippolito et al., 1980; Best & Garret, 1994 e Tuite et al., 1997). A diminuição quantitativa dessas moléculas é mais pronunciada no período de amadurecimento dos animais e menos em idades mais avançadas (Sell & Monnier, 1995).

Todas essas modificações teciduais contribuem para alterar o controle da fibrilogênese bem como diminuir a capacidade intrínseca de deslizamento das moléculas de colágeno (Parry et al., 1982). Esse tipo de interação, e a ordenação apresentada pelos próprios carboidratos ligados ao colágeno, servem de base para explicar o mecanismo de controle das características bioquímicas e biomecânicas do tendão pelos tendinócitos (Vidal, 1966, 1969 e 1993). As propriedades biológicas e mecanofisiológicas da matriz fibrosa dos tendões é dependente também do grau de agregação e ordem molecular dos seus componentes (Vidal, 1986). Sendo assim, os tenócitos estão aptos a detectar as alterações de cargas expostas na superfície das fibras. A perda na associação ordenada do col e PG, devido a ação de forças mecânicas exporia a célula a um desequilíbrio de cargas (Vidal, 1993), ativando mecanismos eletroquímicos de monitoração da matriz pela célula (Gillard et al., 1979).

O aspecto mais peculiar, no entanto, está relacionado às variações fisiológicas que os tendões podem apresentar ao longo de sua estrutura. Essas variações são observadas em tendões que sofrem mudanças de direção, contornando uma extremidade óssea ou

articulação. O tendão nessa situação é comprimido, recebendo forças adicionais durante a sua atuação. Portanto, além da tensão, o tendão se adapta às torções, fricções e compressão. Nessas regiões, os tendões passam a apresentar uma matriz diferenciada, semelhante a cartilagem, com síntese de grandes PGs e colágeno do tipo II. Morfologicamente, é uma estrutura tipicamente fibrocartilaginosa com células arredondadas, fibrocondrócitos, e intensa basofilia intercelular (Vogel & Koob, 1989; Willians et al., 1989).

Sendo assim os tendões são, portanto, um excelente modelo biológico para se estudar as adaptações funcionais, bioquímicas e morfológicas que ocorrem durante o envelhecimento.

Com os dados obtidos na literatura, nós entendemos que a investigação da composição, morfologia em suas diferentes regiões e do comportamento mecânico desses tendões em diferentes idades é de vital importância para o entendimento da plasticidade dos tecidos conjuntivos.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar os tendões calcâneo (TC) e flexor digital profundo (TFDP) de ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) púberes (30d de idade), adultos (180d) e senis (730d). Estas tendões apresentam regiões que suportam forças compressivas, sem comprometer a transmissão de forças de tensão. Através de análises bioquímicas, biomecânicas e estruturais foram estabelecidos parâmetros organizacionais visando correlacionar a composição da matriz extracelular, as propriedades mecânicas e a estrutura dos tendões à sua fisiologia nas três idades.

Material e Métodos

A-) OBTENÇÃO DO MATERIAL

Os ratos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*) foram obtidos do Biotério Central da UNICAMP e mantidos junto ao biotério do Departamento de Biologia Celular - IB/UNICAMP.

Indivíduos machos foram agrupados em três lotes de trinta indivíduos cada. Cada lote foi separado e mantido no Biotério até atingirem as idades de 30, 180 e 730 dias de vida. A manutenção dos animais utilizados para as análises seguiu a rotina normal do funcionamento do biotério. Os ratos envelheceram em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*. Não houve qualquer tipo de exercício adicional, sendo portanto, os animais considerados como indivíduos sedentários.

No momento em que atingiram as idades propostas, os animais foram sacrificados com uso de éter etílico e tiveram as patas posteriores dissecadas para remoção de dois tendões: o tendão calcâneo (TC) e o tendão do músculo flexor digital profundo (TFDP).

Os tendões foram divididos em regiões segundo Covizi (1995):

- TC: dividido em duas regiões, uma denominada região proximal (*p*), que é a região que vai em direção ao tríceps sural, e a outra, que se dirige ao calcâneo onde se insere, denominada região distal (*d*).

- TFDP: dividido em três regiões, denominadas proximal (*p*), que se origina no músculo flexor digital profundo e se dirige a pata; intermediária (*i*), que está entre a região proximal e a distal (*d*), a qual compreende uma região do tendão que ramifica em direção aos dígitos.

B-) ANÁLISE MORFOLÓGICA

1) Medidas Biométricas

Foram aferidos *in situ*, com o auxílio de um paquímetro, o comprimento, a espessura, a largura e a área de secção transversa dos tendões de três animais de cada idade. Em seguida, após a remoção, os tendões foram pesados (peso úmido total).

2) Processamento para o Estudo Histológico e Histoquímico

Após a dissecação, os tendões foram banhados na solução fixadora, separados nas diferentes regiões e fixados em solução de formol a 10% em tampão Millonig pH 7,4 durante 24h à temperatura ambiente. Em seguida as peças foram lavadas em tampão e todo procedimento padrão para embebição em Paraplast™ (Merck) foi efetuado.

Cortes longitudinais dos tendões com 7 µm de espessura foram tratados pelas seguintes técnicas:

- Hematoxilina/Eosina para histologia de rotina;
- Picrosirius-Hematoxilina para posterior visualização do preparado em microscopia com o emprego de luz polarizada e observação das fibras colágenas (Junqueira et al., 1979);
- Azul de Alcian pH 2,5 e pH 1,0 (Lison, 1960 e Lev & Spicer, 1964) bem como o Método de CEC-Azul de Alcian na presença de MgCl₂ nas concentrações de 0,5 M, 0,75 M e 1,0 M (Scott & Dorling, 1965) para análise da distribuição de GAGs sulfatados e carboxilados.

Os preparados foram observados e documentados em Fotomicroscópio Zeiss-Jena sediado junto ao Departamento de Histologia e Embriologia / IB / UNICAMP.

3) Processamento para o Estudo Ultraestrutural e Citoquímico

Tendões das diferentes regiões e idades foram fixados em solução contendo 2% de glutaraldeído e 0,1% de ácido tânico dissolvidos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,3 durante 2h à temperatura ambiente. Em seguida o material foi lavado no tampão e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% durante 1h a 4^oC. Após esta etapa os fragmentos foram lavados em salina-glicosada e tratados em acetato de uranila 1% por 18h à 4^oC e por fim lavados novamente em salina glicosada e desidratados.

Fragmentos dos tendões também foram tratados com Azul de Cuprolinico para detecção ultraestrutural de PGs (Scott et al., 1989).

Após fixação nos diferentes processamentos todas as peças foram desidratadas em série crescente de etanol, e dupla passagem pelo óxido de propileno. Em seguida, foram embebidas em misturas de óxido propileno/resina epon (1:1, 1:2 e pura) e, finalmente, colocadas em moldes plásticos na estufa. Os cortes foram obtidos com navalha de vidro e diamante em ultramicrótomo Ultracut UCT (Leica), contrastados com acetato de uranila a 2% em água e com citrato de chumbo a 0,2% em NaOH 0,1 N (Reynolds, 1963).

Posteriormente foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 (Leica) para documentação. As imagens obtidas das diferentes porções, em cortes transversais dos tendões, foram digitalizadas em “scanner” de mesa marca Hewlett Packard. As imagens digitais foram analisadas em programa SIGMA SCAN Pro™ para medida do diâmetro das fibrilas de colágeno.

C-) ANÁLISE BIOQUÍMICA

1) Determinação do Conteúdo de Água

Fragmentos de tecido fresco das diferentes idades e regiões foram lavados em solução salina tamponada e pesados. Em seguida foram tratados com acetona por 24h a 4°C e novamente pesados. O excesso de líquido entre as lavagens foi removido com papel de filtro. O conteúdo de água se fez pela razão entre os dois valores obtidos (Koob & Vogel, 1987).

2) Teste de Intumescimento

Os testes de intumescimento foram realizados segundo Koob & Vogel (1987). Os tendões, coletados e divididos conforme já descrito foram pesados e imersos em solução de NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 0,05 M pH 7,0 durante 1h. A seguir foram colocados em água por 1h e por último imersos durante 1h em ácido acético 3%. Entre cada imersão o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e os tendões novamente pesados.

3) Quantificação Total e Análise Qualitativa dos GAGs

Para liberação, isolamento e quantificação dos GAGs, a partir de fragmentos das diferentes regiões dos tendões e após extração com GuHCl, foi utilizada digestão enzimática com emprego de papaína (Merck) conforme procedimento descrito por Michelacci & Horton (1989). Os GAGs obtidos foram analisados em gel de agarose segundo Dietrich & Dietrich (1976). Foram aplicadas no gel 5 µl da solução contendo os GAGs solúveis após digestão. Padrões conhecidos de GAGs contendo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foram analisados paralelamente. O tampão utilizado na cuba de eletroforese foi propileno diamino 50 mM pH 9,0. As condições de corrida foram 20 mA, 100 V durante 2h. Os géis foram fixados em

CETAVLON (Brometo de n-cetil,n,n,n-trimetil amônio) 0,1% e corados com Azul de Toluidina (AT) 0,1 % em etanol 50 % e ácido acético 1%.

4) Extração dos Constituintes de Matriz

Os tendões foram fragmentados e tratados com 25 volumes de Gu-HCl 4 M em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,8 contendo, EDTA 50 mM e PMSF 1 mM. As extrações foram processadas sob agitação constante a 4°C durante 24h. Após o período de extração as amostras foram centrifugadas a 18000 rpm durante 20 min, a 4°C em centrífuga BECKMAN J2-21 (ROTOR JA-20). Após centrifugação foram obtidas duas frações: sobrenadante e precipitado que foram estocadas a -20°C.

5) Dosagem de Proteínas Solúveis

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976). A leitura foi realizada em 596 nm utilizando espectrofotômetro HP 8452A. Para curva padrão foi utilizado albumina sérica bovina (BSA) nas seguintes concentrações: 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/ml.

6) Dosagem de Ácido Urônico e GAGs Sulfatados Solúveis

O conteúdo de ácido urônico (AU) foi determinado segundo Brown (1946). Para a curva padrão foi utilizado glucuronolactona nas seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 50 µg/ml. A detecção de GAGs sulfatados foi realizada segundo Farndale e colaboradores (1986) utilizando 100 µl de amostra para 2,5 ml de solução de Azul de Dimetilmetileno (DMMB). As leituras foram realizadas nos espectrofotômetros SPEKTROMON 195-D em 670 nm e Hewlet Packard 8452A em 526 nm.

7) Fracionamento do Extrato Total

Os extratos das diferentes regiões foram fracionados em coluna de troca iônica de dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel). A resina foi equilibrada com cinco volumes de tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 contendo uréia 7 M. Os extratos, de cada região nas diferentes idades, foram dialisados contra o tampão acima. Na coluna de DEAE-Sephacel (4,0 x 1,5 cm) foi aplicado 1 mg de proteína/ml de resina. As frações foram

eluídas utilizando gradiente de NaCl (0 - 1,2 M). A partir das alíquotas de 2,5 ml coletadas foram determinadas a absorbância em 280 nm (espectrofotômetro HP 8452A) e a condutividade elétrica (Conduvímetero HI 8819N). As frações obtidas na cromatografia foram analisadas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

8) Análise do Material Fracionado

As frações obtidas da cromatografia foram analisadas em SDS-PAGE segundo Zingales (1984) em gradiente de 4 a 16 %. As amostras, após precipitação com tampão acetato de sódio 50 mM pH 7,4 (1x volume da amostra) e etanol (9x volume da amostra) foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 1 mM e Azul de Bromofenol 0,01% com ou sem 2-mercaptoetanol (2-Me) 0,2% e fervidas durante 5 min. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%. Para cada placa foram aplicados 30 mA durante 4 h. Padrões de massa molecular (PM) foram sempre analisados em paralelo e continham fosforilase b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

A coloração do gel foi feita por impregnação pela prata segundo Blum e colaboradores (1987). A massa molecular aparente (M_r) foi inferida por cálculo da distância relativa de migração (R_f) e regressão dos marcadores (Klaus & Osborn, 1969).

9) Transferência Eletroforética de Proteínas para Nitrocelulose (“Immunoblotting”).

A partir de amostras ricas em FM e Dec foram feitas eletroforeses em SDS-PAGE (7,5 %). A seguir foram realizadas transferências de proteínas do gel para membranas de nitrocelulose de 0,45 μ m (Schleicher & Schüll, Dassel, WG) utilizando tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol (Towbin & Gordon, 1979). As membranas foram coradas pelo método Ponceau S (0,5 % Ponceau S em ácido acético 1 %). As fitas tiveram os sítios de ligações livres bloqueados com Tris 10 mM, NaCl 0,15 M e Tween 20 (0,2 % v/v) pH 7,4. A seguir, as fitas foram incubadas com soro de coelho anti-FM de galinha, diluído 1:20 ou soro de coelho anti-Dec humano, diluído 1:100 (GIBCO). O segundo anticorpo marcado com peroxidase foi soro de porco anti-Ig de coelho, diluído 1:500 (Sigma). A atividade enzimática da peroxidase foi detectada com solução DAB (50 mg de

diaminobenzidina em 100 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4) seguida da adição de H₂O₂ (0,001% de concentração final).

D-) TESTE DE VISCOELASTICIDADE

Amostras de cada tendão das diferentes idades foram utilizados para ensaio mecânico. No início do procedimento, foi determinada a área de secção transversa (**A**) em **mm²** de cada uma das amostras. Antes de cada teste foi determinado o comprimento inicial (**L₀**) da amostra. Para o ensaio, cada tendão foi fixado entre duas garras metálicas que fazem parte de um conjunto mecânico usado para determinar propriedades mecânicas de materiais. Todo o equipamento está alocado junto ao Laboratório de Materiais Cerâmicos da Faculdade de Engenharia Mecânica/UNICAMP. A seguir, um aumento gradual da carga (**Kgf**), com deslocamento constante de 20 mm/min foi aplicado sobre o tendão. Os valores apurados de tensão (**T** em **Kgf**) e deformação (**ΔL** em **mm**) durante o ensaio foram armazenados em sistema de aquisição de dados até a ruptura das fibras (**L_f**). Durante os procedimentos, para que não houvesse ressecamento das fibras, os tendões foram constantemente banhados com solução fisiológica. Para padronização da curva deformação por tração os dados médios de deformação e tensão foram convertidos segundo as fórmulas $\Delta L = L_f - L_0 / L_0$ e $T \times 10 / A$, respectivamente. Na elaboração do gráfico, os valores padronizados para deformação foram lançados no eixo das abcissas e os de tração (em **N/mm²**) no eixo das ordenadas. A partir das curvas foram analisadas as seguintes propriedades biomecânicas: **Tensão de ruptura** - máximo valor de força (**N**) normalizado pela área de seção transversa (**mm²**) obtido no momento em que ocorreu a ruptura do tendão o que corresponde à resistência máxima à tração; **Tangente de alfa (módulo elástico - E)** - é o coeficiente de inclinação da porção linear da curva de tração por deformação, o que corresponde à rigidez elástica do tendão.

E-) ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias das quantificações bioquímicas entre as diferentes regiões e idades, bem como os valores obtidos com o teste de viscoelasticidade foram comparadas pelo Teste de Duncan em programa de computador STATIGRAPH™, ambiente Windows 95. Todos os testes foram feitos a nível de 5% significância (Beiguelman, 1991).

Resultados

1) Observações Macroscópicas dos Tendões

O TC está situado superficialmente na porção póstero-inferior da perna do animal. Sua região proximal se origina do músculo tríceps sural, nas porções finais da inserção muscular, e a porção distal se insere no osso calcâneo. O ponto de transição entre as duas regiões é o local onde as lâminas oriundas do sóleo e gastrocnêmio se fundem em uma única estrutura.

Na **Tab. 01** estão representadas as medidas de peso úmido, comprimento, largura, espessura e área de secção transversa das regiões do TC e TFDP.

Na **Tab. 01-A** estão representadas as medidas das regiões p e d do TC. O peso úmido das regiões p e d aumentou significativamente entre 30 e 180 dias e aos 730d foi semelhante ao encontrado em 180d. Somente houve diferença significativa entre as regiões p e d nos animais com 30 e 180 dias.

As medidas de largura e espessura para as regiões p e d , nas diferentes idades e comparadas entre si, não apresentaram diferenças significativas. O comprimento no TC apresentou um aumento significativo tanto na região p quanto na d de 30 para 180 dias e valores semelhantes entre 180 e 730 dias. A área de secção transversa dessas regiões nas idades analisadas não apresentaram diferença significativa.

O TFDP está localizado na porção posterior da perna do animal. Ele é encontrado póstero-lateralmente ao músculo tríceps sural. Na pata, o tendão se aloja profundamente na camada muscular média da face ventral. No seu trajeto ao longo da perna, contornando o tornozelo, o TFDP é revestido por espessa bainha sinovial. Na porção mais distal do tornozelo, essa bainha desaparece e o tendão alarga-se ramificando para os dígitos.

Na **Tab. 01-B** estão reunidos os valores obtidos para o peso úmido, largura, espessura, comprimento e área de seção transversa das regiões p , i e d do TFDP nas diferentes idades. Os valores para o peso úmido mostrou aumento significativo entre 30 e 180 dias. Entre 180 e 730d os valores foram semelhantes. Comparando as regiões dentro de cada idade foram observados em todos os casos que a região d apresentou os maiores valores seguida pelas regiões p e i .

(A)

TC Regiões	Idade (dias)	Peso Úmido (g)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Comprimento (mm)	Área (mm ²)
p	30	0,0175±0,002	3,60±0,162	2,660±0,029	6,86±0,075	9,66±0,531
d	30	0,0143±0,002	3,80±0,171	2,400±0,026	6,70±0,100	9,10±0,500
p	180	0,0491±0,007	4,31±0,193	2,066±0,023	9,60±0,144	9,60±0,528
d	180	0,0402±0,006	4,23±0,190	2,031±0,022	9,23±0,138	8,53±0,469
p	730	0,0499±0,013	4,31±0,191	2,233±0,027	9,50±0,142	9,63±0,529
d	730	0,0407±0,011	4,30±0,193	2,060±0,022	9,60±0,144	8,80±0,484

(B)

TFDP Regiões	Idade (dias)	Peso Úmido (g)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Comprimento (mm)	Área (mm ²)
p	30	0,0090±3.10 ⁻⁵	1,53±6,6.10 ⁻²	0,73±1,1.10 ⁻²	9,23±0,263	0,99±0,044
i	30	0,0075±2.10 ⁻⁵	1,33±5,8.10 ⁻²	0,65±1,0.10 ⁻²	7,43±0,211	0,87±0,039
d	30	0,0135±4.10 ⁻⁵	3,63±1,6.10 ⁻²	1,11±1,7.10 ⁻²	7,86±0,224	3,66±0,164
p	180	0,0239±8.10 ⁻⁵	1,46±6,4.10 ⁻²	1,27±2,0.10 ⁻²	8,66±0,247	1,90±0,085
i	180	0,0199±7.10 ⁻⁵	1,56±6,8.10 ⁻²	1,27±2,0.10 ⁻²	7,90±0,225	2,22±0,099
d	180	0,0395±1.10 ⁻⁴	3,10±1,3.10 ⁻²	1,16±1,8.10 ⁻²	5,00±0,142	3,62±0,045
p	730	0,0242±9.10 ⁻⁵	1,60±7,0.10 ⁻²	1,33±2,1.10 ⁻²	8,73±0,249	2,14±0,095
i	730	0,0205±7.10 ⁻⁵	1,63±7,1.10 ⁻²	1,33±2,1.10 ⁻²	7,86±0,224	2,18±0,097
d	730	0,0402±1.10 ⁻⁵	3,26±1,4.10 ⁻²	1,20±1,9.10 ⁻²	5,10±0,145	3,92±0,175

Tabela 01 - Medidas biométricas (Média aritmética e desvio-padrão) das regiões proximal (*p*) e distal (*d*) do Tendão Calcanear (TC) e proximal (*p*), intermediária (*i*) e distal (*d*) do Tendão Flexor Digital Profundo (TFDP) nas três idades analisadas (30, 180 e 730 dias).

***Avaliação estatística feita pelo Teste de Duncan a nível de 5% de significância.

As medidas de largura não apresentaram diferenças significativas entre as regiões estudadas ao longo do envelhecimento. Mas os valores obtidos entre as regiões dentro de cada idade indicaram que a região *d* supera as demais em todas as idades. A espessura das regiões do TFDP apresentaram um aumento significativo entre 30 e 180 dias. Entre 180 e 730 dias os valores não apresentaram diferenças. A análise das regiões dentro de cada idade mostrou que nos animais de 30 dias a região *d* apresentou valores mais altos que nas demais, enquanto que em outras idades não houve diferença.

Os valores apurados para o comprimento das regiões do TFDP demonstrou que somente a região *d* apresentou diferenças entre as idades. Sendo as medidas observadas nos animais de 30 dias significativamente maiores que os indivíduos mais velhos. A análise entre as regiões nas três idades mostrou que nos animais de 30 dias a região *p* apresentou os maiores valores. Nos animais de 180 e 730 dias de idade a região *p* apresentou os valores mais elevados seguida pela regiões *i* e *d*, respectivamente. A área de secção transversal para as regiões do TFDP ao longo do envelhecimento demonstrou que a regiões *p* e *i* apresentaram aumento progressivo entre 30 e 180 dias e permanecendo estáveis nos animais mais velhos. Para a região *d* não houve diferença significativa entre as três idades. Na análise entre as regiões foi demonstrado que a região *d* apresentou valores mais elevados que as demais em todas as idades.

2) Considerações Estruturais e Ultraestruturais sobre os Tendões

Os tendões foram analisados pela microscopia de luz e eletrônica. Todas as regiões do TC e TFDP nas idades estudadas foram submetidas às técnicas rotineiras para análise da organização histológica. Além disso foram utilizadas técnicas histoquímicas para análise da organização das fibras colágenas (Picrosirius) e detecção de GAGs (Azul de Alcian). Os cortes tratados pela técnica de Picrosirius foram analisados com o emprego de luz polarizada.

O TC foi dividido em duas regiões distintas, *p* e *d*. A região *p* recebe apenas forças de tensão. Já a região *d* recebe também forças de compressão. A região fibrocartilaginosa de inserção do TC ao osso calcâneo não foi considerada nessa análise.

Os dados apresentados a seguir correspondem às diferenças estruturais entre as regiões analisadas nas diferentes idades. Os resultados semelhantes entre as variáveis foram omitidos.

Histologicamente, a região de tensão (*p*) não apresenta diferenças na organização entre as três idades (**Fig. 01**). Ela apresentou poucos tenócitos distribuídos entre densos feixes de fibras colágenas propriamente ditas (**Fig. 01-A**). Já na região *d* foram detectadas grandes diferenças organizacionais com a idade. Nos animais com 30 dias foram detectados alguns grupos de células esféricas com núcleos arredondados envolvidos por um halo de citoplasma (fibrocondrócito). Com 180 dias de idade a região ocupada por essas células aumenta (**Fig. 01-B**), sendo que nos animais com 730 dias de idade foram detectadas grandes áreas de metaplasia fibrocartilaginosa.

Por um lado, as fibras colágenas da região *p* mantém a mesma organização com a idade, ou seja, feixes espessos alinhado paralelamente ao eixo maior do tendão (**Fig. 02-D(180d)**). Por outro lado, as fibras colágenas da região *d* apresentaram alterações na espessura e organização entre as três idades. Acompanhando o aumento na área da fibrocartilagem, a área ocupada por fibras finas com arranjo entrelaçado também aumenta (**Fig. 02-A(30d), B(180d) e C(730d)**).

Além da distribuição das fibras de col, a região *d* apresentou grandes alterações na distribuição dos GAGs. Para detecção dos GAGs foi utilizado Azul de Alcian em solução a pH 1,0 e 2,5 (**Fig. 03**). Estas reações não apresentaram diferenças quanto a reatividade. Na tentativa de identificar os tipos de GAGs, depositados no tecido nas três idades, foi utilizado Azul de Alcian associado a concentração crítica de eletrólitos (CEC). Esta, no entanto, não acrescentou nenhum dado significativo, pois os resultados para coloração com Azul de Alcian na presença de $MgCl_2$ 0,5 M foram semelhantes ao tratamento com solução do mesmo corante em pH 2,5. O tratamento com Azul de Alcian na presença de molaridades superiores a 0,5 M de $MgCl_2$ não apresentou coloração.

Quanto à distribuição de GAGs, foi observada uma basofilia mais intensa na matriz pericelular das células arredondadas (fibrocondrócitos) e entre os feixes de fibras colágenas (**Fig. 03-A, B e E**). Entre os indivíduos púberes e velhos, a basofilia pericelular é preservada, mas a reação entre as fibras diminui muito, permanecendo apenas em regiões



delimitadas (**Fig. 03-C, E e F**). A região *p* não apresentou reação positiva nas três idades analisadas (**Fig. 03-D**).

O TFDP foi dividido em três regiões (*p*, *i* e *d*). As regiões *p* e *d* recebem apenas forças de tensão, porém a região *i* também sofre efeitos de forças compressivas. Para análise descritiva dos perfis estruturais, entre as idades, será adotado aqui apenas as denominações, regiões de tensão, que envolve *p* e *d*, e região de compressão que compreende *i*. Antes da descrição dos parâmetros investigados é importante destacar que a área sob efeito compressivo do TFDP (região *i*) compreende cerca de um terço do comprimento total da estrutura e que as alterações estruturais descritas atingem aproximadamente metade da espessura do tendão no ponto de maior contato com o osso.

A organização histológica das regiões de tensão do TFDP se assemelham ao observado no TC. No TFDP foram observados um número maior de células achatadas (tenócitos) agrupadas em fileiras paralelas ao longo do eixo maior do tendão (**Fig. 04-A**). Com relação a região de compressão, foram observados variações significativas na morfologia do TFDP durante o envelhecimento. Nos animais com 30d de idade, essa região apresenta um epitenônio espesso, em relação aos indivíduos mais velhos, e nítidos grupos de células arredondadas (fibrocondrócitos) distribuídos no terço mais proximal à superfície de contato com o osso (**Fig. 04-B**). Nos animais com 180 dias, a espessura do epitenônio diminui consideravelmente e os fibrocondrócitos aparecem em maior número, agrupados em fileiras no sentido do eixo maior do tendão. No entanto, a área ocupada por essa região diferenciada atinge somente um terço da espessura do tendão (**Fig. 04-C**). Nas amostras de animais com 730 dias de idade, a região de compressão apresenta um epitenônio muito delgado, mas a região diferenciada com fibrocondrócitos passa a ocupar cerca de metade da espessura do tendão (**Fig. 04-D**). Em ambas, as fibras colágenas estão agrupadas em feixes espessos. A orientação desses feixes obedece a do eixo maior do tendão. (**Fig. 05**).

Em relação a basofilia, as regiões do TFDP apresentam comportamento semelhante ao observado em TC quanto à afinidade pelos reagentes. Para a análise, as imagens observadas foram obtidas após reação com Azul de Alcian em solução a pH 2,5. A presença dos GAGs foi observada na região de compressão (**Fig. 06-A, B, C e D**). No que diz respeito a idade, a deposição tecidual de GAGs acompanha a área de fibrocartilagem na espessura do tendão. A presença de GAGs ocorre preferencialmente na matriz pericelular,

Figura 01 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo do TC, de animais de 30 (**A**), 180 (**B**) e 730 dias (**C**).

Note em **A**, detalhe da transição entre a região de tensão e compressão. Observe no quadrante inferior esquerdo células com núcleos de perfis elipsóides, (→) que diferem dos outros fusiformes (➡), típicos de tenócitos (fibroblastos - F) nos outros quadrantes da ilustração.

Em **B** e **C** detalhes da região da região de compressão. Observe as mudanças no perfil do núcleo das células, menos elípticos em **B** e mais esféricos em **C**. Este perfil, após 730 dias de vida, se assemelha aos do núcleos de células das fibrocartilagens (fibrocondrócitos - Fc).

Coloração: Hematoxilina & Eosina . Aumento : 75X.

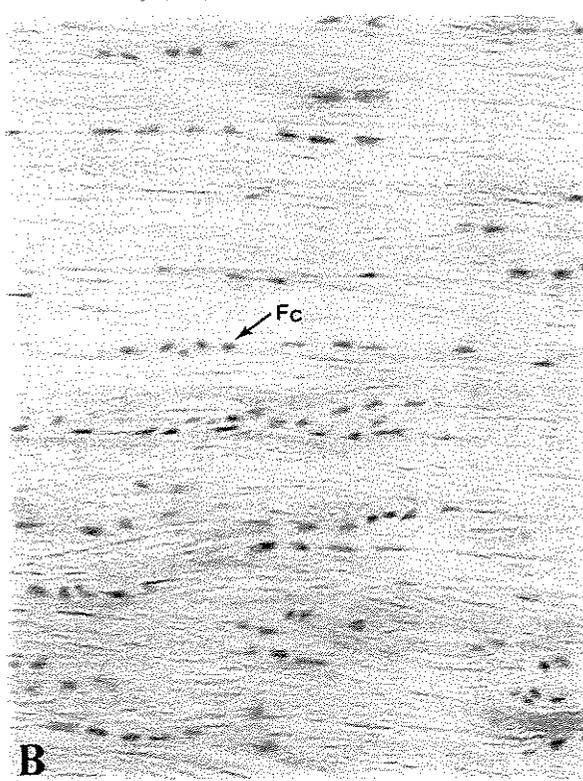
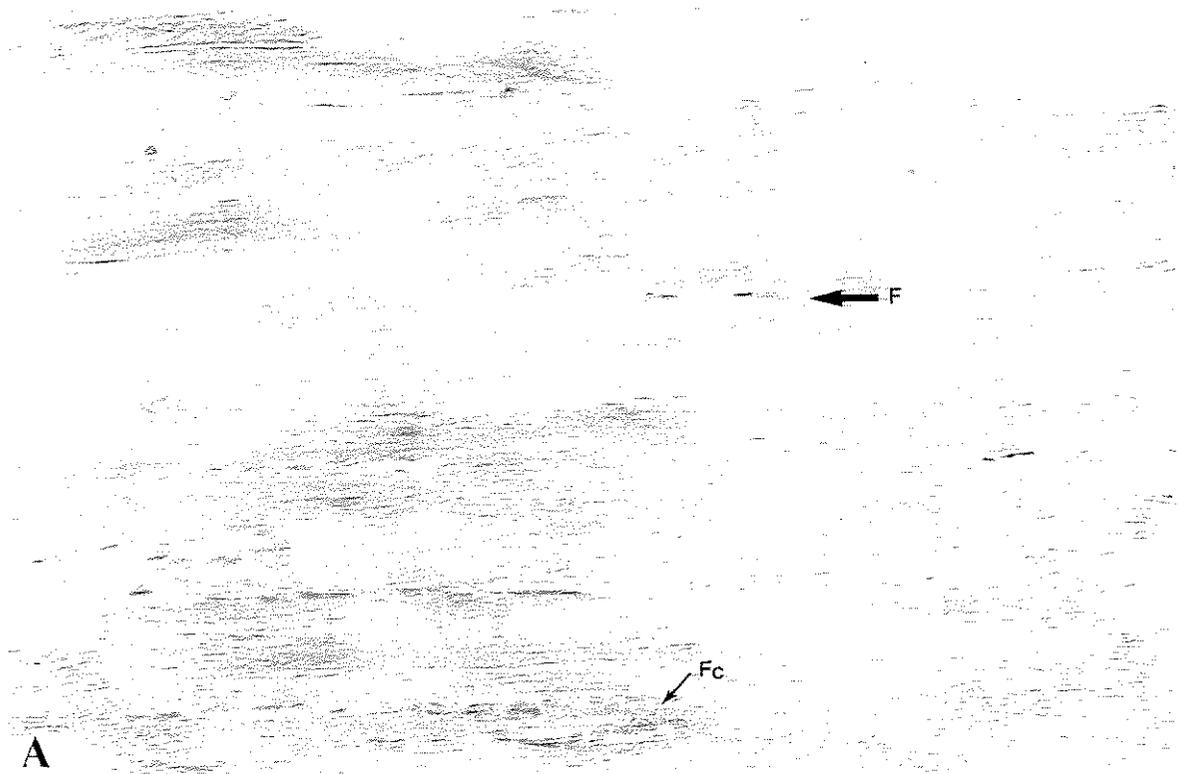


Figura 02 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo do TC, de animais de 30 (**A**), 180 (**B e D**) e 730 dias (**C**).

Em **A**, detalhe da região de compressão. Observe na porção superior da ilustração a presença de fibras de colágeno com espessura menor e arranjo entrelaçado diferindo da porção inferior que mostra fibras espessas com arranjo paralelo.

Em **B e C** detalhes da região de compressão semelhante àquela ilustrada em **A**. Observe o aumento da área ocupada pelas fibras de colágeno de pequena espessura e note em **C** a clara organização entrelaçada das mesmas.

Em **D**, detalhe da região fibrosa típica do tendão. As fibras colágenas são espessas e estão organizadas paralelamente ao eixo maior do tendão.

Coloração: Picrosirius-Hematoxilina observado ao microscópio com emprego de luz polarizada . Aumento : 150X.



Figura 03 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo do TC, de animais de 30 (A), 180 (B e D) e 730 dias (C, E e F).

Em A, detalhe da região de compressão. Observe a reação positiva na matriz pericelular dos fibrocondrócitos (→) e entre as fibras de colágeno.

Em B, detalhe da região de compressão. Note a mesma reação positiva detectada em A, mas com uma leve diminuição na basofilia entre as fibras de colágeno (➡).

Em C, E e F detalhes da região de compressão semelhante àquela ilustrada em A e B. Observe a diminuição generalizada da basofilia na matriz pericelular e entre as fibras colágenas (E). Nesta idade é possível ainda detectar áreas na fibrocartilagem que ainda conservam reação positiva na matriz fibrosa (➡) (C) e na matriz pericelular dos fibrocondrócitos (→) (E e F).

Em D, detalhe da região fibrosa típica do tendão. Não é observada nenhuma reação positiva entre as fibras colágenas.

Coloração: Azul de Alcian em solução de pH 2,5. Aumentos : A, B, D e F -150X; C - 300X e E - 75X

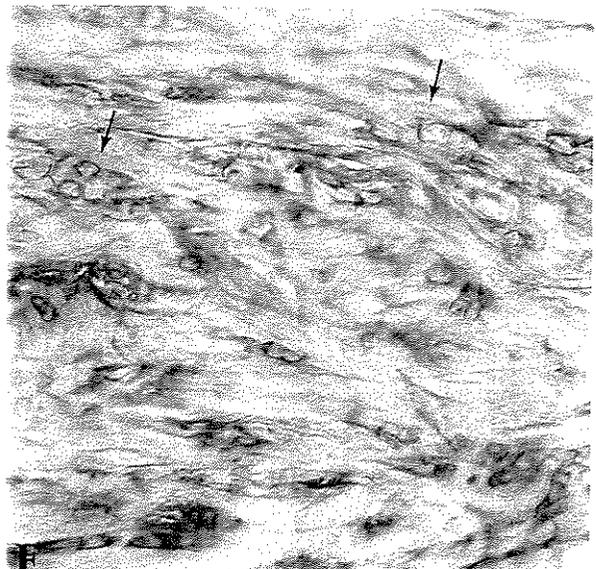
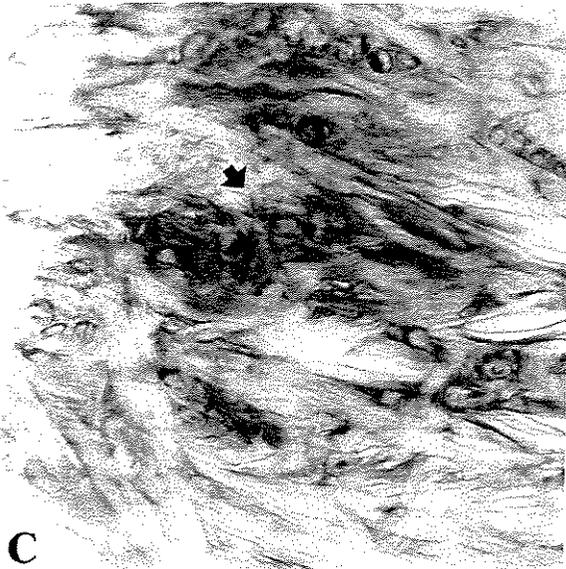
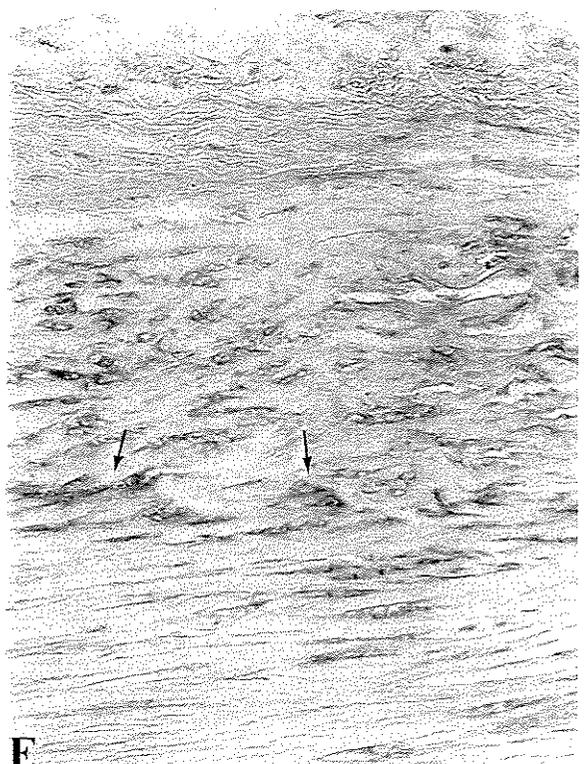
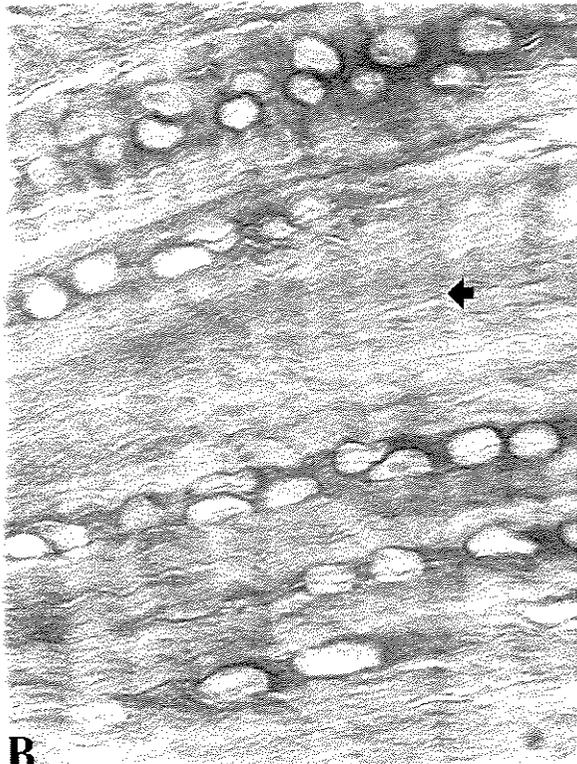
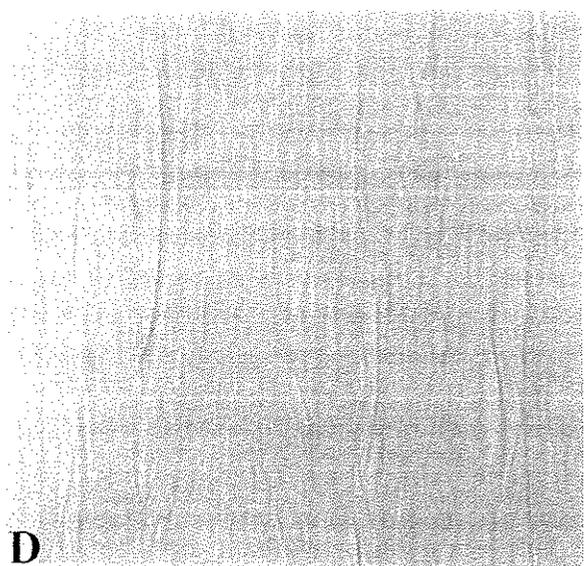
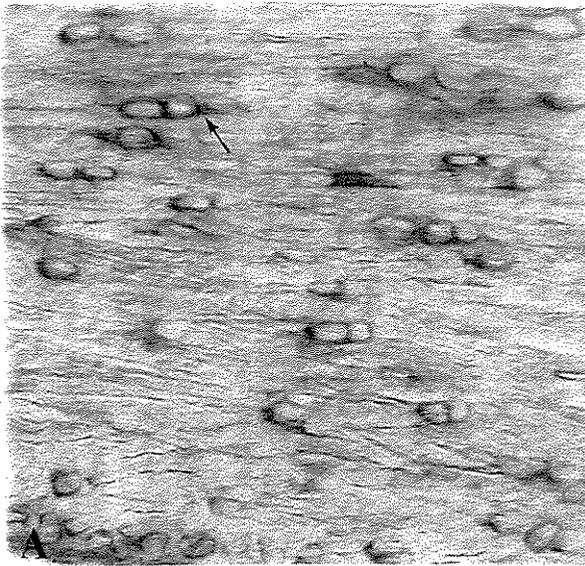


Figura 04 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo do TFDP, de animais de 30 (**A** e **B**), 180 (**C**) e 730 dias (**D**).

Em **A**, detalhe da região de tensão. Observe o aspecto fusiforme do núcleo das células, típicos de tenócitos (fibroblastos - F). As células estão distribuídas ao longo do eixo maior do tendão entre as fibras colágenas.

Em **B**, **C** e **D** detalhes da região de compressão na superfície mais próxima de contato com osso. Note a presença de células com núcleos arredondados (fibrocondrócitos - Fc) nas três figuras. Observe que, comparativamente, a quantidade de fibrocondrócitos aumenta durante o envelhecimento. Pode ser notado ainda que o epitenônio (E) parece sofrer uma diminuição na espessura no mesmo período.

Coloração: Hematoxilina & Eosina . Aumento : 150X.

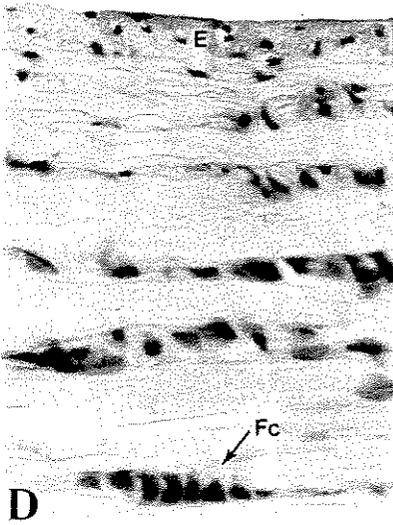
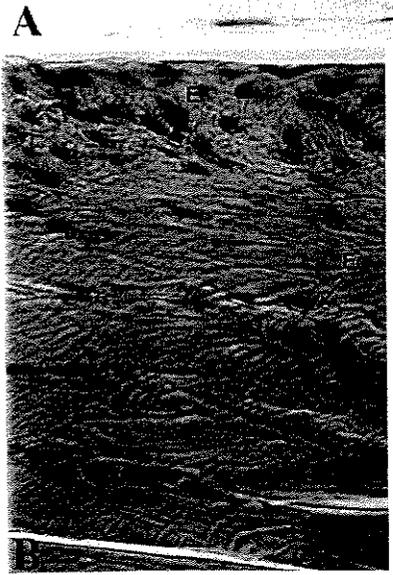


Figura 05 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo do TFDP, de animais de 30 (**A e B**), 180 (**C**) e 730 dias (**D**).

Em **A**, detalhe da região de tensão. As fibras colágenas (*) são espessas e estão arranjadas em feixes paralelos ao longo do eixo maior do tendão.

Em **B**, **C** e **D** são detalhes da região de compressão. Note a distribuição das fibras colágenas (*) entre os fibrocondrócitos (Fc). Observe em **D** detalhe de uma arcada (→) separando as células (Fc), e o epitenônio (e).

Coloração: Picrosirius-Hematoxilina observado ao microscópio com emprego de luz polarizada . Aumento : 150X.

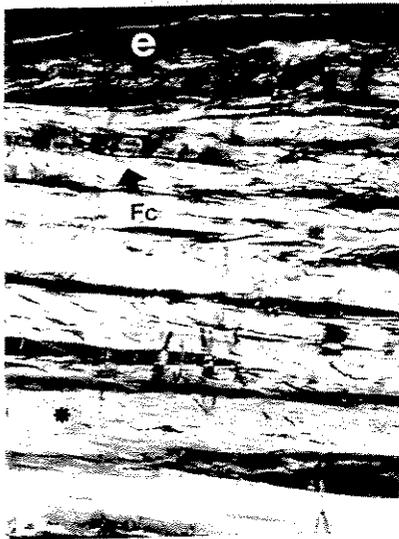
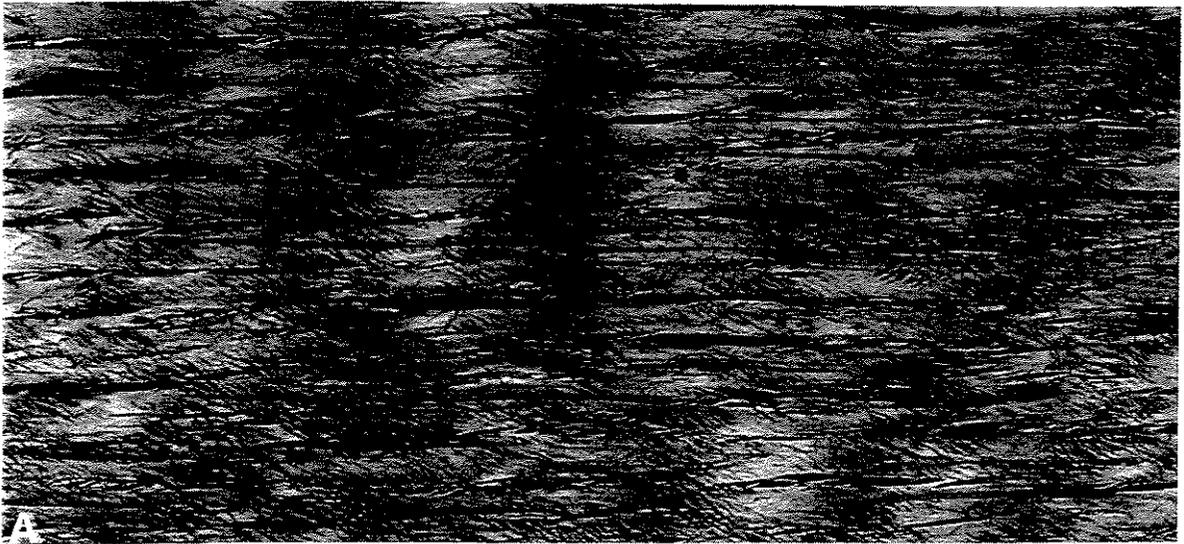
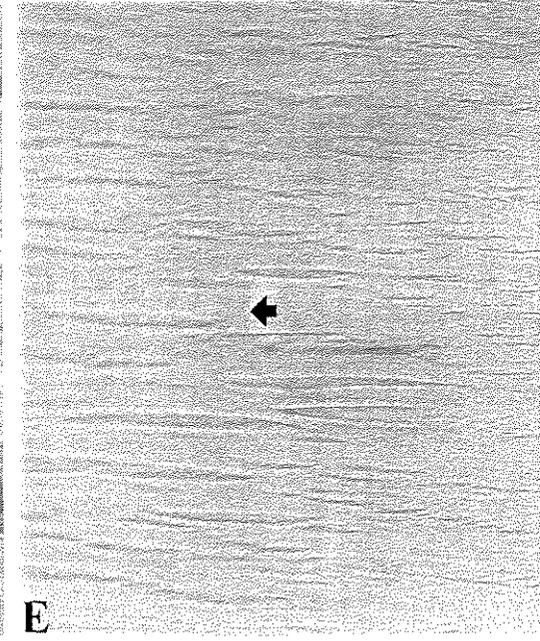
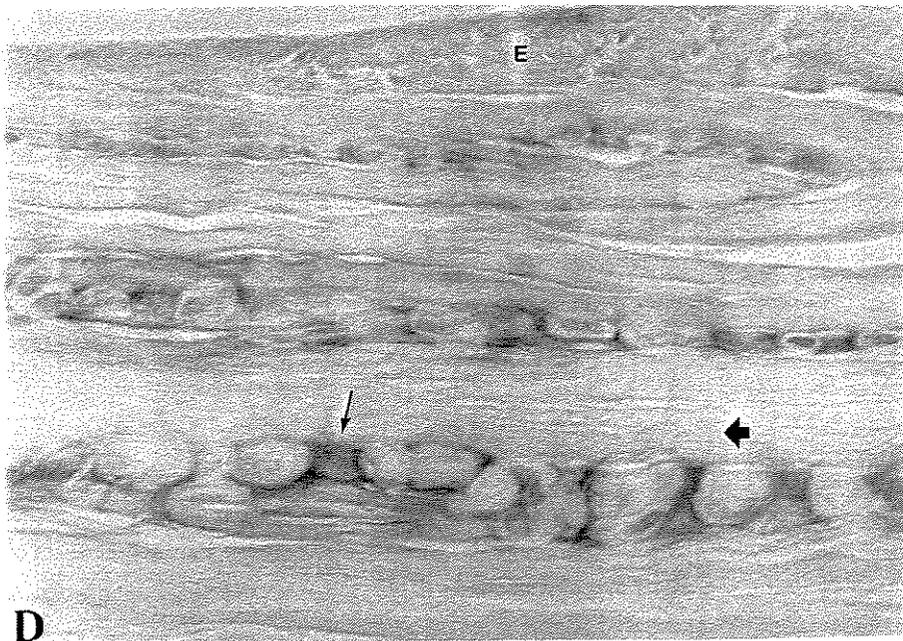
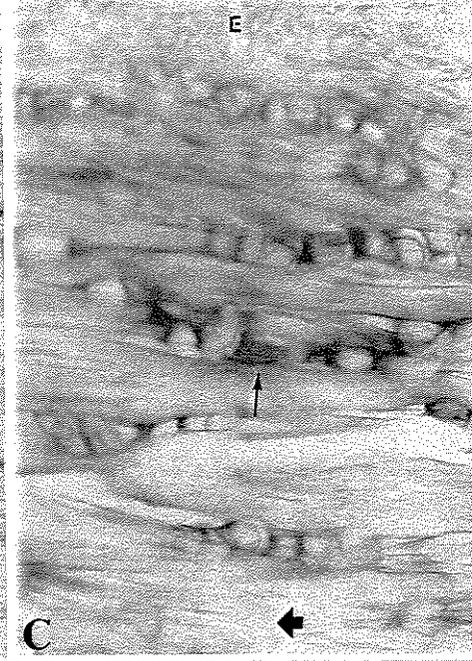
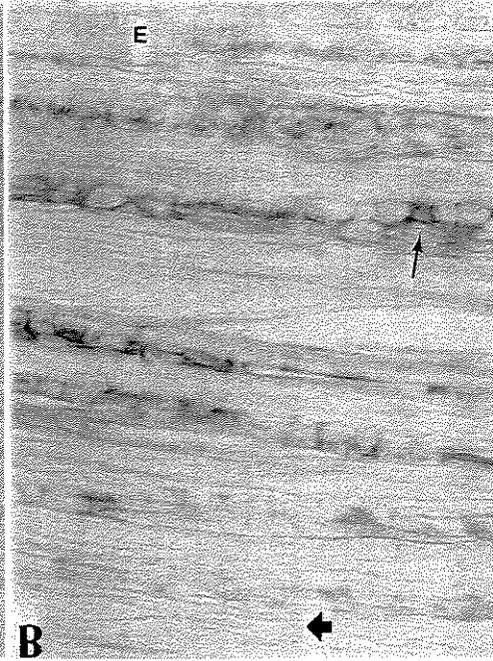
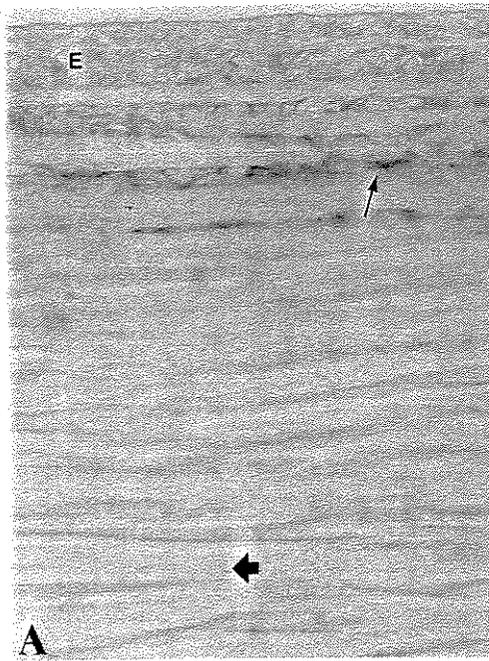


Figura 06 – Fotomicrografias de cortes histológicos, paralelos ao longo do eixo do TFDP, de animais de 30 (**A**), 180 (**B**, **D** e **E**) e 730 dias (**C**).

Em **A**, **B**, **C** e **D** ilustram detalhes da região de compressão. Observe a reação positiva na matriz pericelular dos fibrocondrócitos (→). Note em **C** na porção mais próxima ao epitenônio (**E**) leve basofilia entre as fibras colágenas. Já nas porções mais distantes da superfície não foi observada qualquer reação positiva entre as fibras (➡).

Em **E**, detalhe da região de tensão. Não foi detectada reação positiva entre as fibras colágenas (➡).

Coloração: Azul de Alcian em solução de pH 2,5. Aumentos : **A**, **B**, **C** e **E** -150X; **D** – 300X.



à semelhança do TC, no entanto, foi observada basofilia somente entre as fibras nos animais com 730 dias de idade. Esta basofilia, porém, ficou limitada nas porções mais próximas à superfície de contato com o osso.

Na análise ultraestrutural foram observadas características morfológicas das células e MEC bem como variações nas medidas dos diâmetros das fibrilas de col durante o envelhecimento. Devido as semelhanças estruturais observadas entre as regiões correspondentes, os dados foram organizados e relatados de acordo com a força mecânica a que cada região está submetida. Portanto, os resultados aqui apresentados dizem respeito às características morfológicas das regiões de tensão e compressão.

No TC, as células da região de tensão (*p*) de animais de 30d apresentam características típicas de fibroblastos (tenócitos) (**Fig. 07-B**). No entanto, durante o envelhecimento, as características citoplasmáticas foram alteradas. O retículo endoplasmático rugoso, observado nessas células, está muito desenvolvido, além disso, foram detectadas muitas microvesículas que associamos a alta atividade celular em toda a periferia celular. A cromatina dessas células apresentou pouca compactação. Os tendões dos animais mais velhos (**Fig. 07-A – 180d e C – 730d**) passaram a apresentar células com diminuição acentuada na quantidade de retículo endoplasmático rugoso e conseqüentemente na quantidade de microvesículas. A cromatina dessas células não sofreu nenhuma alteração evidente. A reação citoquímica, para evidenciar PGs da MEC, demonstrou que na região de tensão do TC estas moléculas estão depositadas sobre as fibrilas de col (**Fig. 07-D**). No envelhecimento, as características da MEC, quanto a marcação para PGs não apresentou variações.

A avaliação morfométrica mostrou que os diâmetros das fibrilas de col (**Tab. 02**) na região de tensão do TC (**Tab. 02-A**) apresentou variações significativas entre as três idades. Os diâmetros médios aumentaram entre 30 e 180d e diminuíram aos 730d. As medidas dos animais com 730d foram superiores às detectadas aos 30d.

Na região de compressão do TC (**Fig. 08**) as características morfológicas das células foram muito semelhantes. O citoplasma não apresentou predomínio de retículo endoplasmático rugoso em relação as outras organelas. No entanto o mesmo se apresentou muito rico em filamentos do citoesqueleto. A cromatina das células apresentou a mesma morfologia entre as idades. O emprego da técnica citoquímica demonstrou que a trama

fibrilar da matriz pericelular dos fibrocondrócitos é rica em PGs. As alterações morfológicas mais evidentes (**Fig. 08**) entre 30d (**A**), 180d (**B**) e 730d (**C**) estiveram relacionadas a esta matriz. A espessura da matriz pericelular pareceu regredir, quando se compara indivíduos púberes e velhos, e ao mesmo tempo era substituída por uma malha microfibrilar. A marcação dos PGs associados a fibrilas de col (**Fig. 08-D**) foi maior que a observada na região de tensão.

As medidas do diâmetro das fibrilas de col (**Tab. 02-A**) apresentaram o mesmo perfil observado na região de tensão, mas os valores apurados foram significativamente menores.

No TFDP, as células das regiões de tensão dos animais com 30d (**Fig. 09-A**) apresentaram morfologia semelhante à descrita no TC. Nos animais com 180d (**Fig. 09-B**) os tenócitos apresentaram citoplasma com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. A cromatina não apresentou alteração morfológica evidente. Nos indivíduos com 730d de idade as células apresentaram regressão generalizada no volume citoplasmático e consequentemente do retículo endoplasmático rugoso. A cromatina encontrada nessas células pareceu apresentar uma compactação maior que nas idades anteriores. A reação citoquímica para PGs apresentou o mesmo padrão da região de tensão do TC.

À semelhança do TC, as medidas do diâmetro das fibrilas de col (**Tab. 02-B**) apresentaram aumento entre 30 e 180d e diminuição aos 730d de idade. A diferença morfométrica entre o TC e TFDP reside nos valores superiores do diâmetro das fibrilas encontrados neste último.

Na região de compressão do TFDP, as células não apresentaram predomínio evidente de organelas associadas a síntese de proteínas, como observadas nas amostras da região de tensão. No entanto, no citoplasma dessas células foram observadas muitas microvesículas e numerosos filamentos do citoesqueleto. A cromatina não apresentou alteração evidente durante o envelhecimento. Contudo, a característica marcante nesta região foi a presença de uma matriz pericelular rica em PGs (**Fig. 10-D**). Quando comparamos indivíduos jovens e velhos (**Fig. 10-A** – 30d; **B** – 180d e **C** – 730d) a matriz pericelular parece apresentar um desenvolvimento acentuado.

Os valores para diâmetro das fibrilas de col na região de compressão do TFDP (**Tab. 02-B**) apresentaram, a semelhança do TC, aumento entre 30d e 180d seguida de uma

Figura 07 – Micrografias eletrônicas da região de tensão do TC de animais com 30 (**B** e **D**), 180 (**A**) e 730 dias (**C**). Ultraestrutura de tipos celulares freqüentemente observados e da matriz pericelular.

Note em **B** e **D** as células com citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso (→) e numerosas microvesículas (➡). Observe em **D** a presença dos PGs associados as fibrilas de colágeno (→).

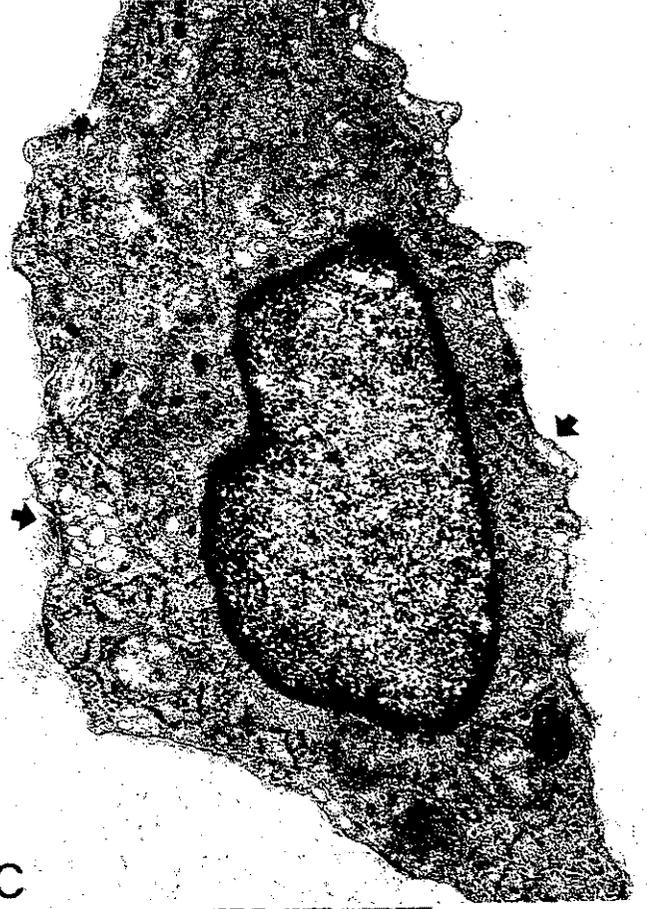
Observe em **A** e **C** que as células apresentam um citoplasma sem predomínio de uma organela em especial mas ainda são detectadas microvesículas na periferia das células (➡).

Técnica: **A**, **B** e **C** – tratamento convencional para MET e em **D** – tratamento com Azul de Cuprolinic. Aumentos: **A** e **B** – 20000X; **C** – 25860X e **D** – 33400X.

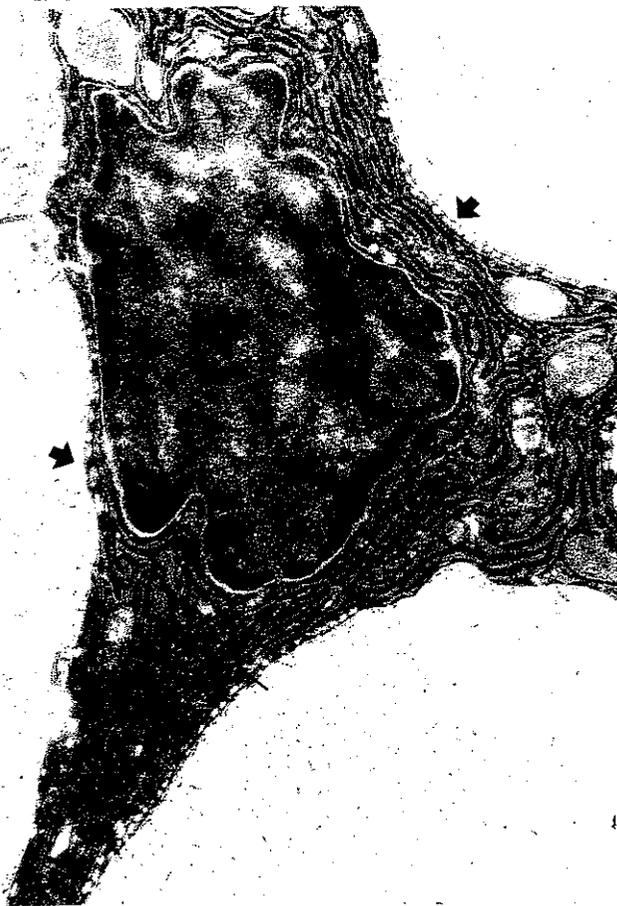
A



C



B



D



Figura 08 – Micrografias eletrônicas da região de compressão do TC de animais com 30 (**A**), 180 (**B** e **D**) e 730 dias (**C**). Ultraestrutura de tipos celulares freqüentemente observados e da matriz pericelular.

Note em **A**, **B** e **C** que as células apresentam citoplasma rico em filamentos do citoesqueleto e ao mesmo tempo não é observado predomínio de uma organela em especial. Pode ser ainda observado a presença de uma matriz pericelular (➡) em todas as idades.

Em **D**, a matriz pericelular (➡) apresenta um arranjo microfibrilar associado a PGs. Estes também podem ser observados associados as fibrilas de colágeno (→).

Técnica: **A**, **B** e **C** – tratamento convencional para MET e em **D** – tratamento com Azul de Cuprolinic. Aumentos: **A** – 25860X e **B** – 20000X; **C** – 9292X e **D** – 55600X.

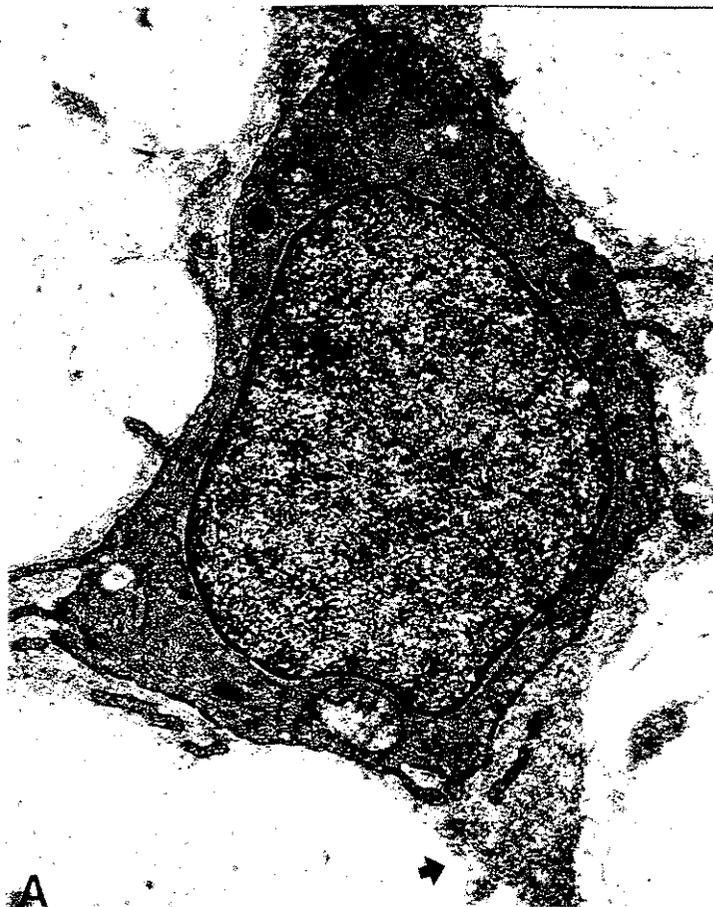
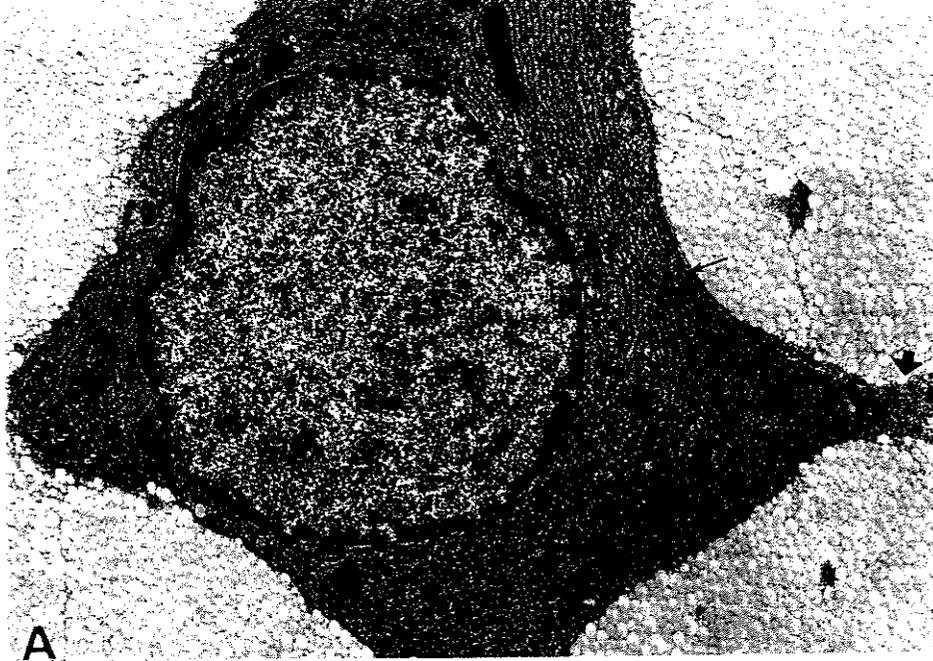


Figura 09 – Micrografias eletrônicas da região de tensão do TFDP de animais com 30 (**A**), 180 (**B**) e 730 dias (**C**). Ultraestrutura de tipos celulares freqüentemente observados e da matriz pericelular.

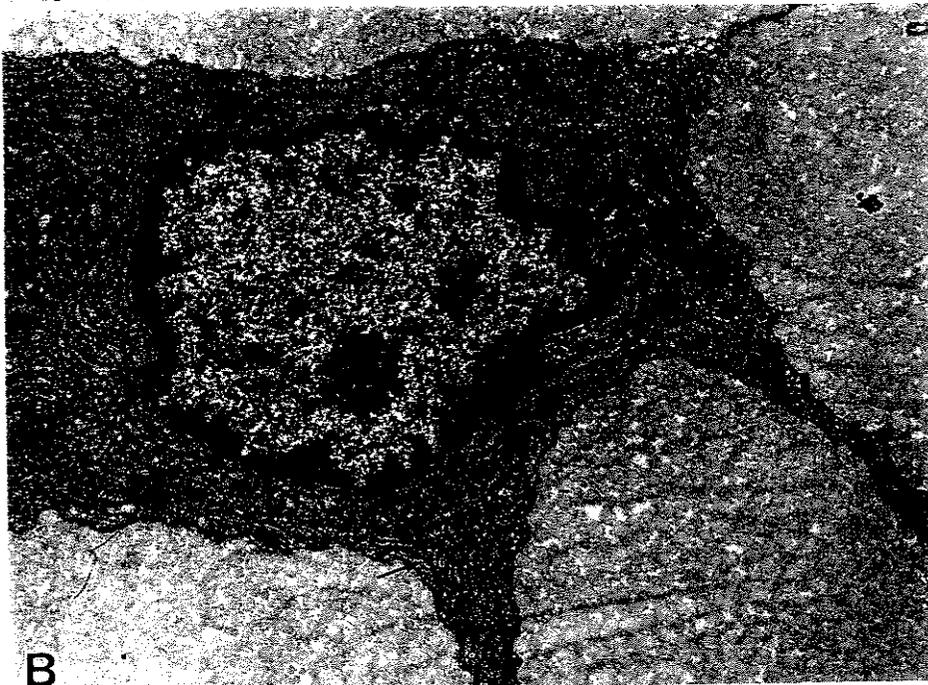
Note em **A** e **B** que a célula apresenta citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso (→). Em algumas células foi observado a presença de matriz pericelular (➡).

Observe em **C** que a célula apresenta diminuição no volume citoplasmático e redução acentuada na presença de retículo endoplasmático rugoso (→).

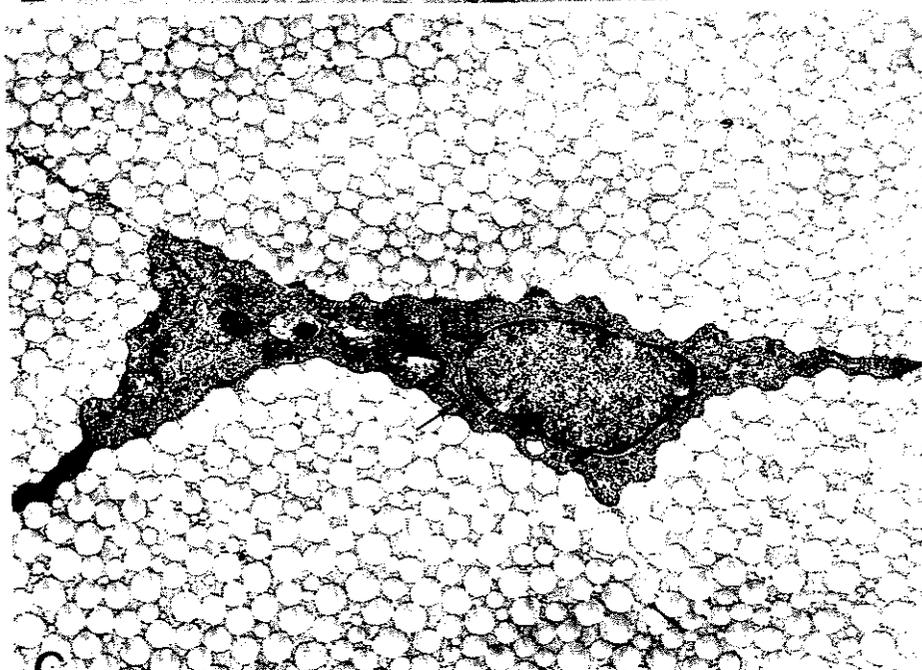
Técnica: Tratamento convencional para MET Aumentos: **A** – 12000X; **B** e **C** - 15000X.



A



B



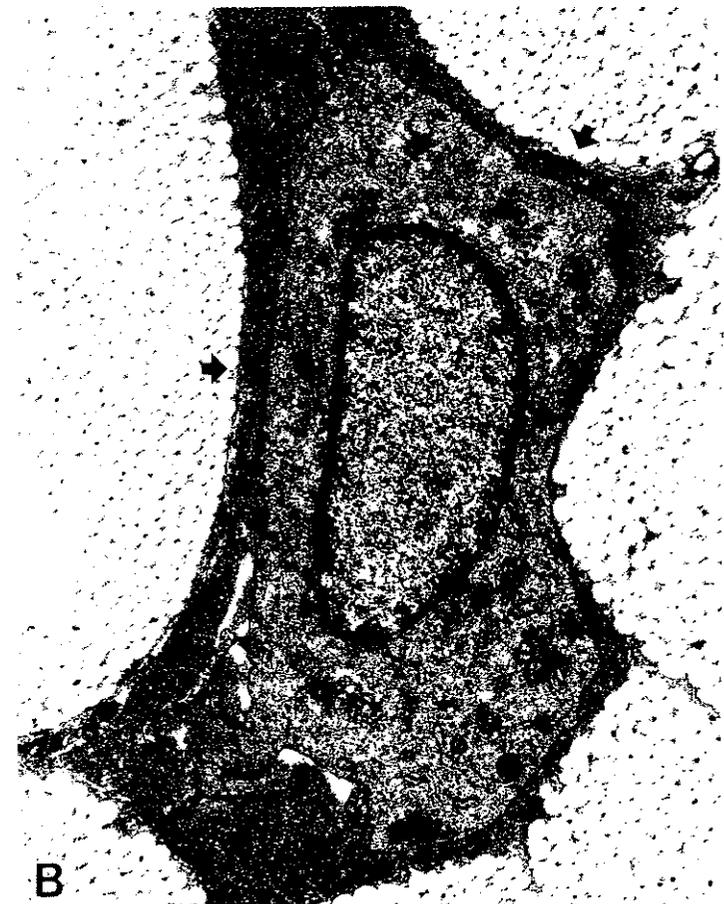
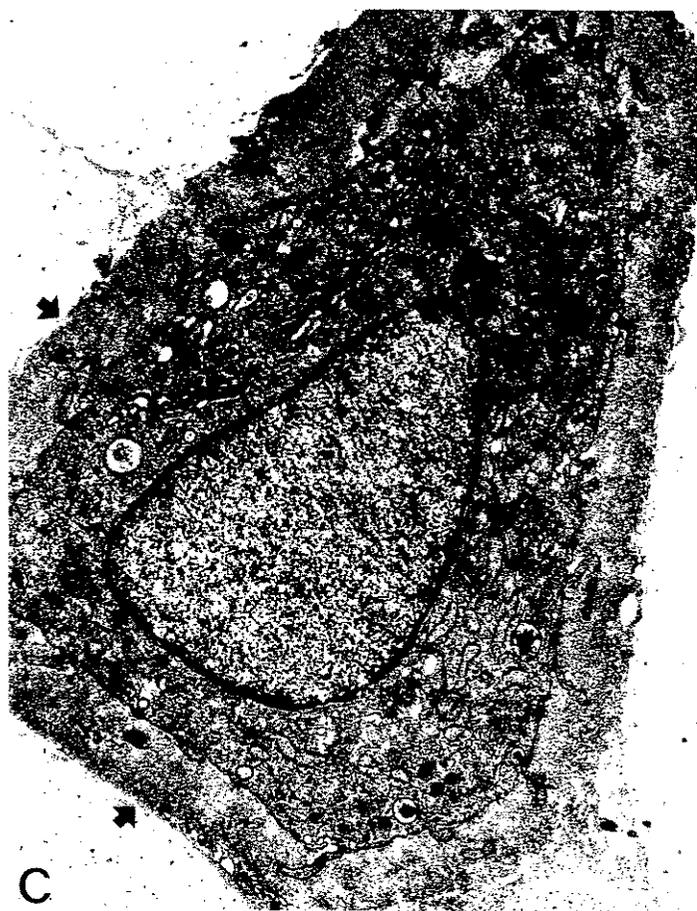
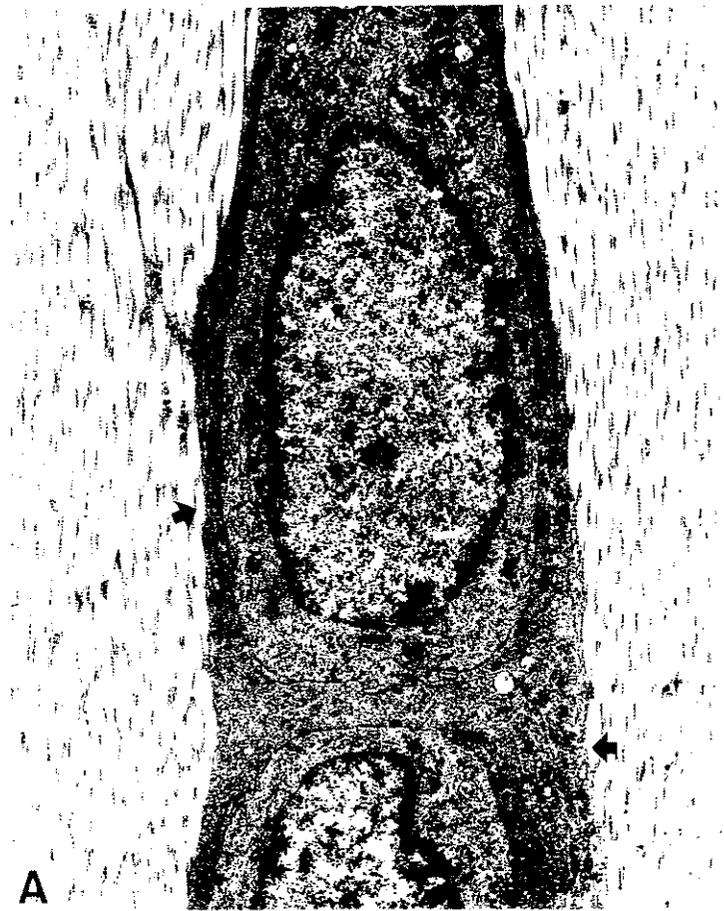
C

Figura 10 – Micrografias eletrônicas da região de compressão do TFDP de animais com 30 (**A**), 180 (**B** e **D**) e 730 dias (**C**). Ultraestrutura de tipos celulares frequentemente observados e da matriz pericelular.

Observe que as células ilustradas em **A**, **B** e **C** apresentam citoplasma rico em filamentos do citoesqueleto e numerosas microvesículas. Apesar da quantidade de microvesículas, não é observado predomínio evidente de organelas relacionadas a síntese de macromoléculas. Note ainda a presença de uma matriz pericelular (➡) em todas as idades.

Em **D**, observa-se que a matriz pericelular (➡) apresenta uma estrutura microfibrilar associado a PGs.

Técnica: **A**, **B** e **C** – tratamento convencional para MET e em **D** – tratamento com Azul de Cuprolinic. Aumentos: **A** – 9292X e **B** – 15000X; **C** – 20000X e **D** – 43120X.



(A)

TC Regiões	Idade	Diâmetro (nm)
p	30	42,3±18,6
d	30	38,7±17,8
p	180	58,6±30,5
d	180	44,1±23,7
p	730	49,9±19,6
d	730	40,6±19,8

(B)

TFDP Regiões	Idade	Diâmetro (nm)
p	30	46,2±21,7
i	30	39,8±15,1
d	30	48,3±27,1
p	180	61,3±28,8
i	180	49,1±19,4
d	180	66,2±16,6
p	730	57,8±26,7
i	730	43,7±20,9
d	730	53,9±20,5

Tabela 02 – Medidas do diâmetro (Média aritmética e desvio padrão) das fibrilas de colágeno no TC e TFDP nas diferentes idades analisadas (30, 180 e 730 dias de idade)

***Avaliação estatística feita pelo Teste de Duncan a nível de 5% de significância.

diminuição aos 730d de idade. Os valores médios se aproximaram daqueles encontrados na região de compressão do TC.

3) Teste de Intumescimento

Na **Tab. 03** estão apresentados os dados do teste de intumescimento do TC (A) e TFDP (B) em água e ácido acético.

As regiões *p* e *d* do TC (**Tab. 03-A**) embebidas em água não apresentaram diferenças significativas entre as três idades. A análise comparativa entre as regiões *p* e *d*, dentro de cada idade, não demonstrou qualquer diferença. Na embebição em ácido acético, a região *p* não apresentou nenhuma diferença entre as três idades. Por outro lado, a região *d* apresentou maior aumento no ganho de peso pela embebição aos 30 dias em relação as outras idades, que apresentaram valores semelhantes. Comparativamente, a análise entre as regiões *p* e *d*, nas três idades, revelou grande diferença, sendo que a região *p* apresentou valores muito superiores.

Para o TFDP (**Tab. 03-B**), as regiões *p* e *d* apresentaram diminuição no peso úmido após o tratamento em água entre as idades de 30 e 180d e valores semelhantes entre 180 e 730d de idade. No entanto a região *p* apresentou valores embebição maiores que a região *d*. Os valores para a região *i* apresentaram aumento progressivo no ganho de peso úmido com a embebição em água entre os indivíduos púberes e velhos. A análise comparativa entre as regiões nas diferentes idades apresentou diferenças. As amostras de animais de 30 dias a região *p* apresentou valor superior a *i* e *d*. Nos animais de 180 dias a região *d* apresentou valor menor em relação as outras. Nas amostras de animais com 730 dias foram obtidos valores significativamente diferentes entre as três regiões. Sendo que a região *i* apresentou os valores mais elevados seguida da região *p* e *d*, respectivamente. O teste de intumescimento em ácido acético para TFDP também mostrou diferenças significativas entre as regiões e idades analisadas. A região *p* apresentou valores para embebição semelhantes para animais de 30 e 180 dias e menores para indivíduos com 730 dias. Para a região *i* foram detectados valores decrescentes entre animais púberes e velhos. As amostras da região *d* não apresentaram variações entre os animais com 30 e 180 dias, mas aos 730 dias houve diminuição nos valores de embebição após tratamento com ácido acético. Por último, a comparação das três regiões, nas diferentes idades, mostrou que somente em

(A)

TC Regiões	Idade (dias)	Intumescim. (Água/PBS) (%)	Intumescim. (Ac.Acético/PBS) (%)	Conteúdo de Água (%)	Conteúdo Total de GAG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido)
p	30	-12,33 \pm 8,73	750,1 \pm 117,12	66,45 \pm 5,686	38,92 \pm 6,83
d	30	-12,66 \pm 15,35	457,08 \pm 71,29	66,01 \pm 8,297	22,84 \pm 6,52
p	180	-12,66 \pm 8,97	612,66 \pm 95,57	57,00 \pm 7,098	28,65 \pm 6,71
d	180	-11,33 \pm 8,03	261,66 \pm 40,89	73,08 \pm 9,091	42,37 \pm 9,33
p	730	-12,33 \pm 8,79	612,54 \pm 95,75	69,67 \pm 8,590	19,84 \pm 4,42
d	730	-10,83 \pm 7,68	261,98 \pm 41,68	71,65 \pm 8,429	35,80 \pm 8,61

(B)

TFDP Regiões	Idade (dias)	Intumescim. (Água/PBS) (%)	Intumescim. (Ac.Acético/PBS) (%)	Conteúdo de Água (%)	Conteúdo Total de GAG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido)
p	30	0,00 \pm 0,00	1151,6 \pm 96,52	64,66 \pm 3,055	22,33 \pm 3,03
i	30	-15,66 \pm 8,08	1137,6 \pm 95,35	75,02 \pm 3,543	18,13 \pm 2,66
d	30	-17,01 \pm 8,77	1390,8 \pm 116,5	68,03 \pm 3,212	10,69 \pm 1,53
p	180	-14,00 \pm 7,22	1213,0 \pm 101,7	77,08 \pm 3,638	19,87 \pm 2,92
i	180	-13,33 \pm 6,88	922,7 \pm 77,28	73,67 \pm 3,348	18,80 \pm 2,62
d	180	-21,66 \pm 11,18	1153,6 \pm 96,69	71,00 \pm 3,367	8,81 \pm 1,19
p	730	-15,34 \pm 7,91	766,6 \pm 64,27	77,33 \pm 3,653	11,91 \pm 1,65
i	730	-5,13 \pm 2,69	437,2 \pm 36,62	73,00 \pm 3,366	19,24 \pm 2,69
d	730	-25,01 \pm 12,97	847,7 \pm 71,04	74,00 \pm 3,496	8,93 \pm 1,27

Tabela 03 - Valores apurados (Média aritmética e desvio padrão) após teste de intumescimento em água destilada e ácido acético (%), determinação do conteúdo de água (%) e conteúdo total de GAG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) para as regiões *p* e *d* do TC e regiões *p*, *i* e *d* do TFDP nas três idades analisadas (30, 180 e 730 dias). % - porcentagem de variação entre o peso final e o peso inicial.

***Avaliação estatística feita pelo Teste de Duncan a nível de 5% de significância.

animais com 180 e 730 dias houve diferença significativa. A região *i* nessas idades apresentou valores menores.

4) Conteúdo de Água

O conteúdo de água no tecido fresco (**Tab. 03-A e B**) não apresentou diferenças significativa entre as regiões do TC (**A**) e TFDP (**B**) nas idades analisadas.

5) Conteúdo Total de Glicosaminoglicanos

Na **Tab. 03** pode ser analisado o conteúdo total de GAGs, em μg por mg de tecido.

O TC (**Tab. 03-A**) apresentou diferença significativa entre as regiões e idades. Nos tendões dos animais com 30 dias a região *p* apresentou maior conteúdo, porém nos animais com 180 e 730 dias a região *d* apresentou uma quantidade significativamente superior a região *p*. A análise das regiões ao longo do envelhecimento, demonstrou que a região *p* apresentou uma diminuição progressiva no conteúdo durante o envelhecimento. Na região *d* foi observado um aumento entre 30 e 180 dias seguido de uma diminuição aos 730 dias.

No TFDP (**Tab. 03-B**), também houve diferença significativa entre as regiões e idades analisadas. Nos dados obtidos das diferentes regiões, a região *p* apresentou diminuição no conteúdo de GAG nos indivíduos mais velhos. As regiões *i* e *d* apresentaram aumento no conteúdo entre 30 e 180 dias, permanecendo com valores semelhantes entre 180 e 730 dias de idade. Comparando as regiões, os tendões com 30 dias apresentaram maior conteúdo de GAGs na região *p* seguida da região *i* e *d*. Com 180 dias, o conteúdo de GAGs diminuiu mas a proporção foi mantida entre as regiões. Com 730 dias, a região *i* dos tendões apresentou o maior conteúdo, seguido das regiões *p* e *d*.

6) Conteúdo de Ácido Urônico nos Extratos.

O TC apresentou variações significativas (**Tab. 04-A**) no conteúdo de AU solubilizado entre as regiões e idades analisadas. A região *p* apresentou queda no conteúdo de AU solúvel nos indivíduos mais velhos. Na região *d* foi observado o mesmo comportamento mas foram detectados valores superiores. Os tendões de 30, 180 e 730 dias apresentaram um conteúdo de AU estatisticamente diferente. A região *d* apresentou valores

(A)

TC Regiões	Idade (dias)	Proteínas (mg/ml)	Ác. Urônico (mg/ml)	GAG sulfatados (mg/ml)
p	30	0,641±0,074	0,125±0,008	0,063±0,008
d	30	0,546±0,063	0,189±0,013	0,087±0,012
p	180	0,638±0,074	0,089±0,006	0,064±0,009
d	180	0,345±0,040	0,142±0,009	0,070±0,009
p	730	0,373±0,043	0,074±0,005	0,031±0,004
d	730	0,254±0,029	0,094±0,006	0,041±0,005

(B)

TFDP Regiões	Idade (dias)	Proteínas (mg/ml)	Ác. Urônico (mg/ml)	GAG sulfatados (mg/ml)
p	30	0,763±0,191	0,186±0,046	0,046±0,013
i	30	0,566±0,142	0,176±0,044	0,053±0,015
d	30	0,596±0,149	0,159±0,041	0,039±0,011
p	180	0,657±0,164	0,121±0,029	0,050±0,019
i	180	0,544±0,137	0,178±0,044	0,079±0,022
d	180	0,573±0,143	0,115±0,028	0,065±0,018
p	730	0,576±0,142	0,076±0,019	0,025±0,007
i	730	0,390±0,099	0,106±0,026	0,059±0,017
d	730	0,366±0,092	0,126±0,030	0,038±0,016

Tabela 04 - Dosagem (Média aritmética e desvio padrão) de proteínas, ácido urônico e GAGs sulfatados dos extratos totais (mg/ml) para as regiões *p* e *d* do TC e *p*, *i* e *d* do TFDP nas três idades analisadas (30, 180 e 730 dias). ***Avaliação estatística feita pelo Teste de Duncan a nível de 5% de significância.

maiores em todas as idades. Nos indivíduos mais velhos as concentrações dos extratos de ambas regiões sofreram declínio.

No TFDP (**Tab. 04-B**), também foram detectadas diferenças significativas entre as variáveis estudadas. A região *p* apresentou queda no conteúdo de AU nos extratos entre os indivíduos mais velhos. Na região *i*, o conteúdo aumentou entre 30 e 180 dias e diminuiu entre 180 e 730 dias. Na região *d*, o conteúdo detectado diminuiu entre 30 e 180 dias e aumentou aos 730 dias, mas apresentaram valores inferiores aos observados nos animais com 30 dias. Nos tendões de 30 dias, não há diferença entre as três regiões. Em 180 dias, a região *i* apresentou maior conteúdo que *p* e *d*. Com 730 dias, a região *d* apresentou os maiores valores seguida da *i* e finalmente a *p*.

7) Conteúdo de GAGs Sulfatados nos Extratos

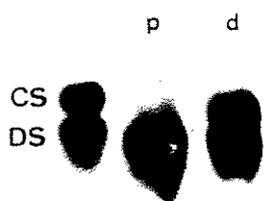
O TC apresentou diferenças significativas na quantificação de GAGs sulfatados solubilizados entre as regiões e idades estudadas (**Tab. 04-A**). A região *p* apresentou valores semelhantes entre 30 e 180 dias e inferiores aos 730 dias. Já na região *d* houve um decréscimo nas concentrações nos animais mais velhos. As amostras de tendões de 30, 180 e 730 dias apresentaram concentrações decrescentes de GAG sulfatados sendo a região *d* a que sempre apresentou os maiores valores.

Para o TFDP (**Tab. 04-B**), as regiões *p*, *d* e *i* apresentaram um aumento no conteúdo de GAG sulfatados entre 30 e 180 dias seguido de um declínio entre 180 e 730 dias. Nos tendões de 30, 180 e 730 dias foram detectados conteúdos de GAGs sulfatados significativamente variáveis. A região *i* apresentou maiores concentrações em todas as idades, seguidas da região *d* e por último a *p*. Entre as três idades analisadas, as maiores concentrações de GAGs, nos extratos, foram obtidas de animais com 180 dias.

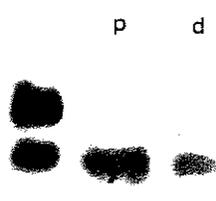
8) Conteúdo de Proteínas no Extrato

O conteúdo protéico nos extratos do TC (**Tab. 04-A**) apresentou diferenças significativas entre as variáveis analisadas. Na região *p*, não houve diferença entre 30 e 180 dias, mas aos 730 dias de idade houve redução no conteúdo protéico. Para a região *d*, as concentrações apresentaram valores decrescentes nos animais mais velhos em relação aos mais jovens. Nos tendões das diferentes idades, as regiões *p* sempre apresentaram os

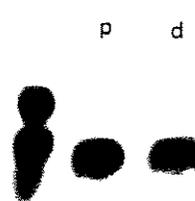
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose com tampão propileno-diamino. Géis das regiões *p* e *d* do TC de amostras obtidas de animais com 30 (**A**), 180 (**B**) e 730d (**C**). Em (**D**), (**E**) e (**F**) géis das regiões *p*, *i* e *d* do TFDP de amostras obtidas de animais com 30, 180 e 730d, respectivamente. Padrão: CS- condroitim sulfato, DS- dermatam sulfato



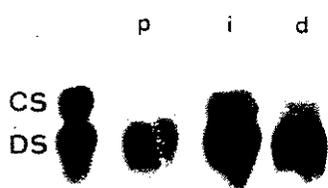
A



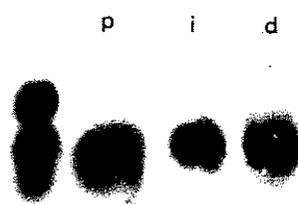
B



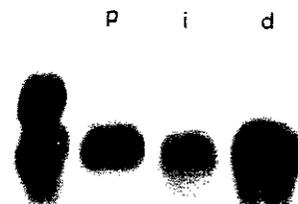
C



D



E



F

maiores valores. Relativamente, nos extratos de tendões de animais com 30 dias idade foram observadas as maiores concentrações de proteína.

O TFDP (**Tab. 04-B**) também apresentou variações significativas entre as regiões nas idades estudadas. Nas três regiões foram observados decréscimos no conteúdo protéico dos extratos nos indivíduos mais velhos. Nas três idades estudadas, a região *p* dos tendões apresentou o maior conteúdo de proteínas, enquanto que nas outras, foram observados valores semelhantes. Relativamente, as maiores concentrações de proteínas foram detectadas em amostras obtidas de animais com 180 dias de idade.

9) Análise Qualitativa dos Glicosaminoglicanos

No TC (**Fig. 11 - A, B e C**) e TFDP (**Fig. 11 - D, E e F**) o GAG predominante em todas as regiões analisadas foi o DS. Porém, em TCd, TFDP_{*i*}, nos animais de 30 dias, também foi detectado CS.

10) Análise Cromatográfica e Eletroforética dos Extratos do TC e TFDP: Diferentes Regiões em Diferentes Idades.

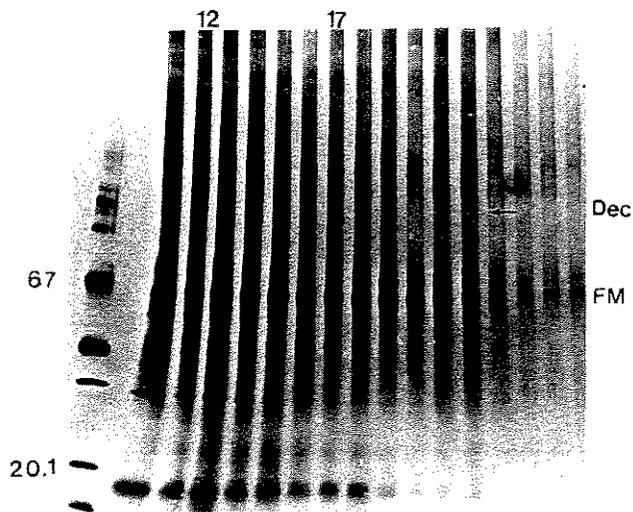
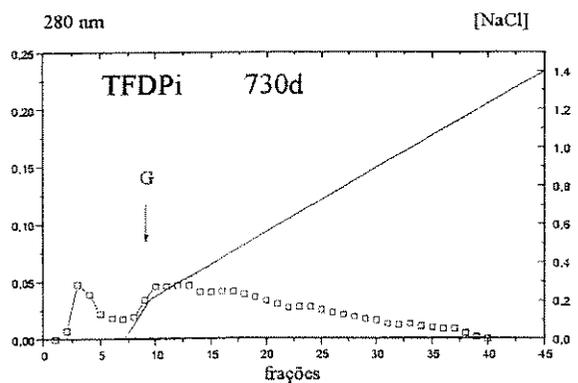
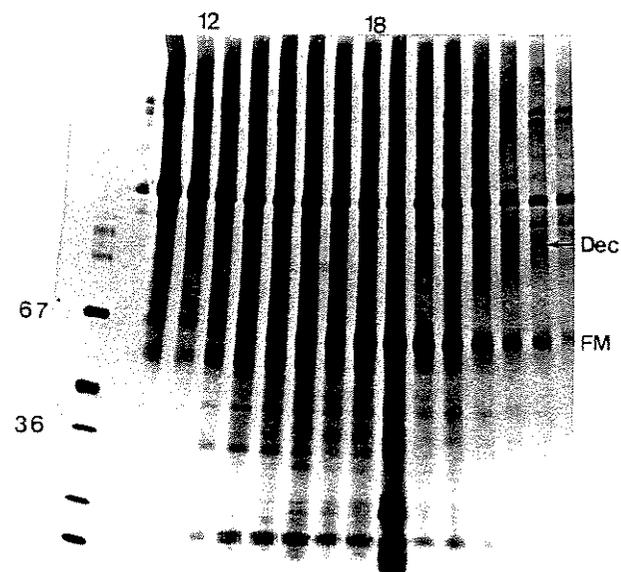
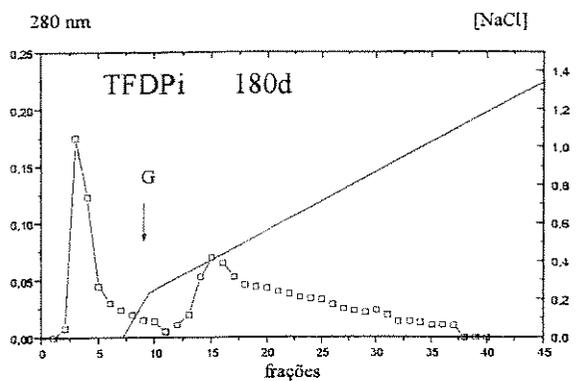
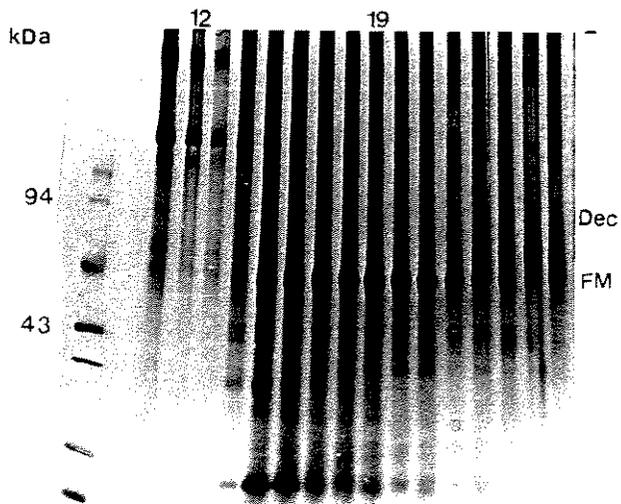
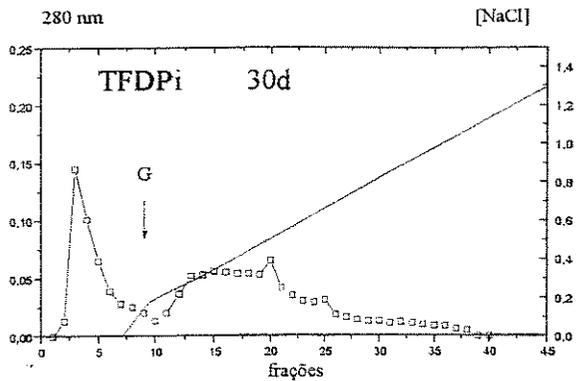
Os cromatogramas dos extratos do TC e TFDP estão representados da **Figuras 12 a 16**.

Em todas as regiões e idades analisadas foi observado a presença de material catiônico. Um pico foi detectado com absorvância variando entre 0,1 a 0,2 em 280 nm. Em TC *p* (**Fig. 12**) as idades de 30 e 180 dias apresentaram o maior valor de absorvância. Para as regiões TC_{*p*} (730 dias) e TCd (**Fig. 13**) com 30, 180 e 730 dias foram detectadas absorvâncias em torno de 0,1. Para o TFDP *p* (**Fig. 14**), *i* (**Fig. 15**) e *d* (**Fig. 16**) com 30 e 180 dias a absorvância variou de 0,16 a 0,2, enquanto que na idade de 730 dias a absorvância não passou de 0,1. Após a aplicação do gradiente de NaCl todos os tendões nas diferentes regiões e idades apresentaram pelo menos um pico principal. O material foi eluído com uma concentração de NaCl variando entre 0,4 - 0,6 M. Entre 0,6 - 0,7 M, em algumas regiões, foram detectados outros picos, porém com absorvâncias de até 0,08.

Todas as frações foram analisadas em SDS-PAGE na presença e ausência de agente redutor (2-Me). Para cada região está sendo apresentada a eletroforese com amostras

Figura 12 - Cromatogramas (A) dos extratos da região *p* do TC nas diferentes idades em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-□-□-) e condutividade (—). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,2 M.

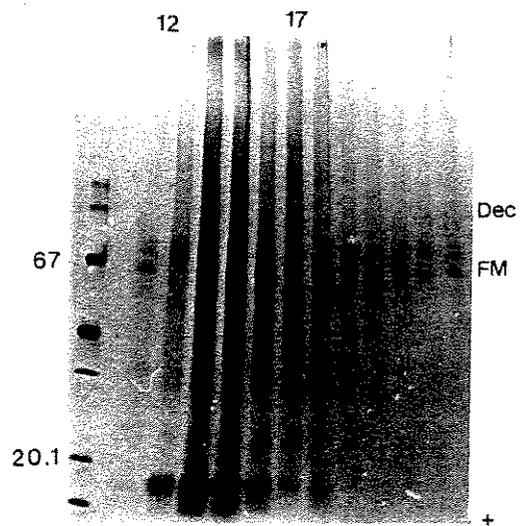
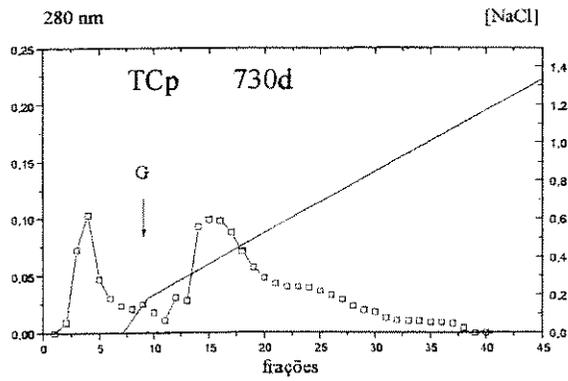
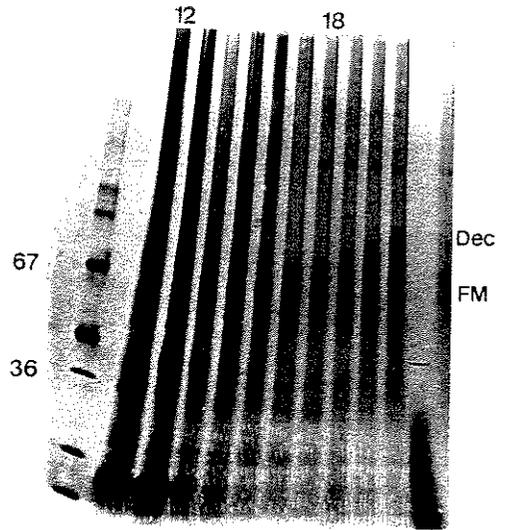
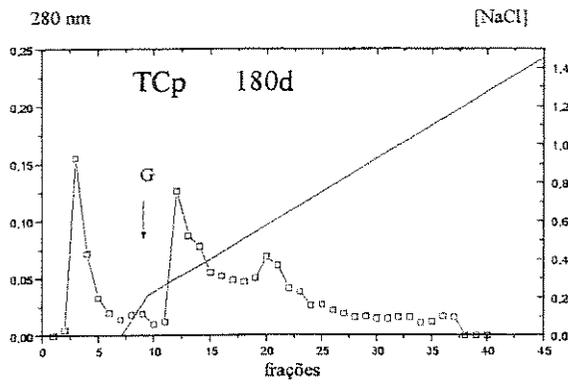
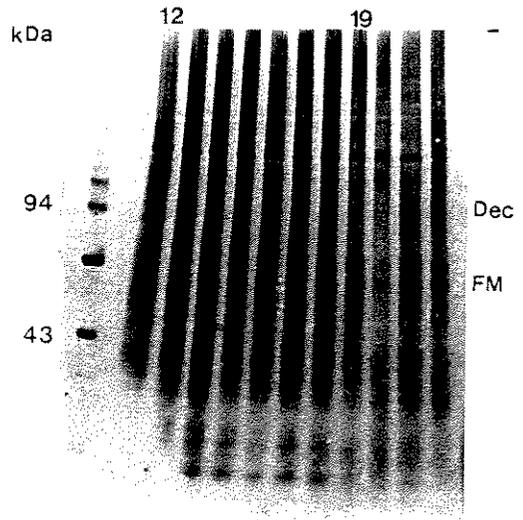
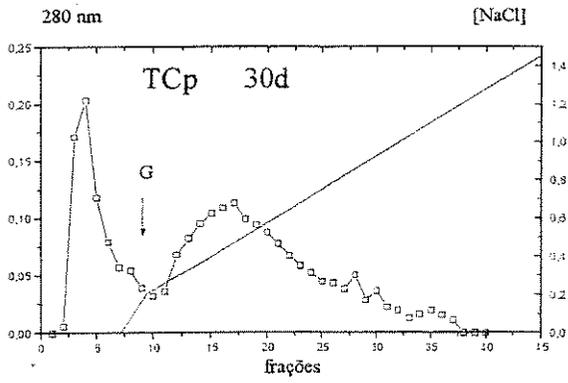
SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata. Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).



A

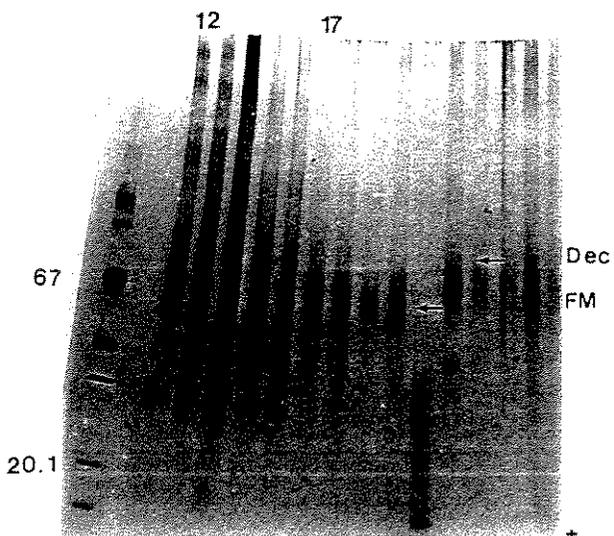
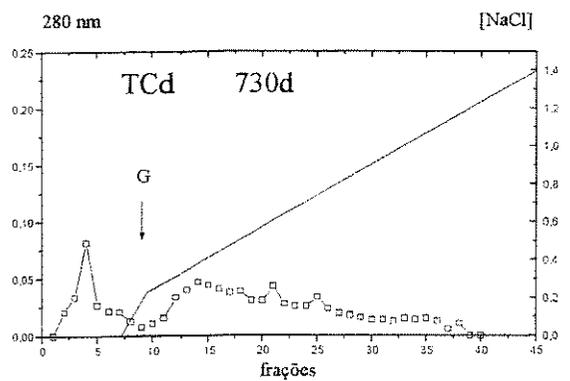
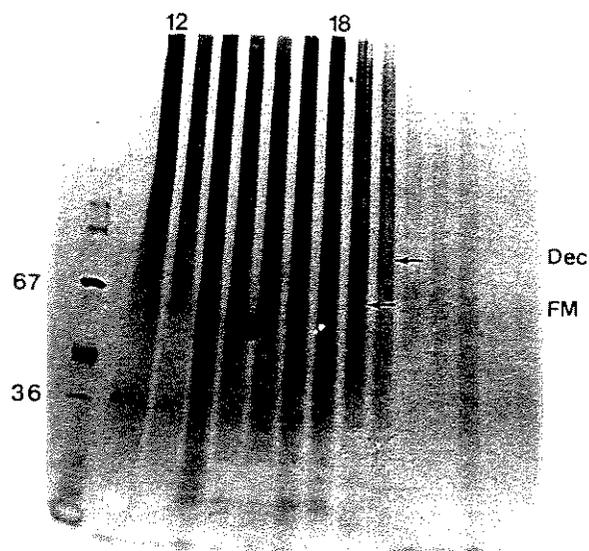
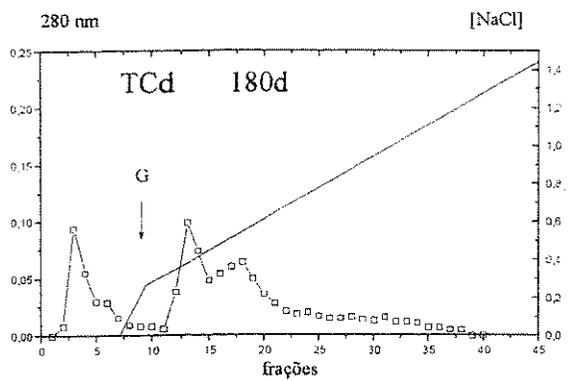
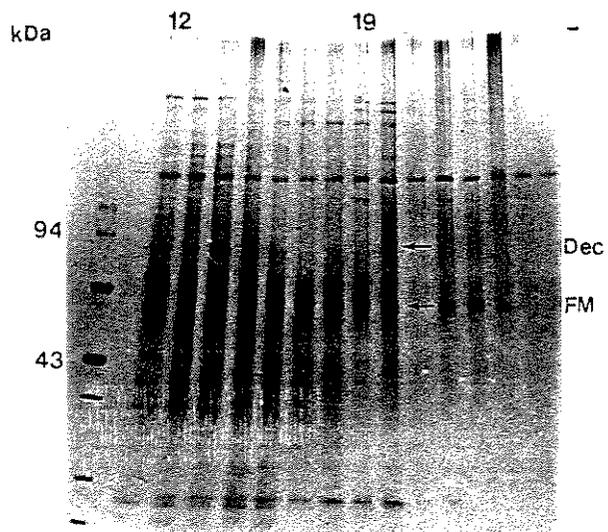
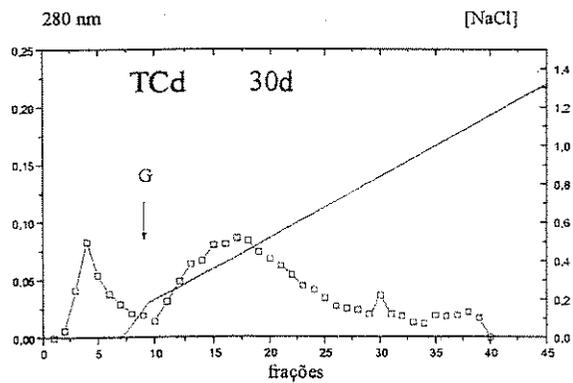
B

Figura 13 - Cromatogramas (A) dos extratos da região *d* do TC nas diferentes idades em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-□-□-) e condutividade (—). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,2 M. SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata. Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).



A

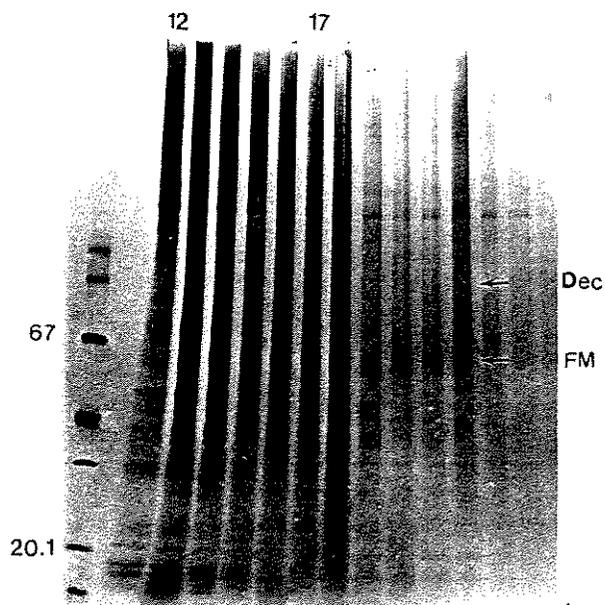
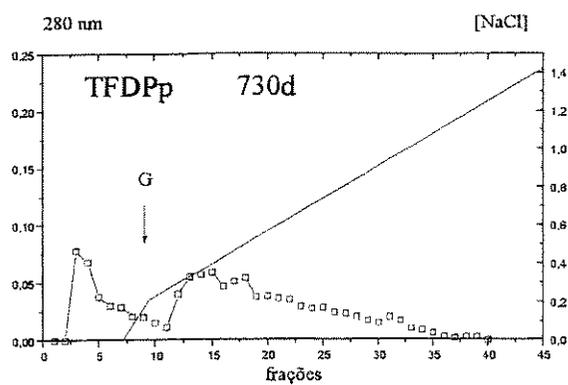
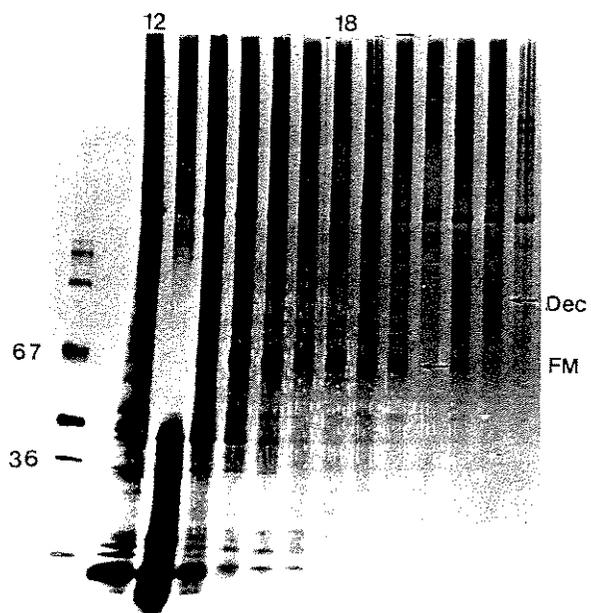
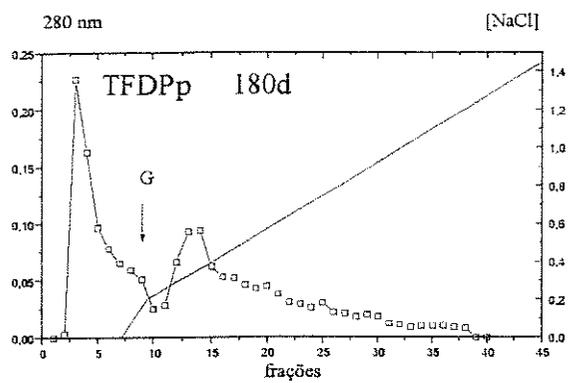
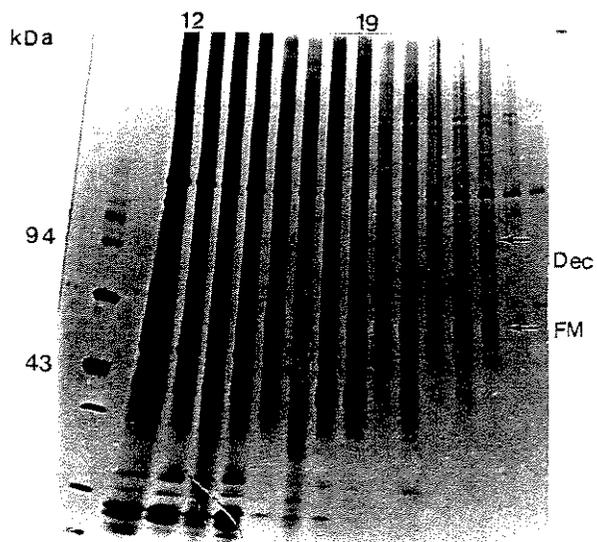
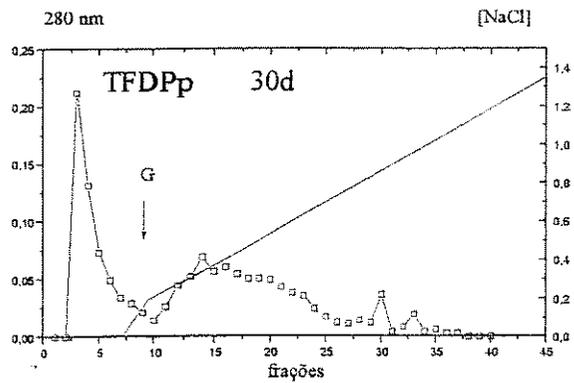
B



A

B

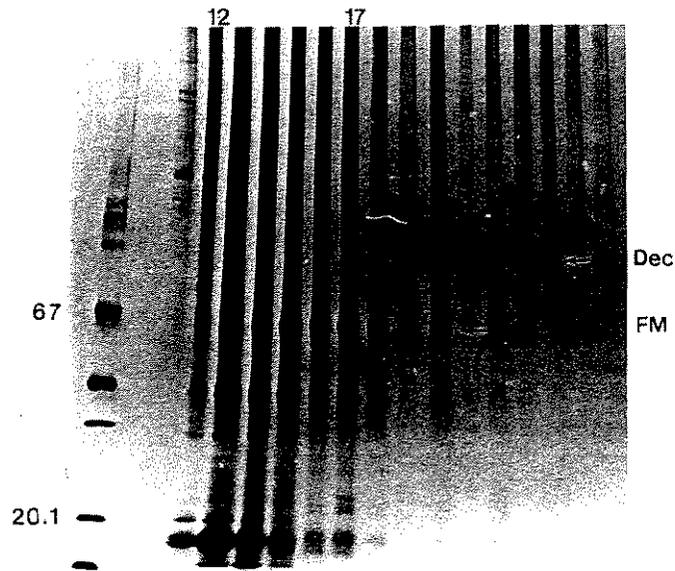
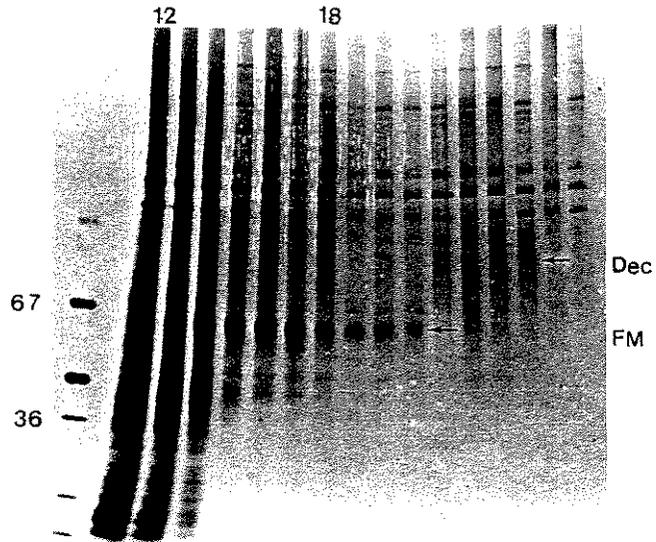
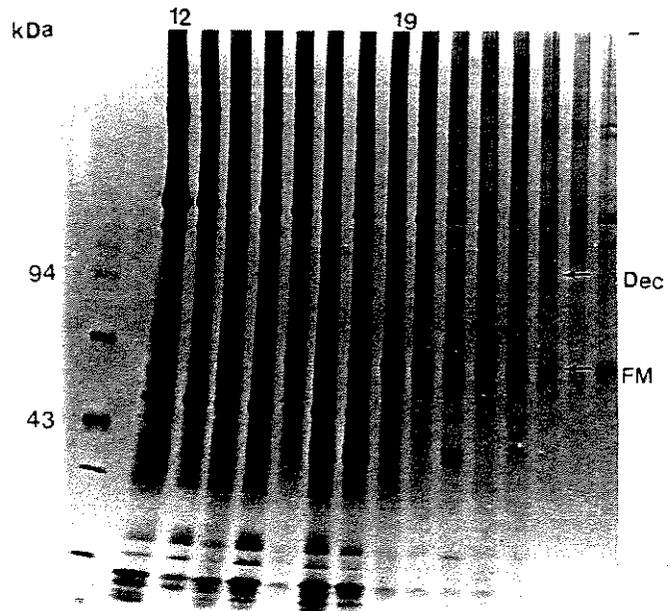
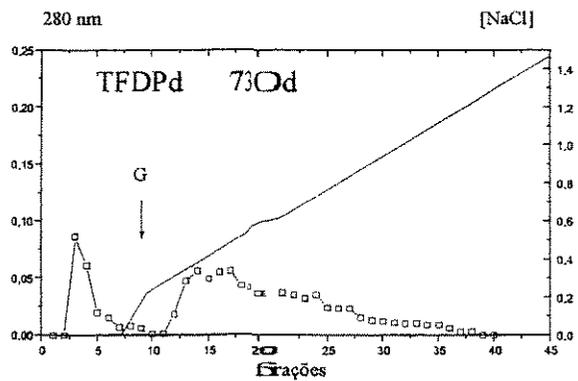
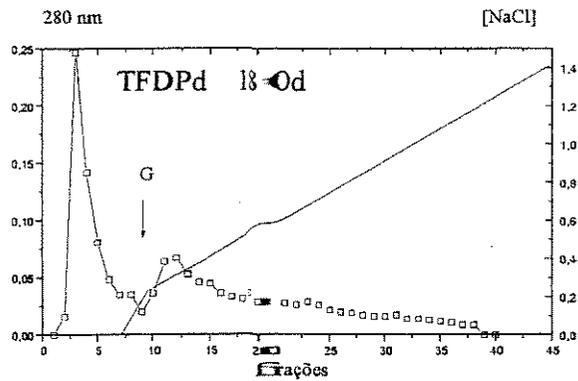
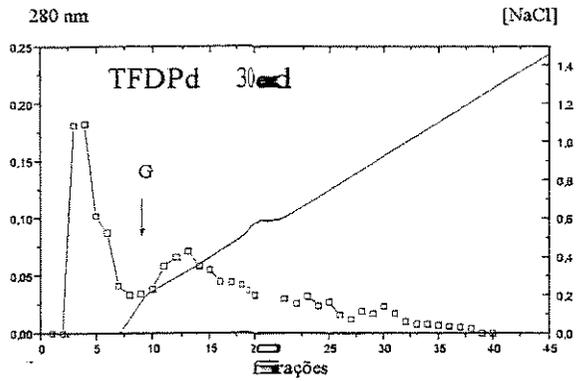
Figura 14 - Cromatogramas (A) dos extratos da região *p* do **TFDP** nas diferentes idades em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-□-□-) e condutividade (—). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,2 M. SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata. Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).



A

B

Figura 15 - Cromatogramas (A) dos extratos da região *i* do TFDP nas diferentes idades em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-□-□-) e condutividade (—). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,2 M. SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata. Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

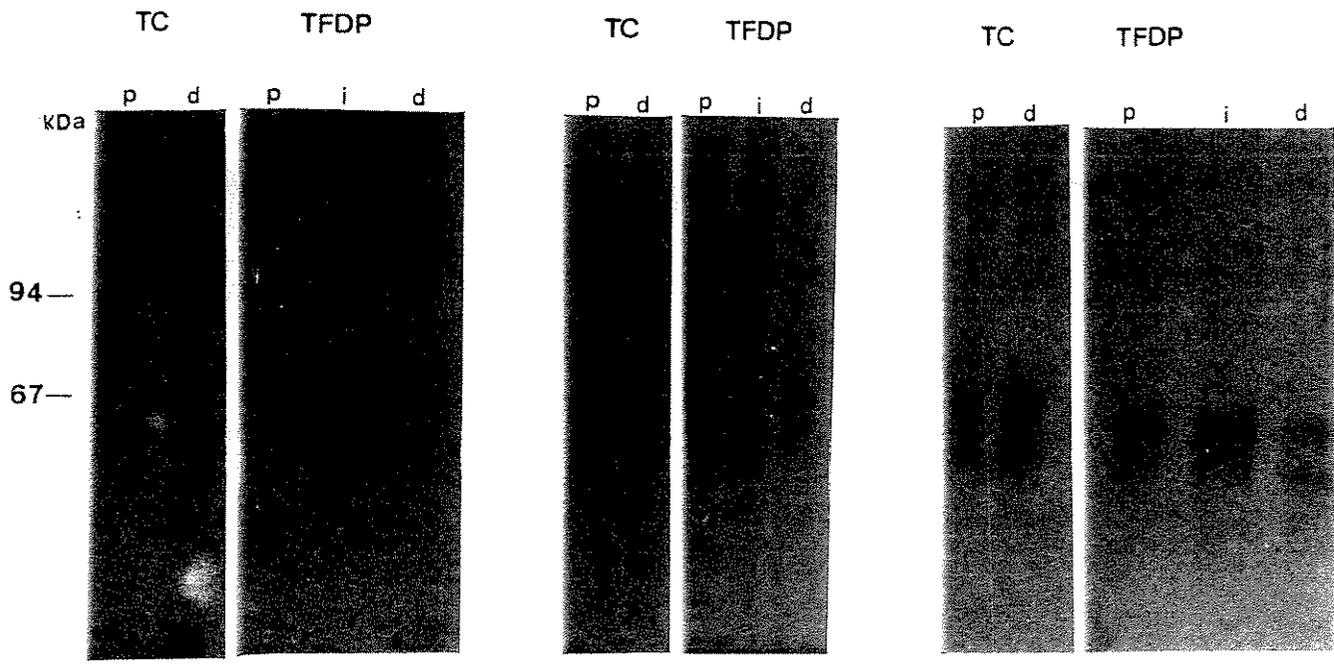


A

B

+

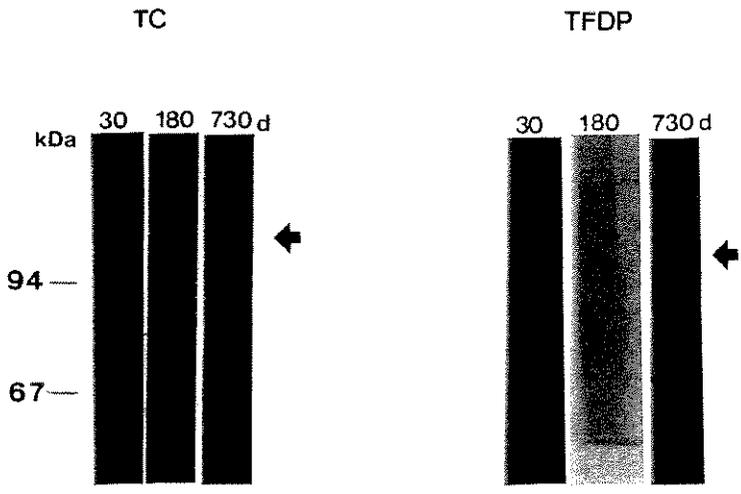
Figura 16 - Cromatogramas (A) dos extratos da região *d* do TFDP nas diferentes idades em DEAE- Sephacel. Absorbâncias em 280 nm (-□-□-) e condutividade (—). A seta indica o gradiente (G) com NaCl 0 - 1,2 M. SDS-PAGE (gradiente 4 - 16%) das frações com 2-Me (B). Condições: corrente de 25 mA durante 3 h. Coloração: Impregnação pela prata. Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), subunidade da catalase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).



A

B

C



D

tratadas com agente redutor (**Fig. 12 a 16**), uma vez que não foram observadas diferenças no padrão eletroforético entre os dois tratamentos.

Os pequenos PGs, FM e Dec, estão presentes em todas as regiões analisadas e nas diferentes idades. Essas moléculas foram eluídas com força iônica de 0,45 a 0,55 M e 0,6 a 0,7 M respectivamente.

No TC (**Fig. 12 e 13**), o FM e o Dec estão presentes nas duas regiões e em todas as idades analisadas. Porém na região *d* (**Fig. 13**) o Dec está mais evidente nas amostras de animais com 180 dias de idade.

No TFDP (**Fig. 14, 15 e 16**), o FM e o Dec foram detectados em todas as idades e regiões. No entanto, o Dec parece mais evidente na região *i* dos animais com 30 e 180 dias.

11) Transferência eletroforética - “Immunoblotting”

As frações obtidas, das cromatografias ricas em FM, das diferentes regiões e idades, foram transferidas para fita de nitrocelulose. A reação para FM foi positiva em todas as diferentes regiões e idades (**Fig. 17**). Porém, nos animais de 30 dias (**Fig. 17-A**) a reação foi mais intensa junto a posição de migração das cadeias de col do que na posição ao redor de 60 kDa, onde geralmente migra em gel de poliacrilamida. Essa reação diminui quando analisamos os animais com 180 (**Fig. 17-B**) e 730 dias (**Fig. 17-C**). Ao mesmo tempo parece haver um aumento na intensidade da reação na posição de 60 kDa.

Para o teste com anti-Dec (**Fig. 17-D**), a reação se mostrou positiva para todas as amostras dos tendões nas diferentes idades.

12) Teste de Viscoelasticidade.

A partir das curvas de tração por deformação dos tendões ficou demonstrado um comportamento não linear (viscoelástico) que é característico para este tipo de material. A rigidez do tendão é pequena quando este suporta pequenas tensões e aumenta gradualmente com o aumento da deformação. A partir das curvas foram apurados e analisados estatisticamente os valores da tensão de ruptura que caracteriza a resistência à tração. Para TC (**Tab. 05-A**) foram observados valores significativamente diferentes. A tensão de ruptura aumentou progressivamente entre as idades analisadas. Já os valores para o TFDP (**Tab. 05-B**) demonstraram um crescimento significativo entre 30 e 180 dias e diminuição

Figura 17 - Teste imunoquímico para fibromodulim: **A (30 dias)**, **B (180 dias)** e **C (730 dias)** e para decorim (**D**) das frações das regiões do TC e TFDP nas diferentes idades. Em (**D**) foram utilizadas apenas frações *d* do TC e *i* do TFDP para cada idade estudada. Padrão de peso molecular: fosforilase β (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa).

aos 730 dias para valores semelhantes aos apurados nos animais com 30 dias. Os valores apurados para TFDP foram significativamente superiores aos observados em TC.

Os valores da tangente de alfa estão relacionados com a rigidez elástica do tendão. A análise do TC (**Tab. 05-A**) demonstrou diferença significativa, com valores crescentes, para a rigidez elástica dos tendões entre os obtidos de animais velhos em relação aos jovens. Em TFDP (**Tab. 05-B**) o módulo elástico apresentou valores semelhantes entre os tendões de animais de 30 e 180 dias e valores significativamente menores para animais com 730 dias.

(A)

TC	Tensão de Ruptura (N/mm²)	Módulo Elástico (E)
30 dias	0,655±0,078	1,102±0,154
180 dias	2,511±0,294	2,270±0,046
730 dias	4,397±0,515	4,115±0,571

(B)

TFDP	Tensão de Ruptura (N/mm²)	Módulo Elástico (E)
30 dias	12,347±1,758	75,011±10,957
180 dias	18,287±2,605	80,427±11,749
730 dias	12,229±1,742	48,284±7,053

Tabela 05 - Valores apurados (Média aritmética e desvio padrão) para tensão de ruptura (N/mm²) e módulo elástico (E) após aplicação do teste de viscoelasticidade no TC e TFDP nas diferentes idades analisadas (30, 180 e 730 dias)

***Avaliação estatística feita pelo Teste de Duncan a nível de 5% de significância.

Discussão

A função fisiológica dos tendões no sistema músculo-esquelético é transmitir com precisão as forças geradas pelo músculo para os ossos, proporcionando na maioria dos casos, a movimentação das juntas. A capacidade de resistir à tensão, torção, fricção e em caso especiais a compressão, tem uma relação direta com a organização estrutural da MEC (Viidik, 1980).

No entanto, a adaptação funcional do tecido não está associada somente a presença de sítios onde são submetidos a diferentes forças mecânicas. A análise comparativa envolvendo a estrutura dos tendões deve considerar uma série de aspectos. Em primeiro plano a variação morfológica na distribuição e organização das estruturas. O TC tem origem no músculo tríceps sural e inserção no calcâneo. Apresenta uma estrutura laminar e particularmente a maior parte de seu trajeto é retilíneo, sofrendo apenas uma curvatura no ponto de inserção no osso. Neste ponto o tendão entra em contato com o calcâneo e dele recebe ação compressiva. O TFDP, por sua vez, apresenta uma estrutura cilíndrica e seu trajeto desde a origem no músculo flexor digital profundo até sua inserção na face plantar dos dedos sofre mudanças drásticas no percurso. Durante a ação muscular do flexor digital profundo uma porção do tendão contorna a articulação do tornozelo usando como apoio o osso calcâneo. Durante o movimento, essa região funciona como uma polia e o TFDP passa a receber forças compressivas. Nestes dois modelos, o tecido fibroso apresenta adaptações morfológicas e funcionais que permitem a execução de suas atividades de maneira adequada.

Além das considerações sobre as particularidades anatômicas, a comparação quanto a organização pós-natal da MEC nestes tendões, também deve envolver a atividade física a que esses animais estiveram sujeitos.

Os indivíduos estudados neste trabalho não foram submetidos a qualquer tipo de exercício físico adicional, sendo portanto, considerados sedentários.

Os parâmetros estruturais e bioquímicas dos tendões foram analisados obedecendo as forças mecânicas a que estas estruturas são submetidas. O TFDP apresenta uma região (*i*) que contorna a articulação do tornozelo e está em íntimo contato com a superfície óssea. Obedecendo as características morfológicas, este tendão apresenta duas regiões de tensão (*p*

e *d*) e uma que sofre ação de forças de compressão adicionais a de tensão (*i*). O TC, por sua vez, suporta forças de tensão em sua região *p* e tensão e compressão na região *d*

As medidas biométricas utilizadas para avaliar as estruturas demonstraram que o período de desenvolvimento dos tendões está entre 30 a 180 dias. Neste período os tendões apresentam um crescimento com ganho expressivo de peso. No entanto, entre os indivíduos com 730d as medidas foram semelhantes àquelas observadas nos indivíduos com 180 dias de idade foi observada uma relativa estabilidade nos parâmetros avaliados.

Estas observações coincidem com relatos anteriores que indicaram uma diminuição metabólica acentuada na síntese de macromoléculas em tendões com o envelhecimento (Vogel, 1978; Floridi et al., 1981 e O'Brien, 1997).

Seguindo os parâmetros relatados anteriormente, as regiões dos tendões foram analisadas estruturalmente quanto a organização histológica, arranjo das fibras colágenas e distribuição dos PGs.

Os tendões apresentam duas áreas distintas de acordo com o estresse mecânico a que são submetidas. Somente as regiões sob estresse compressivo apresentaram diferenças estruturais com o envelhecimento, desenvolvendo uma metaplasia fibrocartilaginosa.

A organização espacial dessas regiões mostrou grandes diferenças entre os tendões durante o envelhecimento. No TC, a fibrocartilagem sesamóide, isto é, desenvolvida no interior do tecido fibroso, apresentou células arredondadas com intensa basofilia na matriz pericelular associado ao uma matriz fibrosa rica em fibras de pequeno diâmetro, arranjadas em feixes dispostos em forma de cesta. A área ocupada pela fibrocartilagem aumenta com a idade do animal. Outro fenômeno detectado, no TC em animais idosos (730d), foi a diminuição na marcação para PGs na matriz pericelular e entre as fibras colágenas.

O TFDP, por sua vez, apresentou grupos de células arredondadas com matriz pericelular rica em PGs. As células (fibrocondrócitos) estão distribuídas em fileiras no sentido do eixo maior do tendão acompanhando o direcionamento das espessas fibras de colágeno. Na região de compressão do TFDP a basofilia entre as fibras colágenas aumenta com a idade.

A presença dessas fibrocartilagens sesamóides parece relacionada em primeiro plano a ação moduladora de forças compressivas. A literatura apresenta diversos trabalhos que investigam tendões que, em algum ponto do seu trajeto, 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 compressor. A região é semelhante a uma fibrocartilagem, apresentando fibras de colágeno com espessura intermediária entre tendão e cartilagem, além da deposição de PG. As células apresentam morfologia semelhante a dos condrócitos (Vogel & Koob, 1989 e Carvalho, 1995).

As fibrocartilagens sesamóides já foram descritas em tendões, nas regiões onde suportam compressão, em diferentes animais (Gillard et al., 1979; Merrilees & Flint, 1980; Okuda et al., 1987a,b; Rufai et al., 1992; Mills & Daniel, 1993 e Carvalho & Vidal, 1994). No entanto, estas estruturas parecem apresentar uma ampla diversidade fenotípica que proíbe rigores na padronização de aspectos estruturais e bioquímicos.

A combinação de forças de compressão, torção, atrito e tensão, sobre tendões, induzem respostas diferenciadas das células. Além disso, a combinação dessas forças em diferentes intensidades são capazes de promover alterações no citoesqueleto das células e provavelmente ativar genes que irão desencadear a resposta adaptativa dos fibroblastos (Slack et al., 1984 e Giori et al., 1993).

A localização anatômica dos tendões sob compressão teria influência na nutrição dos mesmos e dessa maneira na sua resposta biológica. 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 & Lesker, 1983 e Hannafin & Arnoczky, 1994). Além disso, influenciaria as condições aeróbicas do tecido (Basset & Herrmann, 1961).

Além dessas variáveis, o estudo comparativo destas estruturas entre diferentes espécies durante o envelhecimento é dificultado pelas diferenças no tempo decorrido para maturação sexual, esquelética e motora dos animais além das enormes diferenças de expectativa de vida entre eles (Mills & Daniel, 1993). A atividade do animal e seus hábitos de locomoção são outros parâmetros adicionais que influenciam na complexidade adaptativa desses tecidos ao estresse mecânico (Woo et al., 1980 e Loitz et al., 1989). Somando-se a todas essas variáveis, a presença de fibrocartilagem sesamóide em tendões é considerada por alguns autores como um sítio provável de alterações degenerativas com o envelhecimento (Rooney, 1994). Deste modo, quando se analisa tendões de indivíduos

idosos deve-se considerar como provável fonte de variabilidade nos resultados os aspectos degenerativos da senescência nestas regiões.

As variações na complexa organização desses tendões se estendem a ultraestrutura dos tenócitos, fibrocondrócitos e matriz associada. As regiões submetidas à tensão apresentam uma relativa uniformidade organizacional mas com variações temporais na atividade sintética entre o TC e o TFDP com o envelhecimento.

A ultraestrutura das células apresenta um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e um núcleo com cromatina pouco compacta. Estas características demonstram um período de intensa atividade sintética no TC aos 30d de idade. Já para o TFDP este período parece estender um pouco mais, pois a presença desses tipos celulares é detectado nos animais com 180d de idade. No entanto, nos indivíduos idosos (730d), o TFDP apresenta células com regressão acentuada no volume celular e compactação da cromatina, denotando redução na capacidade de síntese protéica. Já no TC não foram observadas alterações celulares tão intensas nos indivíduos com 730d. Nas regiões de tensão, a matriz fibrosa apresenta íntima relação com os tenócitos. Os PGs presentes nestas regiões estão associados às fibrilas de col.

Já as regiões de compressão apresentaram as maiores alterações ultraestruturais com o envelhecimento. As células diferenciadas, os fibrocondrócitos, do TC apresentam morfologia arredondada com cromatina frouxa e um citoplasma rico em filamentos do citoesqueleto e com pouco retículo endoplasmático rugoso. No TFDP, a região de compressão apresentou células com características semelhantes ao TC. As características morfológicas dessas células não sofreram grandes alterações com o envelhecimento, no entanto, o que mais chama a atenção é a presença de numerosos filamentos do citoesqueleto. Esta característica demonstra a adaptação funcional dessas células a compressão (Giori et al., 1993).

A matriz pericelular dos fibrocondrócitos da região de compressão do TC, rica em PGs nos indivíduos jovens, é substituída por uma estrutura rica em fibrilas de colágeno de pequena espessura. Já no TFDP, essa matriz pericelular apresenta um crescimento constante em espessura durante o envelhecimento. Esse aumento deve-se provavelmente à deposição de PGs.

A interação célula/matriz observada indica que a morfologia e o metabolismo celular tem íntima relação com a distribuição das forças mecânicas. A correspondência entre os dados da microscopia de luz e a ultraestrutura vem confirmar as diferenças da organização entre as regiões de tensão e compressão entre os dois tendões. A diferença temporal na atividade metabólica entre tendões, observada neste trabalho, encontra dados semelhantes em outros modelos experimentais (Scott & Hughes, 1986 e Curwin et al., 1994).

O microambiente produzido pelos tenócitos (região de tensão) e fibrocondrócitos (região de compressão) é específico para reconhecer e resistir ao estresse mecânico a que são submetidos. Muitos mecanismos foram propostos para explicar a transdução desse sinal entre a matriz e a célula: o fluxo de íons (Armstrong et al., 1988), efeitos piezoelétricos e potenciais de ação de membrana (Frank & Grodzinsky, 1987a, b), deformação mecânica do citoesqueleto (Poole & Flint, 1984; Poole et al., 1985 e Giori et al., 1993) além de, alterações físico-químicas da matriz pericelular (Gray et al., 1988). Todos esses veículos de informação célula-matriz induzem uma resposta de síntese das macromoléculas apropriadas a manutenção da integridade tecidual.

Durante o desenvolvimento da região fibrocartilaginosa em tendões foi observado um aumento na expressão gênica, síntese e deposição tecidual de PGs e colágeno do tipo II (Vogel & Heinegård, 1985; Evanko & Vogel, 1990 e Robbins et al., 1997). Provavelmente o microambiente desenvolvido nas regiões fibrocartilaginosas do TC e TFDP devem apresentar a mesma natureza. Além disso, foi detectado recentemente, que grande parte das fibrilas observadas na matriz pericelular dos fibrocondrócitos em tendão são de colágeno VI (Felisbino & Carvalho, 1999). Estas moléculas parecem manter uma associação com os PGs nestas regiões e podem estar relacionadas a definição do ambiente pericelular de células sob compressão (Poole et al., 1992 e Felisbino & Carvalho, 1999). No entanto, a plasticidade adaptativa desses tendões obedece um gradiente de exigência funcional (Bennett et al., 1986 e Viidik, 1996). Além disso, a capacidade de resposta funcional dos tendões também sofre alterações com o envelhecimento do animal (Svendsen & Thomson, 1984 e Baer et al., 1988).

A deposição de moléculas associadas funcionalmente à cartilagem hialina em regiões fibrocartilaginosas de tendão, sob estresse compressivo, é o exemplo mais estudado

de adaptação funcional dos tecidos fibrosos (Vogel & Koob, 1989; Carvalho, 1995 e O'Brien, 1997). No entanto, Carvalho (1995) sugere que a capacidade de resistir à forças de compressão nessas fibrocartilagens não estaria ligada somente a existência de grandes PGs, em analogia direta à cartilagem hialina. O autor propõe uma interrelação especial entre o arranjo das fibras colágenas e a presença dos grandes PGs. Por outro lado, existem tendões que apresentam variações na composição ao longo de sua estrutura, sem apresentar alterações morfológicas evidentes (Curwin et al., 1994).

Os relatos acima confirmam a diversidade estrutural e bioquímica apresentada pelos tendões nos diversos modelos biológicos estudados.

De modo geral, nos modelos estudados neste trabalho, o conteúdo de água é semelhante entre as regiões dos tendões durante o envelhecimento, o que contrasta com o conteúdo cada vez menor de GAGs detectado no mesmo período.

As regiões sob compressão em TFDP e TC apresentaram diferenças no conteúdo de GAG durante o envelhecimento. A presença de GAG nestas regiões superou a da região de tensão aos 180d, no TC, e aos 730d, no TFDP. Já a região *p* de ambos os tendões, com 30 dias, são relativamente ricas em GAGs. No entanto, a solubilização dos GAG pela ação de agentes caotrópicos (Gu-HCl) sempre foi maior nas regiões sob compressão nos dois tendões e em todas as idades analisadas, mas da mesma maneira, o conteúdo solubilizado diminuiu com a idade.

Evidências na literatura mostram que forças de tensão oriunda das primeira contrações musculares estimulariam a deposição de GAGs em tendões embrionários (Slack et al., 1984). O maior conteúdo de GAG nos indivíduos de 30d pode estar relacionado ao período de morfogênese desses tendões e não a estímulos compressivos que estes estariam sofrendo nesse curto período de vida pós-natal. Em relação ao conteúdo de GAG durante o envelhecimento, vários trabalhos relatam a diminuição na deposição dessas moléculas em tendões (Amiel & Kleiner, 1988; Baer et al., 1988 e Tuite et al., 1997). Além disso, a localização anatômica e o papel funcional de cada tendão deve somar fatores de variabilidade na síntese e deposição de GAGs no tecido fibroso.

O tratamento com Gu-HCl 4M na extração dos componentes da MEC é consagrado. No entanto, o rendimento na solubilização dessas moléculas não é o mesmo frente aos diferentes tipos de organização macromolecular de MEC (Arcanjo et al., 1994 e Michelacci

& Horton, 1989). A presença de diferentes arranjos supramoleculares da matriz fibrosa nas diferentes regiões e idades do TC e TFDP podem explicar as diferenças quantitativas na solubilização de AU, GAG sulfatados e proteínas não-colagênicas encontrados nos nossos resultados.

O teste de intumescimento em água e ácido acético foi utilizado para avaliar a associação entre GAGs e colágeno na organização do tecido. Os resultados mostraram uma grande diversidade organizacional na MEC entre as regiões, pois um conteúdo maior de GAGs em alguma região não representou um maior intumescimento em água. No TC, não houve diferença quando a embebição em água. Já no TFDP os valores obtidos mostraram que as regiões sob compressão intumesceram mais em água somente nos indivíduos 730d. Exceção pode ser observado na região *p* dos animais de 30d. Já em ácido acético, a embebição parece acompanhar um certo padrão pois as regiões de tensão que apresentariam maior conteúdo de colágeno intumesceram mais que as regiões que sofrem compressão. A embebição das regiões em ácido acético diminuiu durante o envelhecimento.

De maneira geral o conteúdo de colágeno nos tecidos aumenta com o envelhecimento (Viidik, 1979). As fibrilas tornam-se densamente compactadas devido ao aumento na quantidade de ligações cruzadas intermoleculares, principalmente do tipo hidroxipiridium (Wu & Eyre, 1985 e Shadwick, 1990). No entanto, essas observações apresentam variações entre tecidos de um mesmo animal e entre espécies diferentes (Ippolito et al., 1980 e Vogel, 1980). A maior ou menor permeabilidade da trama do tecido à ação de solventes utilizados no intumescimento pode ser explicado pela presença de diferentes tipos de col na mesma fibrila bem como a organização e o tamanho das mesmas, além da frequência das ligações intermoleculares e interações interfibrilares e com PGs (Grodzinky, 1983).

Além disso, a síntese e deposição das moléculas de colágeno é mais intensa em animais jovens (Kao et al., 1961 e Floridi et al., 1981), assim como a degradação (Niedermüller et al., 1977) sugerindo diferentes densidades na compactação de fibras. Com o envelhecimento, contudo, as moléculas de colágeno estão sofrendo intensa compactação e as fibras tornando-se estruturas cristalinas (Sinex, 1968 e Baer, et al., 1988).

Assim, os aspectos morfológicos observados no TC e TFDP indicaram características que podem ser associadas à diminuição no metabolismo. Essa diminuição

deve estar associada, principalmente, ao metabolismo de moléculas de colágeno e esta parece ocorrer com uma diferença temporal entre os dois tendões. Isto indica que os fenômenos relacionados ao envelhecimento das moléculas de colágeno nestes tendões também devem ocorrer com uma diferença temporal. Estas diferenças sugerem mudanças na organização supramolecular do colágeno entre os tendões. Estas representariam uma adaptação tecidual ao aumento na demanda mecânica a que eles estariam sujeitos, principalmente com o aumento do próprio peso corpóreo a ser deslocado pelos músculos (Parry et al., 1978a) além, é claro, dos reflexos sistêmicos associados ao envelhecimento (Sell & Monnier, 1995).

Além do colágeno, a maturação dos tendões envolve mudanças coordenadas na síntese de diferentes tipos de GAGs. Estudos em tendões durante a maturação revelam altas concentrações de GAGs em animais jovens (Scott et al., 1981 e Curwin et al., 1994), e com o passar da idade diminuem sensivelmente (Nakamura & Nagai, 1980 e Scott & Hughes, 1986). Os primeiros GAGs detectados nos indivíduos jovens é o ácido hialurônico (Scott et al., 1981). Com o envelhecimento, a concentração de CS e depois DS aumentam (Parry et al., 1978b; Nakamura & Nagai, 1980 e Scott et al., 1981). Em indivíduos idosos, os tendões sujeitos somente a força de tensão apresentam somente DS, enquanto que em regiões que suportam também forças compressivas acumulam CS (Vogel & Koob, 1989 e Sell & Monnier, 1995). Neste trabalho foi detectado CS somente nas amostras de regiões sujeitas a compressão de animais com 30 dias. Nas demais regiões e idades somente foi detectado DS.

Apesar de vários autores descreverem regiões metaplásicas em tendões sujeitos a forças de compressão e essas regiões apresentarem grande quantidade de CS em indivíduos adultos (Vogel & Koob, 1989; Vogel et al., 1994; Vogel, 1996 e Robbins et al., 1997), nossos resultados em ratos mostram a presença de CS somente em amostras de animais com 30d. Entretanto, Covizi (1995) detectou CS em animais de 90 dias. A presença de CS em tendões de animais jovens (30d e 90d) pode estar relacionado à população de GAGs remanescentes ao período de morfogênese do tendão (Vidal & Mello, 1984 e Slack et al., 1984).

Por outro lado, as adaptações bioquímicas desenvolvidas nesses animais, nas condições sedentárias em que envelheceram, não estimulou a deposição de PGs ricos em

CS, semelhantes aos de cartilagem articular. No entanto, sugerimos, como Carvalho (1995), que a presença de uma organização especial envolvendo fibras colágenas e PGs, no caso DS-PGs, ofereceria a resistência adequada à compressão sofrida por estes tendões nas condições de vida desses animais.

De acordo com o observado nas diferentes regiões e idades, o Dec está mais evidente em regiões sob compressão principalmente nos animais de 180 dias. Esse fato reforça a possibilidade do envolvimento mais direto dessa molécula no arranjo das fibrilas de colágeno. A manutenção de fibrilas mais finas associadas a maior quantidade de Dec permitiria aos tendões resistir a deformidade imposta pelas forças compressivas.

O Dec também já foi detectado em regiões de compressão de tendão bovino (Evanko & Vogel, 1990 e Vogel & Trotter, 1987) e rã (Carvalho, 1993). No entanto, parece haver um processo gradual na deposição de PGs com peso molecular crescente em tendões. Esse processo deve estar relacionados a adequação do tecido em suportar forças compressivas associadas a tensão e torção de amplitudes variadas, dependendo da própria fisiologia e peso do animal. A manutenção desse estado, por sua vez, pode estar associado a presença de fatores de crescimento, como TGF- β (Vogel & Hernandez, 1992 e Robbins et al., 1997).

Dessa maneira, os tendões devem apresentar uma estrutura flexível e elástica, responsável pela resistência à compressão formada por fibras colágenas embebidas em um ambiente fluido altamente viscoso. Este ambiente seria formado, no TC e TFDP, pela presença de pequenos PGs, principalmente Dec e, talvez biglicam. Sendo assim, essa malha suportaria as forças compressivas e favoreceria a sua dispersão em diferentes direções, não comprometendo a região de tensão do tendão (Carvalho, 1993; 1995).

Além do Dec foi analisado a distribuição de outro pequeno PG, o FM. Aparentemente, não houve diferença na distribuição do FM. No entanto, o teste imunoquímico mostrou que as amostras dos indivíduos jovens apresentaram intensa reação positiva na região de migração das cadeias α de colágeno e pouca reação na região ao redor de 60 kDa. Durante o envelhecimento esse comportamento se inverte.

A literatura tem registrado a ação moduladora do FM, e também do Dec, nas fibrilas de colágeno, regulando sua fibrilogênese atuando na agregação lateral de moléculas e

consequentemente o diâmetro das fibrilas (Vogel et al., 1984; Vogel & Trotter, 1987; Hedbom & Heinegård, 1989 e Hocking et al., 1998).

As fibras colágenas nestes tendões sofreram compactação ao longo das idades analisadas. Por isso, é provável que o FM apresente uma interação mais efetiva com o colágeno nos animais jovens que nos idosos. Isso pode ser explicado pela necessidade de uma ordenação eficiente das fibrilas de colágeno em tecidos cuja deposição da matriz fibrosa é mais intensa, ou seja, durante a própria maturação do tendão. Somando-se a isso, sabe-se que apesar do tratamento com GuHCl 4M, nem todas as interações são rompidas e nem todas as moléculas apresentam o mesmo rendimento de extração (Arcanjo et al., 1994).

As diferentes associações estruturais entre os vários componentes da MEC nos tendões estudados neste trabalho tem reflexo nas suas propriedades biomecânicas.

O teste de deformação sob carga em TC com animais de 30, 180 e 730 dias mostrou variação crescente e significativa na tensão de ruptura e na rigidez elástica. Por outro lado o TFDP apresentou aumento progressivo entre 30 e 180d e diminuição aos 730d de idade. No entanto, foi detectada uma grande diferença na rigidez elástica e na tensão de ruptura, comparativamente, entre os dois tendões. Os valores para TFDP foram muito superiores ao TC.

As modificações mecânicas do tendão com o envelhecimento tem relação direta com alterações nas fibras colágenas. Os resultados dos testes mecânicos para o TC estão associados ao processo de maturação do col depositado na MEC do tecido. Esta idéia também encontra apoio nos dados referente ao diâmetro das fibrilas. Os valores médios na população de fibrilas para TC e TFDP aumentaram com a maturidade. No entanto, nas regiões submetidas a compressão os diâmetro observados foram inferiores aos da região de tensão. No amadurecimento, os feixes de colágeno apresentam um aumento na densidade de ligações cruzadas (Danielsen, 1981). Deste modo, o diâmetro médio das fibrilas é aumentada e consequentemente a tensão necessária para rompê-las (Parry et al., 1978a; Moore & de Beaux, 1987 e Strocchi et al., 1991).

Outro fator importante é a elevação na concentração de ligações cruzadas em uma mesma fibrila o que diminuiria a intensidade de deslizamentos entre as cadeias de

colágeno, tornando estas fibrilas mais rígidas e portanto, mais resistentes à deformação (Mosler et al., 1985).

No entanto, o diâmetro das fibrilas de colágeno dos animais de 730d apresentaram valores médios inferiores aos indivíduos com 180d. No TFDP, este parâmetro parece ter importância nas propriedades mecânicas do tendão como um todo. No TC, por sua vez, a diminuição nos valores médios no diâmetro das fibrilas não parece refletir sob as mesmas propriedades.

A diminuição no diâmetro das fibrilas de colágeno em tecidos fibrosos de animais idosos é um fenômeno conhecido (Parry et al., 1978a; Strocchi et al., 1991). Aparentemente, as relações conflitantes entre os dados podem ser atribuídas a diferenças na intensidade e duração da tensão que os tendões estiveram sujeitos nas condições de vida do animal. A exigência funcional para o TC e TFDP, durante o período de estudo, induziu uma modelagem diferencial do tecido fibroso nas duas estruturas. Nos tendões dos animais de 730d a presença de uma população de fibrilas com diâmetro médio menor estaria adaptada a resistir a tensões diferenciadas para cada uma das duas estruturas. No TFDP pode-se ainda sugerir algum tipo de alteração por diminuição na exigência funcional, uma vez que, os tendões dos animais com 730d são cerca de 50% menos rígidos que os de 180d.

Por outro lado, a diferença de estudo, observada entre os tendões, pode ser creditada às diferenças funcionais a que diferentes grupos musculares os impõem. Gillard e colaboradores (1977) relataram que os tendões flexores apresentam propriedades biomecânicas diferentes dos extensores. Elliott (1965) observou diferenças significativas na resistência a tração e módulo elástico de tendões oriundos de músculos fusiformes e peniformes.

Vale mencionar, que os fibroblastos apresentam resposta adaptativa a diferentes exigências funcionais como o exercício e a própria inatividade por denervação muscular, modificando assim os propriedades biomecânicas dos tendões (Vilarta & Vidal, 1989). Além da própria variabilidade na localização anatômica e funcional do tendão no mesmo indivíduo a diversidade estrutural entre os animais quanto ao peso, postura e, principalmente, locomoção são fatores de alteração dos parâmetros mecânicos e estruturais (diâmetro médio de fibrilas) no envelhecimento (Elliott, 1965; Parry & Craig, 1988; Baer et al., 1988 e Shadwich, 1990).

Esses relatos nos permite sugerir que o TC e o TFDP sofreram significativas alterações estruturais, mecânicas e bioquímicas com o envelhecimento. Estas alterações apresentaram diferenças temporais entre os dois tendões, principalmente quanto as regiões fibrocartilaginosas. O desenvolvimento dessas metaplasias parece depender de fatores geneticamente determinados. No entanto, a amplitude no desenvolvimento, a expressão e organização das macromoléculas da MEC nessas regiões parece depender da exigência funcional a que a estrutura é imposta no decorrer do envelhecimento do animal.

Conclusões

1. Considerando os métodos histológicos e histoquímicos empregados neste trabalho as regiões sujeitas a tensão no TC e TFDP não sofreram alterações nas suas características morfológicas durante o envelhecimento.
2. As regiões sujeitas a compressão, do TC (*d*) e do TFDP (*i*), desenvolveram uma metaplasia fibrocartilaginosa. A fibrocartilagem sesamóide nestes tendões apresentou um desenvolvimento progressivo com o envelhecimento.
3. As fibras de col na região fibrocartilaginosa do TC apresentaram espessura menor e um arranjo entrelaçado. No TFDP, as fibras mantiveram a organização semelhante a região de tensão.
4. Os GAG estão concentrados predominantemente na matriz pericelular dos fibrocondrócitos mas também foram detectados entre as fibras de colágeno. No TC, a presença dos GAGs entre as fibras diminuiu durante o envelhecimento mas no TFDP pareceu aumentar.
5. A análise ultraestrutural dos tendinócitos revelou que o citoplasma dessas células é rico em retículo endoplasmático rugoso. A comparação entre os tendões durante o envelhecimento indica diferenças temporais no metabolismo de síntese de macromoléculas. As células do TFDP pareceram sintetizar proteínas ativamente com 30 e 180d de idade e as do TC somente com 30d.
6. A ultraestrutura dos fibrocondrócitos, da região de compressão no TC e TFDP, demonstrou citoplasma rico em filamentos do citoesqueleto e sem predomínio de alguma organela em especial. Não foram observadas alterações nas características morfológicas dessas células durante o envelhecimento.

7. A ultraestrutura da região de compressão dos tendões revelou que a matriz pericelular dos fibrocondrócitos apresenta, além dos PGs, uma rede de fibrilas finas de colágeno. Durante o envelhecimento esta matriz sofreu alterações no TC sendo substituída nos indivíduos com 730d por uma malha predominantemente microfibrilar. No TFDP, ela apresentou um aumento progressivo com o envelhecimento do animal sem alterações estruturais aparentes.
8. As fibrilas de colágeno da região de tensão apresentaram diâmetros maiores que as regiões de compressão. A média dessas medidas apresentaram valores progressivos entre as idades de 30d e 180d e diminuição com 730d.
9. As regiões de tensão do TC e TFDP apresentaram percentagens de intumescimento mais acentuado em ácido acético que as de compressão. Os valores diminuíram com o envelhecimento, mas mantiveram as proporções.
10. A presença de GAGs foi maior na região *p* dos dois tendões nos indivíduos mais jovens. Durante o envelhecimento, as regiões de compressão do TC e TFDP apresentaram valores proporcionalmente maiores, mas o conteúdo geral diminuiu.
11. A extração de proteínas no TC e TFDP foi maior nas regiões sujeitas somente a tensão, no entanto, a quantificação de ácido urônico e GAGs sulfatados nos extratos foi maior nas áreas sujeitas às forças de compressão.
12. O GAG predominante nas regiões do TC e TFDP em todas as idades foi o DS. O CS somente foi detectado nas regiões de compressão de indivíduos com 30d.
13. O FM e o Dec foram detectados em todas as regiões e idades. O FM parece apresentar diferentes graus de associação com o colágeno durante o envelhecimento. Esta interação/associação parece ser mais coesa nos animais mais jovens. A presença do Dec foi mais evidente nas regiões de compressão de animais com 180d.

14. O TC e o TFDP apresentaram grandes diferenças biomecânicas. O TC apresentou aumento progressivo da tensão de ruptura e módulo elástico com a idade. Já o TFDP apresentou valores progressivos somente entre 30d e 180d, e diminuição com 730d de idade. A comparação entre valores absolutos demonstrou que o TFDP necessita de tensão de 3 a 6 vezes maior para ruptura e que é 10 a 40 vezes mais rígido que o TC, dependendo da idade do animal.

15. O TC e o TFDP apresentaram respostas biológicas comuns aos diferentes tipos de estresse mecânicos a que foram submetidos, mas com variações intrínsecas entre eles, associados, provavelmente, às diferenças na exigência funcional.

Referências Bibliográficas

- AMIEL, D. & KLEINER, J.B. (1988) Biochemistry of ligament and tendon. In: Nimni, M.E. (ed.): **COLLAGEN Vol. III: Biotechnology** CRC Press Boca Raton, USA
- ARCANJO, K.D.S.; GOMES, L. & PIMENTEL, E.R. (1994) Effect of magnesium chloride and guanidinium chloride on the extraction of components of extracellular matrix from chicken cartilage. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz Rio J.** 89, 93-97.
- ARMSTRONG, C.R.; LAI, W.M. & MOW, V.C. (1988) An analysis of unconfined compression of articular cartilage. **J. Biomech. Eng.** 106, 165-173.
- BAER, E.; CASSIDY, J.J. & HILTNER, A. (1988) Hierarchical structure of collagen and its relationship to the physical properties of tendon. In: Nimni, M.E. (ed.): **COLLAGEN Vol. II: Biochemistry and Biomechanics** CRC Press Boca Raton, USA.
- BASSETT, C.A.L. & HERRMANN, I. (1961) Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissue in vitro. **Nature** 190, 460-461.
- BEIGUELMAN, B. (1991) **Curso prático de bioestatística.** 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética 231p.
- BENNETT, M.B.; KER, R.F.; DIMERY, N.J. & ALEXANDER, R.C.N. (1986) Mechanical properties of various mammalian tendons. **J. Zoology** 209, 548-556.
- BEST, T.M. & GARRET, W.E. (1994) Basic science of soft tissues: muscle and tendon. In: DeLee, J.C.; Drez, D. (eds.) **Orthopaedic sports medicine: principles and practice** Philadelphia WB Saunders, 1-45.
- BLACKBURN, E. & GREIDER, C. (1995) **Telomeres** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- BLUM, B.; BEIER, H. & GROSS, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8,93-99.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254.
- BRODSKY, B. & EIKENBERRY, E. (1985) Supramolecular collagen assemblies. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 460, 74-84.

- BROWN, A.H. (1946) Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. **Arch. Biochem.** 11, 269-278.
- BUCALA, R. & CERAMI, A. (1992) Advanced glycosylation: chemistry, biology and implications for diabetes and aging. **Adv. Pharmacol.** 23, 1-23.
- BURGESON, R.E. & NIMNI, M.E. (1992) Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. **Clin. Orthop.** 282, 250-272.
- CARVALHO, H.F. (1993) **Estrutura e composição de um tendão sujeito a forças de compressão** (Doutorado) Instituto de Biologia, UNICAMP.
- CARVALHO, H.F. & VIDAL, B.C. (1994) Structure and histochemistry of a pressure-bearing tendon of the frog. **Annals Anat.** 176, 161-170.
- CARVALHO, H.F. (1995) Understanding the Biomechanics of Tendon Fibrocartilages. **J. Theor. Biol.** 172, 293-297.
- CASTAGNOLA, P.; TAVELLA, S.; GERECKE, D.R.; DUBLET, B.; GORDON, M.K.; SEYER, J.; CANCEDDA, R.; van der REST, M. & OLSEN, B.R. (1992) Tissue-specific expression of type XIV collagen - a member of the FACIT class of collagens. **Eur. J. Cell Biol.** 59, 340-347.
- COLLINS, K.J. & EXTON-SMITH, A. N. (1986) Effects of ageing on human homeostasis. In: Bittles, AH & Collins, KJ (eds.) **The biology of human ageing** Cambridge Cambridge University Press, 261-275.
- COVIZI, D.Z. (1995) **Estudo sobre a matriz extracelular de diferentes regiões de três tendões de ratos** (Mestrado) Instituto de Biologia, UNICAMP.
- CURWIN, S.L.; ROY, R.R. & VAILAS, A.C. (1994) Regional and age variation in growing tendon. **J. Morphol.** 221, 309-320.
- DANIELSEN, C.C. (1981) Mechanical properties of reconstituted collagen fibrils. **Connect. Tissue Res.** 9, 51-57.
- DIAMENT, J., KELLER, A., BAER, E., LITT, M. & ARRIDGE, A. (1972) Collagen: ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. **Proc.R.Soc.Lond.** 180: 293-315.
- DIETRICH, C.P. & DIETRICH, S.M.C. (1976) Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffer. **Anal. Biochem.** 70, 645-647.
- ELLIOTT, D.H. (1965) Structure and function of mammalian tendon. **Biol. Rev.** 10, 392-421.

- EVANKO, S.P. & VOGEL, K.G. (1990) Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. **Matrix** 10, 420-436.
- EYRE, D.R.; PAZ, M.A. & GALLOP, P.M. (1984) Cross-linking in collagen and elastin. **Annu. Rev. Biochem.** 53, 717-748.
- FARNDALE, R.W.; BUTTLE, D.J. & BARRET, A.J. (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochim. Biophys. Acta** 883, 173-177.
- FELISBINO, S.L. & CARVALHO, H.F. (1999) Identification and distribution of type VI collagen in tendon fibrocartilages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 31 (in press)
- FLEISCHMAJER, R.; PERLISH, J. & TIMPL, R. (1985) Collagen fibrillogenesis in human skin. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 460, 246-257.
- FLEISCHMAJER, R.; FISCHER, L.W.; MacDONALD, E.D.; JACOBS, L. PERLISH, J.S. & TERMINE, J.D. (1991) Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. **J. Struct. Biol.** 106, 82-90.
- FLORIDI, A.; IPPOLITO, E. & POSTACCHINI, F. (1981) Age-related changes in the metabolism of tendon cells. **Connect. Tissue Res.** 9, 95-97.
- FRANK, E.H. & GRODZINSKY, A.J. (1987a) Cartilage electromechanics I: A continuum model of cartilage electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength. **J. Biomech.** 20, 615-627.
- FRANK, E.H. & GRODZINSKY, A.J. (1987b) Cartilage electromechanics II: A continuum model of cartilage electrokinetics and correlation with experiments. **J. Biomech.** 20, 629-639.
- GILLARD, G.C.; MERRILEES, M.J.; BELL-BOOTH, P.G.; REILLY, H.C. & FLINT, M.H. (1977) The proteoglycan content and the axial periodicity collagen in tendon. **Biochem. J.** 163, 145-151.
- GILLARD, G.C.; REILLY, H.C.; BELL-BOOTH, P.G. & FLINT, M.H. (1979) The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycans content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. **Connect. Tissue Res.** 7, 37-46.
- GILCHREST, B. A. & BOHR, V.A. (1997) Aging processes, DNA damage, and repair. **FASEB J.** 11, 322-324.
- GIORI, N.J.; BEAUPRÉ, G.S. & CARTER, D.R. (1993) Cellular shape and pressure may mediate mechanical control of tissue composition in tendons. **J. Orthop. Res.** 11, 581-591.

- GRAY, M.L.; PIZZANELLI, A.M.; GRODZINSKY, A.J. & LEE, R.C. (1988) Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. **J. Orthop. Res.** 6, 777-792.
- GRODZINSKY, A.J. (1983) Electrochemical and physicochemical properties of connective tissue. **CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.** 9, 133-139.
- GUARENTE, L. (1997) What makes us tick? **Science** 275, 943-946.
- HANNAFIN, J.A. & ARNOCKY, S.P. (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, 350-356.
- HART, R.W. & TURTURRO, A. (1985) Theories of aging. In: Rothstein, M. (ed.) **Review of Biological Research in Aging** Alan Liss Press, NY.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.** 25, 585-589.
- HAYFLICK, L. (1985) Theories of biological aging. **Exp. Gerontol.** 20, 145-159.
- HEDBOM, E. & HEINEGÅRD, D. (1989) Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. **J. Biol. Chem.** 264, 6869-6905.
- HEINEGÅRD, D.; LARSSON, T.; SOMMARIN, Y.; FRANZEN, A.; PAULSSON, M. & HEDBOM, E. (1986) Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distribution among connective tissues. **J. Biol. Chem.** 261, 13866-13872.
- HEINEGÅRD, D. & PIMENTEL, E.R. (1992) Cartilage Matrix Proteins. In: **Articular Cartilage and Osteoarthritis**. Küttner, K et al. (eds.) Raven Press NY.
- HERMANN, H.; DESSAU, W.; FESSLER, L.I. & von der MARK, K. (1980) Synthesis of types I,III and AB₂ collagen by chicken tendon fibroblasts *in vitro*. **Eur. J. Biochem.** 105, 63-74.
- HOCKING, A.M.; SHINOMURA, T. & McQUILLAN, D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. **Matrix Biol.** 17, 1-19.
- HOFMANN, H.; FIETZEK, P.P. & KÜHN, K. (1978) The role of polar and hydrophobic interactions for the molecular packing of type I collagen: a three-dimensional evaluation of the amino acid sequence. **J. Mol. Biol.** 125, 137-165.
- HOLT, S.E. (1996) Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. **Nat. Biotech.** 14, 836-840.

- HUKINS, D.W.L. & ASPDEN, R.M. (1985) Composition and properties of connective tissues. **TIBS**, 10, 260-264.
- IOZZO, R.V. & MURDOCH, A.D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. **FASEB J.** 10, 598-614.
- IPPOLITO, E.; NATALI, P.G.; POSTACCHINI, F. ACCINNI, L. & de MARTINO, C. (1980) Morphological, immunochemical and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. **J. Bone Joint Surg.** 62, 583-598.
- JAZWINSKI, S.M. (1996) Longevity, genes and aging. **Science** 273, 54-57.
- JIMENEZ, S.A.; YANKOWSKI, R. & BASHEY, R.I. (1978) Identification of two new collagen alpha chains in extracts of lathyrus chick embryo tendons. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 81, 1298-1306.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G. & BRENTANI, R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.** 11, 447-455.
- KADLER, K.E.; HOLMES, D.F.; TROTTER, J.A. & CHAPMAN, J.A. (1996) Collagen fibril formation. **Biochem. J.** 316, 1-11.
- KAO, K-Y, HILKER, D.M. & McGAVACK, T.H. (1961) Connective tissue V. Comparison of synthesis and turnover of collagen and elastin in tissues of rat at several ages. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 106, 335-338.
- KASTELIC, J., GALESKI, A. & BAER, E. (1978) The multicomposite structure of tendon. **Connect. Tiss. Res.** 6: 11-23.
- KIM, N.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science** 266, 2011-2013.
- KIMURA, K.D. (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 277, 942-945.
- KLAUS, W. & OSBORN, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.** 244, 4406-4412.
- KOOB, T.J. & VOGEL, K.G. (1987) Site related variation in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. **J. Orthop. Res.** 5, 414-424.
- KOHN, R.R. (1978) **Principles of Mammalian Aging**. Prentice-Hall, NJ.

- LAKOWSKI, B. & HEKINI, S. (1996) Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. **Science** 272, 1010-1013.
- LANE, N.E., BLOCH, D.A., WOOD, P.D. & FRIES, J.F. (1987) Aging, long distance running, and the development of musculoskeletal disability. **Am. J. Med.** 82, 772-780.
- LEV, R. & SPICER, S.S. (1964) Specific staining of sulphate groups with Alcian blue at low pH. **J. Histochem. Cytochem.** 12, 309.
- LISON, L. (1960) **Histochimie et Cytochimie Animales**. Gautier-Villars, Paris.
- LIU, S.H.; YANG, R.S.; SHAIKH, R. & LANE, J. M. (1995) Collagen in tendon, ligament and bone healing. **Clin. Orthop. rel. Res.** 318, 265-278.
- LOITZ, B.J.; ZERNICKE, R.F.; VAILAS, A.C., KODY, M.H. & MEALS, R.A. (1989) Effects of short-term immobilization versus continuous passive motion on the biomechanical and biochemical properties of rabbit tendon. **Clin. Orthop.** 244, 265-271.
- MANSKE, P.R.; BRIDWELL, K. & LESKER, P.A. (1978) Nutrient pathways to flexor tendons of chickens using tritiated proline. **J. Hand. Surg.** 3, 352-357.
- MANSKE, P.R. & LESKER, P.A. (1983) Comparative nutrient pathways to flexor tendons in zone II of various experimental animals. **J. Surg. Res.** 34, 83-93.
- MASORO, E.J. (1991) Biology of aging: facts, thoughts and experimental approaches. **Lab. Invest.** 66, 500-510.
- MAYNE, R. & BREWTON, R.G. (1993) New members of the collagen superfamily. **Curr. Opin. Cell Biol.** 5, 883-890.
- MEDVEDEV, Z.A. (1990) An attempt at a rational clarification of theories of aging. **Biol. Rev.** 65, 375-398.
- MERRILLES, M.J. & FLINT, M.H. (1980) Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. **Am. J. Anat.** 157, 87-106.
- MICHELACCI, Y.M. & HORTON, D.S.P.O. (1989) Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **Comp. Biochem. Physiol.** 96B, 651-658.
- MILLER, E.J. (1984) Chemistry of the collagens and their distribution. In: Piez, K.A. & Reddi, A.H. (eds.) **Extracellular Matrix Biochemistry** Elsevier, NY.
- MILLER, E.J. (1985) The structure of fibril-forming collagens. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 460, 1-13.

- MILLS, D.K. & DANIEL, J.C. (1993) Development of functional specializations within the maturing rabbit flexor digitorum profundus tendon. **Connect. Tissue Res.** 30, 37-57.
- MOORE, M.J. & DeBEAUX, A. (1987) A quantitative ultrastructural study of rat tail tendon from birth to maturity. **J. Anat.** 153, 163-169.
- MORIN, G.B. (1991) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. **Cell** 59, 521-524.
- MOSLER, E.; FOLKHARD, W.; KNÖRZER, E.; NEMETSCHKEK-GANSLER, H.; NEMETSCHKEK, T.H. & KOCH, M.H.J. (1985) Stress-induced molecular rearrangement in tendon collagen. **J. Mol. Biol.** 182, 589-596.
- NAKAMURA, T. & NAGAI, Y. (1980) Developmental changes in the synthesis of glycosaminoglycans and collagen in embryonic chick skin. **J. Biochem.** 87, 629-637.
- NANCE, M.A. & BERRY, S.A. (1994) Cockayne syndrome: review of 140 cases. **Am J. Med. Genet.** 42, 68-72.
- NIEDERMÜLLER, H.; SKALICKY, M. HOFECKER, G. & KMENT, A. (1977) Investigations on the kinetics of collagen-metabolism in young and old rats. **Exp. Gerontol.** 12, 159-168.
- NIMNI, M.E. & HARKRESS, R.D. (1988) Molecular structures and functions of collagen. In: Nimni, M.E. (ed.) **COLLAGEN vol. I: Biochemistry** Boca Raton CRC Press.
- O'BRIEN, M. (1992) Functional anatomy and physiology of tendons. **Clin. Sports Med.** 11, 505-520.
- O'BRIEN, M. (1997) Structure and metabolism of tendons. **Scan. J. Med. Sci. Sports** 7, 55-61.
- OKUDA, Y.; GORSKI, J.P.; AN, K.N. & AMADIO, P.C. (1987a) Biochemical, histological and biomechanical analyses of canine tendon. **J. Orthop. Res.** 5, 60-68.
- OKUDA, Y. GORSKI, J.P. & AMADIO, P.C. (1987b) Effect of postnatal age on the ultrastructure of six anatomical areas of canine flexor digitorum profundus tendon. **J. Orthop. Res.** 5, 231-241.
- OLDBERG, A. ANTONSSON, P. LINDBLUM, K. & HEINEGÅRG, D. (1989) A collagen-binding 59kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). **EMBO J.** 8, 2601-2604.
- OLSON, C.B. (1987) A review of why and how we age: a defense of multifactorial aging. **Mech. Ageing Dev.** 41, 1-28.

- PARRY, D.A.D.; BARNES, G.R.G. & CRAIG, A.S. (1978a) A comparison of the size and distribution of collagen fibrils in connective tissue as a function of age and a possible relation between fibrils size distribution and mechanical function. **Proc. R. Soc. Lond.** 203B, 305-321.
- PARRY, D.A.D.; CRAIG, A.S. & BARNES, G.R.G. (1978b) Tendon and ligament from the horse: an ultrastructural study of collagen fibrils and elastic fibres as a function of age. **Proc. R. Soc. Lond.** 203B, 293-303.
- PARRY, D.A.D.; FLINT, M.H.; GILLARD, G.C. & CRAIG, A.S. (1982) A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. **FEBS Lett.** 149: 1-7.
- PARRY, D.A.D.; CRAIG, A.S. (1988) Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. In: Nimni, M.E. (ed.): **COLLAGEN Vol. II: Biochemistry and Biomechanics** CRC Press Boca Raton, USA.
- PENNISI, E. (1996) Worm genes imply a master clock. **Science**, 272, 949-952.
- PIEZ, K.A. (1984) Molecular and aggregate structures of collagen. In: Piez, K.A. & Reddi, A.H. (eds.) **Extracellular Matrix Biochemistry** Elsevier, NY.
- POOLE, C.A. & FLINT, M. H. (1984) Morphological and functional interrelationship of articular cartilage matrices. **J. Anat.** 138, 113-138.
- POOLE, C.A.; FLINT, M. H. & BEAUMONT, B.W. (1985) Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues. A cellular cybernetic probe? **Cell Motility** 5, 175-193.
- POOLE, C.A.; AYAD, S. & GILBERT, R.T. (1992) Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organization in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. **J. Cell Sci.**, 103, 1101-1110.
- REYNOLDS, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 17, 208-211.
- ROBBINS, J.R.; EVANKO, S.P. & VOGEL, K.G. (1997) Mechanical loading and TGF- β regulate proteoglycan synthesis in tendon. **Arch. Bioch. Bioph.** 342 (2), 203-211.
- ROONEY, P. (1994) Intratendinous Ossification In: Hall, B. (ed.) **BONE Vol. 8: Mechanisms of Bone Development and Growth** CRC Press, Boca-Raton, USA.
- ROSE, M.R. (1991) **Evolutionary Biology of Aging**. Oxford University Press, NY.
- RUFAL, A.; BENJAMIN, M. & RALPHS, J.R. (1992) Developmental and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. **Anat. Embryol.** 186, 611-618.

- SCHNEIDER, E.L. (1987) Theories of aging, a perspective. In: Warner, R.N.; Butler, R.L.; Sprott, R.L. & Schneider, E.L. (eds.) **Modern Biological Theories of Aging** Raven Press, NY.
- SCOTT, J.E. (1988) Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. **Biochem. J.** 252, 313-323.
- SCOTT, J.E. & DORLING, J. (1965) Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian blue in salt solutions. **Histochimie** 5, 221-223.
- SCOTT, J.E.; HAIGH, M.; NUSGENS, B. & LAPIERE, C.M. (1989) Proteoglycan: collagen interactions in dermatosparatic skin and tendon. An electron histochemical study using cupromeronic blue in a critical electrolyte concentration method. **Matrix** 9, 437-442.
- SCOTT, J.E. & HUGHES, E.W. (1986) Proteoglycan-collagen relationships in developing chick and bovine tendons: Influence of the physiological environment. **Connect. Tissue Res.** 14, 267-278.
- SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R. & HUGHES, E.W. (1981) Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tails tendon. An electron-microscopical and biochemical investigation. **Biochem. J.** 195, 573-581.
- SCOTT, P.G.; WINTERBOTTOM, N.; DODD, C.M.; EDWARDS, E. & PEARSON, C.H. (1986) A role for disulphide bridges in the protein core in the interaction of proteodermatan sulphate and collagen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 138, 1348-1354.
- SELL, D.R. & MONNIER, V.M. (1995) Aging of long-lived proteins: extracellular matrix (collagens, elastins and proteoglycans). In: Masoro, E.J. (ed.) **Handbook of physiology Section 11: Aging** Oxford University Press, NY.
- SHADWICK, R.E. (1990) Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. **J. Appl Physiol.** 68, 1033-1040.
- SINEX, F.M. (1968) The role of collagen in aging. In: Gould, B.S. (ed.) **Treatise on collagen** Academic Press, NY.
- SLACK, C.; FLINT, M.H. & THOMPSON, B.M. (1984) The effect of tensional load on isolated embryonic chick tendon. **Connect. Tissue Res.** 12, 229-247.
- SMITH, J. R. & SMITH, O.M.P. (1996) Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. **Science** 273, 63-65.
- SOHAL, R.S. & WEINDRUCH, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. **Science** 273, 59-63.

- STROCCHI, R.; PASQUALE, V.; GUIZZARDI, S.; GOVONI, P.; FACCHINI, A.; RASPANTI, M.; GIROLAMI, M. & GIANNINI, S. (1991) Human Achilles Tendon: Morphological and morphometric variations as a function of age. **Foot & Ankle**, 12, 100-104.
- SUGRUE, S.P.; GORDON, M.K.; SEYER, J.; DUBLET, B.; van der REST, M. & OLSEN, B.R. (1989) Immunoidentification of type XII collagen in embryonic tissues. **J. Cell Biol.** 109, 939-945.
- SVENDSEN, K.H. & THOMSON, G. (1984) A new clamping and stretching procedure for determination of collagen fiber stiffness and strength relations upon maturation. **J. Biomechan.** 17, 225-229.
- TOWBIN, T. & GORDON, S. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 76, 4350-4354.
- TUITE, D.J.; RENSTRÖM, P.A.F.H. & O'BRIEN, M. (1997) The aging tendon. **Scan. J. Med. Sci. Sports** 7: 72-77.
- van STEENSEL, B. & LANGE, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. **Nature** 385, 740-742.
- van der REST, M. & GARRONE, R. (1991) Collagen family of proteins. **FASEB J.** 5, 2814-2823.
- VIDAL, B.C. (1966) Periodontal biocynetics. **Rev.Bio. Oral** 4, 18-25.
- VIDAL, B.C. (1969) Collagen bundle regulation and control. **Revta. Brasil. Pesq. Med. Biol.** 2, 356-359.
- VIDAL, B.C. (1986) Evaluation of carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. **Cell Mol. Biol.** 32, 527-535.
- VIDAL, B.C. (1993) Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. **Rev. Med. Unicamp** 4,1-6.
- VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. (1984) Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. **Cell. Molec. Biol.** 30, 195-204.
- VIDAL, B.C. & CARVALHO, H.F. (1990) Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. **Matrix** 10, 48-57.
- VIIDIK, A. (1973) Functional properties of collagenous tissues. **Int. Rev. Connect. Tiss. Res.** 6, 127-215.

- VIIDIK, A. (1979) Connective tissues: Possible implications of the temporal changes for the aging process. **Mech. Aging Dev.** 9, 267-285.
- VIIDIK, A. (1980) Mechanical properties of parallel-fibred collagenous tissues. In: Viidik, A. & Vuust, J. (ed.) **Biology of Collagen** Academic Press New York.
- VIIDIK, A. (1996) Tendons and Ligaments In: Comper, W.D. (ed.) **Extracellular Matrix** Harwood Academic Publishers Melbourne.
- VILARTA, R. & VIDAL, B.C. (1989) Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. **Matrix Biol.** 9, 55-61.
- VOGEL, H.G. (1978) Influence of maturation on mechanical and biochemical parameters of connective tissue of various organs in the rat. **Connect. Tissue Res.** 6, 161-166.
- VOGEL, H.G. (1980) Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats. **Mech. Ageing Dev.** 14, 283-292.
- VOGEL, K.G.; 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, K.G. & HEINEGÅRD, D. (1985) Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. **J.Biol.Chem.** 260, 9298-9306.
- VOGEL, K.G. & TROTTER, J.A. (1987) The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. **Collagen Rel. Res.** 7, 105-114.
- VOGEL, K.G. & THONAR, E.J. (1988) Keratan sulfate is a component of proteoglycans in the compressed regions of adult bovine flexor tendon. **J. Orthop. Res.** 6, 434-442.
- VOGEL, K.G. & KOOB, T.J. (1989) Structural specializations in tendons under compression. **Int.Rev. Cytol.** 115, 267-293.
- VOGEL, K.G. & HERNANDEZ, D.J. (1992) The effects of transforming growth factor-beta and serum on proteoglycan synthesis by tendon fibrocartilage. **Eur. J. Cell Biol.** 59, 304-313.
- VOGEL, K.G.; SANDY, J.D.; PAGONY, G. & ROBBINS, J.R. (1994) Agrecan in bovine tendon. **Matrix Biol.** 14, 171-179.
- VOGEL, K.G. (1996) The effect of compressive loading on proteoglycan turnover in cultured fetal tendon. **Connect. Tissue Res.** 34, 227-237.
- WEINDRUCH, R. & SOHAL, R.S. (1997) Caloric intake and aging. **N. Engl. J. Med.** 337, 986-989.

- WILLIAMS, P.L.; WARWICH, R.; DYSON, M. & BANMISTER, L.H. (1989) **GRAY's Anatomy** 37th edition Churchill Livingstone London.
- WOO, S.L.Y.; RITTER, M.A.; AMIEL, D.; SANDERS, T.M.; GOMEZ, M.A.; KUEI, S.C.; GARFIN, S.R. & AKESON, W.H. (1980) The biomechanical and biochemical properties of swine tendons: long term effects of exercise on the digital extensors. **Connect. Tissue Res.** 7, 177-183.
- WU, J-J. & EYRE, D.R. (1985) Studies on the distribution of hydroxypyridinium crosslinks in different collagen types. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 460, 520-523.
- YU, C.E. (1996) Positional cloning of the werner's syndrome gene. **Science** 272, 258-262.
- ZINGALES, B. (1984) Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In **Genes and Antigens of Parasites** (Morel, C.M. ed.) Fiocruz, RJ.