

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Ricardo Catalano

**ESTUDO DO EFEITO DE FORÇAS PERIÓDICAS DE TRAÇÃO
SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR DE TENDÃO**

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

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Edson Rosa Pimentel".

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	T 1000-1000
	328e
V	EX
TOMBO BC/	53350
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/04/03
Nº CPD	

ii

CM001B2197-9

BIB VD 233577

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

C28e

Catalano, Ricardo

Estudo do efeito de forças periódicas de tração sobre a matriz extracelular de tendão /Ricardo Catalano. --
Campinas, SP:[s.n], 2002.

Orientador: Edson Rosa Pimentel

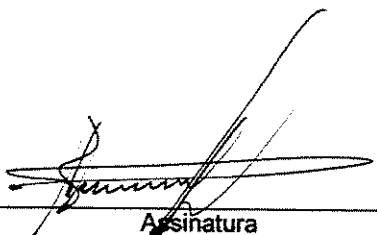
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1.Biomecânica. 2.Rato. 3.Matriz extracelular. I. Pimentel, Edson Rosa.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 29/10/2002

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Benedicto Campos Vidal



Assinatura

Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marreto Esquisatto

Assinatura

1008 1345

ÍNDICE

Resumo	01
Abstract	02
Introdução	03
Objetivo geral	26
Objetivo específico	26
Referências	27
Artigo	43
Resumo	44
Introdução	46
Material e Métodos	48
Resultados	57
Discussão	60
Figura 01 – Cromatogramas e eletroforeses	66
Figura 02 – Eletroforese em gel de agarose	68

Figura 03 – Fotomicrografias obtidas com microscopia de polarização	70
Tabela 01 – Valores de cinza médio e entropia	72
Tabela 02 - Valores de diroísmo linear de tendões controle e suspensos	73
Tabela 03 – Valores de diâmetro máximo, mínimo e área calculados a partir de imagens de “crimp”	74
Figura 04 – Micrografias eletrônicas em cortes transversais e medidas de área das fibrilas de colágeno.	75
Figura 05 – Micrografias eletrônicas de cortes longitudinais de fibrilas de colágeno	77
Referências	79
Conclusões	89

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pelo aceite de orientador, pelos anos de trabalho, pela amizade e orientação criteriosa e principalmente por todo meu aprendizado.

Ao prof. Dr. Benedicto Campos Vidal, também pela colaboração na minha formação e análise criteriosa do material de Microscopia de Polarização e pelas valiosas sugestões.

Ao prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pelo auxílio no desenvolvimento dos estudos morfológicos realizados neste trabalho bem como suas sugestões.

Aos membros da pré-banca (Dr. Vidal, Dr. Marcelo e Dra. Sônia), pelas valiosas sugestões, e da Banca examinadora, pela disponibilidade em participar deste trabalho.

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

A profa. Dra. Laurecir Gomes pela suas sugestões, amizade, incentivo e companheirismo.

Ao prof. Dr. Marcelo Augusto Marreto Esquisatto pelas suas sugestões importantes para melhoria deste texto.

Ao amigo de trabalho prof. Dr. Romário de Araújo Mello, pelo incentivo, amizade e auxílio na minha formação.

A profa. Dra. Miralva Aparecida de Jesus Silva, pela amizade, companheirismo, pelo carinho e ainda pela contribuição em minha formação.

Ao amigo de trabalho Gustavo Henrique da Silva pelo companheirismo, pelo auxílio na Microscopia Eletrônica e principalmente pela sua amizade e companheirismo.

Aos amigos do laboratório, Edinho, Francisco, João Batista, Verinha, Gustavo, Veridiana, Laércio pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários da secretaria, Líliam Silvia e Sidnei, pelo profissionalismo e principalmente pela amizade.

A todos os meus amigos, fundamentais.

Aos colegas de Pós-graduação, pelo apoio.

A toda minha família, meus pais e irmãos pela compreensão, amor e por toda ajuda durante todos meus anos de estudo e de vida.

A minha esposa Cristiane pelo amor, incentivo, paciência, companheirismo e enfim, por toda colaboração em meus estudos e em minha vida.

Enfim, à DEUS, fonte da vida, por ter me concedido mais esta grande oportunidade.

RESUMO

Os tendões em geral, possuem funções importantes relacionadas com a transmissão das forças de tração geradas pela contração muscular para o osso. São estruturas adaptadas à resistir a forças de tração, e em alguns tendões podem resistir também a forças de compressão. A organização dos componentes da matriz extracelular proporcionam ao tendão grande flexibilidade, resistência e uma certa elasticidade. Estas características biomecânicas permitem ao tendão realizar trabalho com eficiência funcional e otimização operacional. A matriz extracelular de tendão é constituída por colágeno, proteoglicanos e proteínas não colagênicas. A organização e distribuição destes componentes são diferentes para diferentes tecidos dependendo da presença de forças de tração e compressão a que estão sujeitas. O objetivo deste trabalho foi analisar a organização estrutural e a composição da matriz extracelular de tendões submetidos a forças periódicas de tração. Para tanto, foram analisados tendões de cauda de ratos suspensos e comparados a ratos controle. Foram realizadas análises bioquímicas de componentes da matriz, e análise morfológica utilizando microscopia de luz normal e polarizada além da microscopia eletrônica de transmissão. As análises revelaram que os tendões caudais sob tração sofrem modificações estruturais e físico químicas. Foi observado que no caso dos tendões suspensos, ocorreu uma maior compactação e organização das moléculas colagênicas, e que também um dos pequenos proteoglicanos, o decorin provavelmente sofre alterações em sua estrutura.

ABSTRACT

Tendons are structures capable of undergoing different adaptations to accomplish their function with efficiency. In this work we have analyzed the modifications in tendons of rat tails, which were submitted to periodic tension forces. Morphological and biochemical analyses were carried out. A waviness aspect of collagen bundles was observed for suspended tendons but not in control tendons. Also higher linear dichroism values were observed for suspended tendons, indicating the existence of a re-arrangement of the collagen bundles when submitted to tension forces. Ultrastructural analysis, showed that in the case of suspended tendons, the diameter of the fibrils of collagen were larger compared with the control. The biochemical analysis, showed no differences between the composition of the extracellular matrix of suspended and control tendons, but it was remarkable the behavior of the polydisperse proteoglycan with 140 kDa, that migrated faster in SDS-PAGE, in the case of suspended tendons, indicating probably a diminishing in the size of the glycosaminoglycan chain present in that proteoglycan. It is discussed the possible effect of the polydisperse component in the increased diameter of collagen fibrils in the case of suspended tendons.

INTRODUÇÃO

O tendão é constituído de tecido conjuntivo denso modelado. Nestes tecidos há grande quantidade de matriz extracelular (MEC) envolvendo as células. A MEC é produzida e organizada por células especializadas chamadas de fibroblastos, (HAY, 1991), que secretam ao seu redor, macromoléculas com propriedades específicas em cada tecido por elas constituídas. As macromoléculas estão organizadas de forma a proporcionar aos vertebrados várias funções importantes. Dentre elas, o estabelecimento da morfologia do corpo, organogênese e migração celular (REDDI, 1984). No adulto e no embrião as funções são numerosas, como ajudar na adequada rigidez estrutural em ossos e cartilagens, tecidos elásticos e tecido conjuntivo frouxo, além de ter papel na filtração renal, como exemplo. A migração celular é facilitada pela MEC, que funciona como andaimes por onde as células mesenquimais crescem, migram e futuramente diferenciam-se para executar funções específicas, (HAY, 1991).

Outra função importante da MEC refere-se à troca de informações entre as células. As moléculas da matriz, afetam a organização do citoplasma através de receptores transmembrana, influenciando a forma, mobilidade e diferenciação celular (VIDAL, 1987).

A MEC é formada por macromoléculas de duas classes principais. A primeira delas são as proteínas fibrosas de natureza estrutural (colágeno e elastina) e de natureza adesiva (fibronectina e laminina). A segunda classe de macromoléculas

são os proteoglicanos. Estes possuem um esqueleto protéico central, covalentemente ligado aos Glicosaminoglicanos (GAGs) (HAY, 1991).

As moléculas de colágeno são encontradas em todos eucariotos com exceção de protozoários e às vezes constituem mais da metade das proteínas totais de um organismo adulto e normalmente acha-se como o componente principal da MEC. Tradicionalmente, o papel atribuído ao colágeno é estrutural, sendo que a molécula dá apoio e resistência à tração da mesoglêia de celenterados e à cutícula de anelídeos, pele, ossos, tendões e córnea de vertebrados (HAY, 1991).

As moléculas de colágeno são constituídas de três cadeias α , em forma de fita-tripla helicoidal. O aspecto helicoidal é devido a seqüência e aos tipos de aminoácidos. Cada cadeia α contém cerca de 1000 aminoácidos e é organizada para esquerda, contendo três aminoácidos por volta, sendo que o terceiro é sempre uma glicina. Portanto, a cadeia é formada de várias seqüências Gly-X-Y, onde a freqüência de X ser uma prolina e Y ser uma hidroxiprolina é muito grande (HAY, 1991). Uma molécula em tripla hélice é formada a partir da combinação de três cadeias pró- α ligadas por pontes de hidrogênio, constituindo o pró-colágeno. Além da região helicoidal das moléculas de colágeno, são encontrados também extensões não helicoidais chamada de propeptídeos em ambas extremidades amino e carboxiterminal. Estes propeptídeos representam papéis funcionais importantes, pois impedem que as moléculas de pró-colágeno associem-se no citoplasma celular. As moléculas de pró-colágeno secretadas são convertidas em moléculas de colágeno no espaço extracelular pela remoção dos propeptídeos (HAY, 1991). As moléculas de colágeno fibrilares recém formadas consistem de uma tripla hélice

ininterrupta de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, com regiões amino e carboxiterminais não apresentando tripla-hélice (telopectídeos). Os telopectídeos não apresentam as sequências tripletes repetidas e compreendem 2 % da molécula (VAN DER REST and GARRONE, 1991).

Aproximadamente a metade dos 200 aminoácidos presentes no interior das cadeias α , são prolinas na posição Y dos tripletes de Gly-X-Y, e estes podem ser enzimaticamente convertidos à hidroxiprolina (GRANT and PROCKOP, 1972 ; CARDINALE and UDENFRIEND, 1974). A enzima responsável por esta conversão é uma prolil-hidroxilase. Sua especificidade ao substrato é limitada a resíduos de prolina e na presença de O_2 , α cetoglutarato, ácido ascórbico e cofatores de ferro, convertem estes resíduos de prolina em hidroxiprolina. Embora a prolil-hidroxilase aja em pequenos polipeptídeos, em geral sua atividade aumenta com o tamanho crescente do peptídeo (HAY, 1991). É conhecido que a formação de hidroxiprolina é necessária para estabilidade da hélice e também para secreção eficiente de pró-colágeno, o precursor para formar colágeno extracelular (HAY, 1991).

A remoção enzimática de propeptídeos permite que as moléculas de colágeno se agrupem no espaço extracelular para formar fibrilas de colágeno (HAY, 1991).

O aminoácido lisina, uma vez incorporado na cadeia de colágeno crescente, pode sofrer conversões enzimáticas subsequentes. Resíduos de lisina posicionados no Y de um triplete de Gly-X-Y, pode ser convertido a hidroxilisina pela enzima lisil-hidroxilase (HAY, 1991). A especificidade da enzima pelo substrato e as exigências de cofatores que incluem O_2 , ferro, α cetoglutarato e ácido ascórbico, são iguais à prolil-hidroxilase. Uma vez a lisina hidroxilada, podem ocorrer modificações

enzimáticas pós traducionais como glicosilações. As glicosilações são catalisadas por duas enzimas glicosil-transferase na ligação peptídica que catalisam a transferência de difosfato de uridina. A primeira enzima, uma galactosil-transferase, prende galactose sobre a hidroxilisina, e a segunda, uma glucosil-transferase, prende um resíduo de glicose sobre a galactose ligada. Assim, os dois derivados da glicosilação são galactosil-hidroxilisina e glucosil-galactosil-hidroxilisina. Estas são as únicas duas formas de glicosilação encontradas em uma molécula de colágeno (SCHOFIELD, 1971).

A formação das fibrilas inicia-se próximo a superfície celular geralmente em recessos profundos da membrana plasmática formados pela fusão das vesículas secretoras com a superfície da célula (MAYNE, 1993).

As fibrilas de colágeno I vista ao microscópio eletrônico, possuem estriações transversais características a cada 67 nm, essas estriações ocorrem devido a disposição dos aminoácidos e à forma como as moléculas de colágeno se ligam (HAY, 1991).

As fibrilas no espaço extracelular são bastante reforçadas pela formação de ligações cruzadas entre as lisinas das moléculas de colágeno, ligações estas encontradas apenas em colágeno e elastina. Estas ligações covalentes cruzadas podem ser intramoleculares e intermoleculares, ocorrem em certas lisinas e hidroxilisinas, que por ação da enzima extracelular lisil-oxidase, produz grupos aldeídicos altamente reativos que reagem espontaneamente para formar as ligações. Cerca de mais da metade dessas ligações ocorrem nas extremidades não helicoidais, telopeptídeos (EYRE, 1984). As fibrilas podem associar-se à moléculas

de colágeno não fibrilar. Moléculas por exemplo do tipo XII, ligam-se à fibrilas do tipo I em tendões e outros tecidos. O mesmo ocorre com colágeno tipo IX que se associa às fibrilas de colágeno tipo II (HAY, 1991).

Os principais tipos de moléculas de colágeno encontrados, são tipo I, II, III, V e XI. O tipo mais abundante é o colágeno tipo I, que compõe pele e ossos, os colágenos tipo I, II, III, V e XI são fibrilares, os tipos I e V estão compondo ossos, ligamentos, tendões, córnea e pele, o tipo II e XI estão distribuídos pela notocorda, cartilagem, disco intervertebral e humor vítreo dos olhos, e o tipo III, pele, vasos sangüíneos e órgãos internos. Existem outros tipos de colágeno que estão associados a fibrilas, como no caso do colágeno tipo IX que encontra-se associado lateralmente com algumas fibrilas de colágeno tipo I em cartilagens, e o colágeno tipo XII em tendões e ligamentos está freqüentemente associado lateralmente com fibrilas de colágeno tipo I (MAYNE, 1993). O colágeno tipo IV e VII, são aqueles constituidores de redes. As moléculas do tipo VII formam fibrilas ancoraduras entre a lâmina basal e o tecido conjuntivo subjacente e são encontrados na pele (MAYNE, 1993). O colágeno X é encontrado na matriz cartilaginosa e parece estar relacionado com mineralização daquela cartilagem (KWAN, 1991).

A MEC, também é formada por outras proteínas de natureza não colagênica, que também são importantes para a organização da matriz (HYNES, 1986). A fibronectina é uma glicoproteína que pode apresentar vários domínios com especificidade para interagir com sítios específicos em outras macromoléculas da matriz bem como para receptores na superfície das células. Ela é constituída de duas subunidades unidas por duas ligações dissulfeto próximos às suas

extremidades carboxiterminais (HAY, 1991). Possui cerca de cinco domínios em forma de bastões ligados por segmentos flexíveis de polipeptídeos. A sequência Arg-Gly-Asp (RGD), compõe o sítio de ligação celular (RUOSLAHTI, 1987). Um valioso modo para analisar estes domínios funcionais separadamente é usar proteases como tripsina ou quimiotripsina. Estas proteases tendem a cortar preferencialmente as regiões mais estendidas da molécula onde a cadeia polipeptídica é desdobrada. Esta propriedade permite o isolamento de locais intactos que ligam moléculas de modo que suas atividades de ligação possam ser testadas. Desta forma, foi demonstrado que um dos domínios liga-se ao colágeno (BALIAN et al., 1979 ; WAGNER, 1979), outro à heparina e outro à receptores na membrana de diferentes tipos celulares, (JILEK, 1979 ; PERKINS, 1979 ; RUOSLAHTI, 1980).

Várias outras proteínas da matriz, além da fibronectina, possuem a sequência RGD, sendo reconhecida por vários membros de receptores de membrana da família das integrinas que se ligam a estas proteínas da matriz. No entanto, cada receptor reconhece especificamente seu próprio grupo de proteínas da matriz, indicando que a ligação com o receptor necessita de outros elementos além da sequência RGD (RUOSLAHTI, 1987). Existem pelo menos dois tipos de fibronectina, uma do plasma e outra celular. Estes dois tipos possuem propriedades moleculares bem parecidas (YAMADA, 1977; ALEXANDER, 1979). A fibronectina plasmática é solúvel e circula no sangue e outros líquidos corporais, onde parece aumentar a coagulação do sangue, cicatrização de cortes e fagocitose (SCHWARZBAUER, 1991). Nas formas encontradas na superfície celular e na matriz, os dímeros de fibronectina são inter cruzados uns aos outros por pontes de dissulfeto adicionais. A fibronectina

parece funcionar como um elemento interconectante no tecido conjuntivo, mediando funções biológicas importantes, tais como, agregação célula-célula e célula-substrato, migração celular, aumento da motilidade, forma celular e outros (DARRIBÉRE, 2000).

Outros tipos de moléculas adesivas são conhecidas. A tenascina é outra glicoproteína de adesão. Esta é formada por seis cadeias polipeptídicas, ligadas por pontes dissulfeto. Como na fibronectina, cada uma das cadeias polipeptídicas é composta por várias seqüências pequenas de aminoácidos que são repetidas várias vezes. Ela é mais abundante na matriz extracelular de tecidos embrionários, podendo tanto inibir como estimular a adesão celular. Estas funções parecem ser mediadas por domínios diferentes (ERICKSON, 1993).

Outra proteína encontrada no tecido conjuntivo é chamada de fibrilina. Esta foi isolada de cultura de fibroblastos humanos. A eletroforese do agregado de proteína revelou uma única banda com uma massa molecular calculada de 350.000 daltons. Esta proteína parece possuir pontes dissulfeto entre as cadeias (SAKAI et al., 1986). Usando anticorpos monoclonais para fibrilina, foi demonstrado que sua distribuição é difundida na matriz do tecido conjuntivo de pele, pulmões, rins, vasos sanguíneos, cartilagem, tendões, músculo, córnea e zona ciliar (SAKAI et al., 1986). Imunoeletromicroscopia utilizando ouro coloidal mostrou a presença de fibrilina sobre microfibrilas da MEC, estas microfibrilas possuem 10 nm de diâmetro (SAKAI et al., 1986). Microfibrilas ao redor dos sistemas de fibras elásticas foram detectadas através de anticorpos. A imunolocalização sugere que a fibrilina é formada periodicamente ao longo de microfibrilas individuais, e estas microfibrilas individuais

podem ser alinhadas formando estruturas mais complexas. A fibrilina parece ser essencial para a integridade das fibras elásticas (TRAIK, et al 2000). Mutações no gene da fibrilina resultam na síndrome de Marfan, uma doença genética relativamente comum em humanos que afeta os tecidos conjuntivos que são ricos em fibras elásticas. As moléculas de fibrilina aparecem antes da elastina, durante o desenvolvimento dos tecidos, e parecem formar a estrutura na qual serão depositadas as moléculas de elastina recém secretadas (SAKAI et al., 1986 ; RAMIRES et al., 1993 ; BURKE et al., 2000). À medida que a elastina é depositada, as microfibrilas são deslocadas para a periferia da fibra em crescimento (CLEARY, 1983).

As fibras elásticas são constituídas de uma proteína altamente hidrofóbica chamada de elastina com cerca de 750 aminoácidos, rica em prolina e glicina, não glicosilada e pouco hidroxilada. As proteínas recém sintetizadas de elastina e secretadas para o espaço extracelular, sofrem ligações cruzadas entre duas lisinas e agrupam-se em fibras elásticas próximas a membrana plasmática. A elastina, é composta principalmente por dois segmentos pequenos, um sendo hidrofóbico responsável pela propriedade elástica da molécula e segmentos de α -hélice ricos em alanina e lisina, que formam as ligações cruzadas entre as moléculas adjacentes (CLEARY, 1983).

A MEC também é constituída de outras macromoléculas, os proteoglicanos, que são formados de um esqueleto protéico central, ao qual estão covalentemente ligadas uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Estes possuem um dissacarídeo característico repetido. Um dos açúcares do dissacarídeo é um açúcar

aminado (N-acetilglicosamina) ou (N-acetilgalactosamina) e a outra unidade é tipicamente, mas não sempre, um resíduo de ácido urônico, ácido D-glucurônico ou ácido idurônico. Ambas as unidades são variavelmente N ou O sulfatado, mostrando a heterogeneidade destas macromoléculas complexas (JACKSON, 1991).

Os GAGs mais comuns são, sulfato de condroitim (CS), sulfato de dermatam (DS), sulfato de heparam (HS), sulfato de keratam (KS), ácido hialurônico (HA) e heparina. Devido aos grupos sulfato e carboxila, os (GAGs) são carregados negativamente. A alta densidade de cargas negativas atrai uma nuvem de cátions, como o Na^+ , que são osmoticamente ativos, resultando na incorporação de grandes quantidades de água na matriz. Isto gera uma pressão capaz de resistir às forças compressoras que a matriz pode sofrer. Com exceção do ácido hialurônico, todos os outros GAGs estão covalentemente ligados a um esqueleto protéico, formando os proteoglicanos (JACKSON, 1991).

Os GAGs fazem parte dos PGs, e podem associar ainda a proteínas da rede estrutural como a lâmina basal, gerando estruturas extremamente complexas (KJELLÉN et al., 1991).

As cadeias do polissacarídeo são montadas no núcleo da proteína, principalmente no Complexo de Golgi. O ponto inicial ocorre quando um tetrassacarídeo de ligação interage com o aminoácido serina no núcleo protéico, servindo como iniciador para o crescimento do polissacarídeo, subsequente, uma molécula de açúcar é adicionada de cada vez, por enzimas glicosil-transferases específicas. Ainda no Golgi, várias das unidades de açúcar polimerizadas são

modificadas covalentemente por uma série de reações seqüenciais e coordenadas de sulfatação e epimerização (HAY, 1991).

As epimerizações alteram a configuração dos substituintes ao redor dos átomos de carbono na molécula de açúcar e as sulfatações aumentam enormemente a carga negativa do proteoglicano (KJELLÉN et al., 1991).

O núcleo protéico varia de 10.000 a mais de 600.000 Daltons e o número e os tipos das cadeias de (GAGs), variam enormemente, refletindo a variedade de funções que estas moléculas possuem (RUOSLAHTI et al., 1991; HAY, 1991).

Os proteoglicanos da membrana plasmática atuam como co-receptores. As sindecanas constituídas de sulfato de heparam e sulfato de condroitim são proteoglicanos relativamente pequenos. Aproximadamente quatro moléculas de heparam sulfato com uma massa molecular aparente de 14.000 Da é então ligado a cada núcleo protéico. Isso resulta em uma massa molecular total de cerca de 80.000 Da. O núcleo protéico possui regiões hidrofóbicas que podem ancorar macromoléculas na membrana. Estes proteoglicanos, são importantes para facilitar a adesão da célula e parecem interagir com complexos de fibronectina e colágeno (SCOTT, 1992).

Muitos proteoglicanos são constituintes da matriz extracelular, alguns exemplos incluem o perlecan, agrecan, versican, decorin e fibromodulin (HEINEGARD et al., 1990). Alguns possuem funções moduladoras de fatores de crescimento. Foi sugerido que a ligação de fatores de crescimento no heparam sulfato de proteoglicanos, parece proteger o fator de crescimento à degradação (RUOSLAHTI et al., 1991). Além disso, foi proposto que os proteoglicanos poderiam

controlar a atividade de determinadas proteínas pela imobilização da proteína próximo ao sítio onde ela é produzida, através de bloqueio espacial da atividade da enzima ou servindo de reservatório da enzima, para uso tardio (RUOSLAHTI et al., 1991). Proteoglicanos como o decorim são exemplos de reservatórios de fatores de crescimento. Estas participam na regulação do crescimento celular (VISSER et al., 1994; WEBER, 1996; SINI et al., 1997; SCHONHERR et al., 1998).

Um GAG que normalmente é encontrado livre na MEC ou associado eletrostaticamente ao esqueleto protéico de proteoglicanos e a proteínas de ligação é o ácido hialurônico (PREHM, 1984). O ácido hialurônico é o mais simples dos glicosaminoglicanos. Ele consiste de seqüências regulares repetidas de 20.000 a 25.000 unidades de dissacarídeos não sulfatados, e encontrado em grande quantidade no estágio inicial de desenvolvimento de embrião (PREHM, 1984). Na migração celular, na cicatrização de um ferimento ou na resistência às forças compressivas em articulações, o ácido hialurônico é de fundamental importância, além de atuar como lubrificante nas articulações (HAY, 1991).

Também é preciso mencionar a presença de proteínas não colagênicas na matriz extracelular. Uma delas que vem sendo muito estudada é a proteína oligomérica não colagênica de 524 kDa, foi isolada de cartilagem bovina e designada de COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein). A proteína é composta de subunidades unidas por pontes dissulfeto com uma aparente massa molecular de 100 kDa cada. Também é encontrado uma grande quantidade de ácido aspártico e ácido glutâmico. Encontrada na cartilagem, COMP aparece preferencialmente

localizado na matriz territorial de condrócitos, mas também já foi encontrada em tendões, ligamentos e meniscos (HEDBOM et al., 1992).

As células de vertebrados e da maioria de espécies de invertebrados, possuem a habilidade de adesão à matriz extracelular. A adesão celular é uma propriedade requerida para migração celular, estabilidade do tecido, desenvolvimento embrionário, no processo de cicatrização de ferimentos, metástases e outros processos que ligam células ao substrato (BROWN, 1993 ; BUCK, 1987). A adesão celular também afeta a forma, divisão e diferenciação das células. Entre os receptores que representam um papel principal na adesão da célula ao substrato, estão as glicoproteínas de superfície chamadas integrinas. As integrinas são heterodímeros que se constituem em subunidades de glicoproteínas transmembrana associadas não-covalentemente, denominadas α e β , ambas envolvidas no processo de ligação de proteína à matriz (HYNES, 1987).

Enquanto algumas integrinas parecem ligar-se à apenas um tipo de macromolécula da matriz, como a fibronectina e a laminina, outras ligam-se a mais de um tipo. Uma subfamília de integrinas reconhece a seqüência RGD presente em algumas proteínas da matriz, ao passo que outras integrinas reconhecem outros domínios e seqüências. A ligação das integrinas com o substrato depende de cátions divalentes como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , sendo que o tipo de cátion pode influenciar a afinidade e a especificidade da ligação integrina-ligante (RICHARD, 1987).

Os domínios citoplasmáticos da integrina se ligam a feixes de filamentos de actina. Esta ligação parece importante para ligar as células à matriz. A ligação entre

a integrina e o citoesqueleto, parece ser um requisito importante tanto para adesão célula-célula como para célula-matriz (SOLOWSKA, 1989).

A interação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto é recíproca, no sentido que os filamentos de actina intracelulares podem influenciar a orientação das moléculas de fibronectina secretadas. Estas interações recíprocas entre a fibronectina extracelular e os filamentos de actina são mediadas principalmente pelas integrinas (SARITA et al., 1993). Vias de sinalização intracelulares podem ativar ou inativar as integrinas. A fosforilação de uma serina na cauda citoplasmática da integrina $\beta 1$ durante a mitose em cultura de células, prejudica a capacidade da integrina ligar-se à fibronectina, o que provavelmente explica por que estas células tornam-se arredondadas e desgrudam-se do substrato durante a mitose (RICHARD, 1992). O comportamento celular, polaridade, forma, movimento, metabolismo e desenvolvimento, são mediadas por integrinas (JULIANO, 1993).

MEC especializadas como as lâminas basais, possuem funções importantes. Estas além de atuarem como filtros moleculares, possuem funções reguladoras sobre as células, são capazes de determinar a polaridade celular, influenciar o metabolismo, organizar as proteínas nas membranas plasmáticas adjacentes, induzir a diferenciação celular e também auxiliar na migração celular (JOSHUA et al., 1990). As cadeias de colágeno tipo IV são ligadas formando dímeros através do domínio C-terminal. Esta ligação forma uma malha pela associação lateral entre os domínios N-terminal estabilizando a armação poligonal. Outras ligações cruzadas covalentes e pontes dissulfeto ajudam a estabilizar estas ligações (YURCHENCO et al., 1990; SADAYUKI, 1989). Em epitélios simples e endotélio, as células estão em contato

com a lâmina basal pela superfície basal e com lume pela superfície apical. Em epitélios estratificados, somente algumas células estão em contato direto com a lâmina basal. Apesar da composição exata ser bastante variável entre os tecidos e mesmo entre diferentes regiões da mesma lâmina, a maioria contém colágeno do tipo IV, sulfato de heparam, perlecan, e as glicoproteínas laminina e entactina.

Componentes de Matriz Extracelular de Tendão

Os tendões, segundo descrições anatômicas, são estruturas brancas e brilhantes formadas por fibras altamente resistentes que interconectam ossos e músculos. Já descrições histológicas descrevem como estruturas ricas em fibras colágenas, proporcionando ao tendão grande resistência a tração.

Observando sua estrutura, esta simplicidade aparente é descartada, não sendo surpreendente, pois as propriedades biomecânicas dos tendões revelados por experimentos biomecânicos, mostram que além da resistência a tração eles possuem grande flexibilidade, resistência e uma certa elasticidade (KUIST et al., 1991; OTTANI et al., 2001).

Os tendões possuem particularidades que os difere dos ligamentos. Eles possuem uma extremidade ligada ao osso e outra ligada ao músculo, enquanto em ligamentos as duas extremidades estão ligadas em ossos. Os tendões podem se prender também em cápsulas articulares, cartilagens, septos intermusculares, derme e em outros tendões (DÂNGELO and FATTINI, 1995). No caso da cauda de rato, os tendões se originam dos músculos sacrocaudal dorsal lateral e sacrocaudal ventral

lateral, e se inserem nas últimas vértebras caudais, auxiliando na sustentação da cauda e na sua movimentação, embora reduzida. A tração transmitida por estes tendões é relativamente pequena se comparada com a observada nos tendões flexores.

Uma das particularidades dos tendões é sua capacidade de transmitir a força motora gerada pela fibra muscular para o osso, sendo que as unidades musculares possuem um revestimento de tecido conjuntivo que parece ligar de forma contínua aos elementos fibrilares do tendão. Esta região é conhecida como região mio-tendinosa. Os componentes fibrilares colagênicos parecem estar associados à superfície das fibras musculares, transmitindo os movimentos de contração. Desta forma, o tendão recebe toda carga dividida pelo músculo que é então transferido para o osso. A região mio-tendinosa é composta de fibrilas de colágeno e células musculares. As fibrilas de colágeno no tendão, inserem-se na lâmina basal das células musculares. Desta forma as superfícies de contato entre as fibrilas do tendão e as células musculares são grandemente aumentada (KUIST et al., 1991). A região mio-tendinosa possui ainda inúmeras fibrilas com pequenos diâmetros. Esta região chamada de microtendão seria o local frágil onde ocorrem lesões causadas em exercícios físicos (SWADISON, 1991).

Os tendões são envolvidos por estruturas em forma de cápsula de tecido conjuntivo. Esta estrutura é chamada de epitendíneo. Além desse, existe uma outra bainha que aprofunda-se entre os feixes de fibrilas. Este é chamado de endotendíneo. O epitendíneo acima citado, em alguns tendões podem ainda ser envolvido pelo paratendíneo. Quando o tendão sofre mudança de direção, ocorre um

aumento na fricção, necessitando de lubrificação extra. Neste caso, o paratendíneo pode-se dividir em duas camadas: a visceral e a parietal. Entre elas existe um espaço conhecido por mesotendíneo, que é preenchido por um fluído semelhante ao líquido sinovial (ELLIOT, 1965; MERRILEES and FLINT, 1980).

No rabo de rato, os tendões se organizam em quatro grupos simetricamente dispostos ao redor das vértebras caudais. O paratendíneo envolve externamente estes grupos de tendões. Cada um destes quatro grupos de tendões são envoltos pelo epidendíneo. Esta bainha possui grande quantidade de vasos sangüíneos e nervos, especialmente nas regiões de trabéculas. Cada tendão possui uma bainha com arranjo regular que distingue do epitendíneo (o peritendíneo). Cada fascículo de tendão é revestido ainda por uma estrutura regular distinta do peritendíneo chamado de endotendíneo (STROCCHI, 1985).

As células responsáveis pela formação do tendão são alongadas e dispostas paralelamente aos feixes de colágeno. Elas possuem citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e um complexo de Golgi bem desenvolvido. Estas células quando maduras são chamadas de tendinócitos e são semelhantes aos fibroblastos (O'BRIEN, 1997).

Tendões que contornam uma articulação, desenvolve uma metaplasia fibrocartilaginosa. Esta estrutura é caracterizada pela presença de depósitos de PGs. Nesta região de articulação o tendão sofre forças de compressão e fricção além de transmitir as forças de tração geradas pelo músculo (VOGEL and KOOB, 1989; BENJAMIN and EVANS, 1990; EVANKO and VOGEL, 1990). Nestes locais, as

fibras colágenas e os proteoglicanos podem exhibir arranjos diferentes que dependem da ação de diferentes forças biomecânicas (CARVALHO and VIDAL, 1994).

Os tendões são caracterizados pela presença de grande quantidade de matriz extracelular constituída de 80-95% de colágeno e 3% de PGs. As moléculas de colágeno estão arranjadas em fibras e feixes de fibras e se dispõem paralelamente ao maior eixo do tendão, (VIDAL, 1970; NIMNI and HARKNESS, 1988). Morfologicamente, os tendões podem variar na forma e no tamanho, podendo ser achatados ou cilíndricos (O'BRIEN, 1997). Além dos componentes fibrilares, a MEC dos tendões é formada por proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas (PNC).

A maior parte da massa de elementos fibrilares do tendão é constituída de colágeno do tipo I, podendo atingir 90% do seu peso seco, (VIDAL and CARVALHO, 1990). São encontrados também colágenos associados a fibrilas como o colágeno tipo VI e XII (MAYNE et al., 1993). O colágeno tipo VI atuaria como adaptador conectando elementos da matriz extracelular com as células (PAULSSON et al., 1987). Os colágenos tipo IV – X, XII - XIX fazem parte da classe FACIT (colágenos associados as fibrilas com tríplice hélice interrompidas), são encontrados em tendões de fetos. Os colágenos dos tipos IX, XII, XVI e XIX não formam estruturas supramoleculares entre si, mas se integram a fibras heteropoliméricas (LIU et al., 1998). Os tipos XII e XIV estão relacionadas diretamente com a função biomecânica, agindo como transdutores de energia, transformando energia mecânica em sinais capazes de estimular os fibroblastos a modularem o arranjo molecular do ambiente extracelular (VIDAL, 1996; VIDAL, 1969; VIDAL, 1985).

Analisando a ultraestrutura do tendão podemos observar níveis de organização crescentes. Três cadeias α se alinham formando uma fina e alongada estrutura de ≈ 15 Å de diâmetro chamada de molécula de colágeno, que se agrupam formando filamentos de microfibrilas de diâmetro em torno de 35 Å. Estas microfibrilas ainda se ligam para formar uma sub-fibrila de 150 Å de diâmetro. As sub-fibrilas se agrupam formando uma fibrila de tendão com um diâmetro de 500 a 5000 Å. Esta fibrila se agrupa formando um fascículo de tendão que por sua vez se agrupa formando o tendão com diâmetro entre 100 e 500 μm (KASTELIC et al., 1978).

Os fascículos de tendão possuem uma organização característica chamada de "crimp". O "crimp" ou estrutura ondulada (EOD) revela que o tendão não é meramente uma estrutura inerte. A complexidade dos tendões pode ser revelada pela simples observação de um corte histológico não corado de tendão à microscopia de polarização. Estas estruturas posicionadas a 45° em relação ao plano de luz polarizada, revelam uma ordenação molecular específica e única, devido a organização das moléculas de colágeno do tipo I (VIDAL, 1995 ; VIDAL, 1980 ; VIDAL and MELLO, 1984; KASTELIC et al., 1980; KASTELIC et al., 1978).

Existem diferentes padrões de "crimp". Estes podem ser mais retos ou ondulados (O'BRIEN, 1997). Podem ainda exibir um padrão regular sinusoidal com uma periodicidade e amplitude que pode ser própria para uma determinada região do tendão. O "crimp" mostra mudança constante na direção dos elementos fibrilares (AULT, 1992). Esta variabilidade morfológica, sugere uma diferenciação funcional ao longo da região de tração e isto poderia ser atribuído tanto a diferentes propriedades

biomecânicas como também ao grau com que as diferentes zonas se acomodam no estado de repouso (CARVALHO and VIDAL, 1994).

Através de análises de dispersão da birrefringência e do dicroísmo linear pode ser observado que as moléculas de PGs não se encontram distribuídas ao acaso, mas orientadas e possivelmente associadas às moléculas de colágeno. O esqueleto protéico central dos PGs está inclinado em relação ao maior eixo dos feixes de colágeno, sendo que as cadeias laterais de GAGs estariam dispostas paralelamente ao mesmo eixo. (VIDAL et al., 1975; VIDAL, 1984),

As interações específicas que ocorrem entre as fibrilas de colágeno e os proteoglicanos, estão envolvidas no comportamento do tendão submetido a tração. Em tendão de cauda de rato adulto foram encontrados dermatam sulfato, e em tendão de cauda de rato fetal, foram encontrados principalmente condroitim sulfato e ácido hialurônico interagindo com o colágeno (SCOTT and ORFORD, 1981) Em tendões da cauda de ratos recém nascidos foram encontrados PGs contendo dermatam sulfato (SCOTT and ORFORD, 1981), mais tarde a presença de grandes e pequenos PGs foram encontrados em tendões bovinos adultos (VOGEL and HEINEGÅRD, 1985). Tais interações ocorrem através do esqueleto protéico central do PG, ao qual está ligada covalentemente no mínimo uma cadeia lateral de GAG, (ASUNDI et al., 1992; HASCAL and KIMURA, 1982; HEINEGÅRD and OLDBERG, 1989; RUOSLAHTI and YAMAGUCHI, 1991).

Além dos grandes PGs, existe ainda um grupo classificado como pequenos PGs. Os pequenos proteoglicanos presentes nos tendões podem inibir o crescimento radial por agregação das moléculas de colágeno ou fusão das fibrilas

através de interferências com o “cross-linking”. Análises bioquímicas destes componentes indicam que estes proteoglicanos possuem uma massa molecular de aproximadamente 100.000 Da (SCOTT et al., 1981; HEINEGÅRD et al., 1985; OLDBERG et al., 1990). Essas moléculas foram batizadas de decorim e biglicam e foram primeiramente descritos em cartilagens e tendões bovinos. O decorim e o biglicam são proteoglicanos com “core” protéicos homólogos e ricos em leucina, a principal diferença entre ambos é a presença de uma cadeia de GAG no decorim e de duas no biglicam. O decorim foi inicialmente purificado de osso, (HOCKING et al., 1998), cartilagem articular de boi, (ROSENBERG et al., 1985; HEINEGÅRD et al., 1986; FISCHER et al., 1989), tendão bovino adulto, (VOGEL and HEINEGÅRD, 1985).

O decorim é capaz de se ligar às fibrilas de colágeno e inibir a progressão da fibrilogenese *in vitro*, sendo que o biglicam não interage com colágeno e fica disperso nos espaços entre as fibras (VOGEL, 1984 ; WEBER et al., 1996). O decorim é assim chamado porque decora as fibrilas de colágeno de um modo bem característico (SCOTT and ORFORD, 1981). Evidências ultraestruturais indicam que as moléculas de decorim representam um papel importante na orientação e organização das fibrilas de colágeno, auxiliando na manutenção da forma do tecido (SCOTT, 1988). Recentemente foi constatado que o decorim se liga em um sítio da região C – terminal do colágeno I, justamente em um local onde estão os principais sítios de ligação cruzada intermolecular em colágenos heterotriméricos (KEENE et al., 2000). É proposto que o proteoglicano decorim é um ligante entre duas moléculas de colágeno na fibrila, ajudando a estabilizar as fibrilas e controlar a

fibrilogênese (SCOTT, 1988). O modelo sugerido por WEBER e colaboradores (1996), da estrutura de decorim, tem uma forma de arco com uma única cadeia de glicosaminoglicanos e três oligossacarídeos N-ligados localizados no mesmo lado da molécula. O decorim é ligado na seqüência polar do colágeno tipo I fundido na banda d. A superfície interna côncava está apropriada em tamanho e forma para acomodar somente uma tripla hélice de colágeno de $\cong 3$ nm de diâmetro (WEBER et al., 1996).

É proposto que a ligação de uma tripla hélice de colágeno no decorim, tenha uma função importante na formação e na organização das moléculas de colágeno dentro das microfibrilas regulando a fusão lateral das moléculas de colágeno (WEBER et al., 1996). Através de estudos *in vitro* foi demonstrado que o decorim inibe a associação lateral de moléculas de colágeno, controlando o diâmetro da fibrila, (VOGEL, 1987 ; SCOTT et al., 1981; HEDBOM et al., 1989). O decorim não está simplesmente envolvido com a fibrilogênese do colágeno *in vivo* (BIRK, 1995), mas também ele modula a atividade do fator de crescimento TGF- β participando dessa forma da regulação do crescimento celular (VISSER et al., 1994; WEBER, 1996; SINI et al., 1997; SCHONHERR et al., 1998).

No entanto o papel funcional do decorim não é totalmente conhecido. A localização do decorim, indica que ele facilita a interação das fibrilas de colágeno entre si, ou com componentes não fibrilares da matriz do tecido, ou ainda um papel estrutural, formando um limite exterior mantendo a integridade individual das fibrilas de colágeno (BROWN, 1989). Em estudos anteriores, o pequeno proteoglicano de tendão bovino, mas não grande proteoglicano de cartilagem bovina, retarda a fibrilogenese de colágeno tipo I e resulta em fibrilas de colágeno de diâmetro

reduzido (BROWN, 1989). A associação entre estes pequenos proteoglicanos e fibrilas de colágeno e a capacidade desta ligação em impedir ou retardar a formação de fibrilas, fez com que alguns autores atribuíssem ao decorim e ao fibromodulim a capacidade de modular a fibrilogênese (SCOTT et al., 1981). Por outro lado, alguns autores observaram um aumento no diâmetro das fibrilas (GARG et al., 1989; ULDBJERG et al., 1988). Estes resultados contraditórios revelam a sensibilidade da fibrilogênese "in vitro", fatores como pH, temperatura, força iônica e diferença na preparação de colágeno e ou proteoglicanos podem interferir nos resultados (COMPER et al., 1977; WILLIAMS, et al., 1978). Tecidos ricos em DS - PG apresentam fibrilas de grande diâmetro (KUC and SCOTT, 1997). É possível que o estresse tensional "in vivo" estimule as células a secretar proporcionalmente mais DS - PG, com isso favoreceria à agregação lateral das fibrilas de colágeno exibindo fibrilas de diâmetro aumentado, o que favoreceria o tecido à resistir as forças de tração (KUC and SCOTT, 1997).

O fibromodulim por sua vez, possui uma proteína central de aproximadamente 48 kDa, ao qual estão ligados quatro cadeias de queratam sulfato e também possui várias tirosinas sulfatadas na região N-terminal (HYNES, 1986; OLDBERG et al., 1989; PLAAS et al., 1990). Esta característica contribui para o caráter aniônico da molécula. O fibromodulim foi identificado primeiramente em cartilagem. Ele interage com o colágeno via esqueleto protéico, o que por si só pode afetar a fibrilogênese, não dependendo das cadeias de glicosaminoglicanos (HEDBOM et al., 1989).

Em tendões, o diâmetro das fibrilas de colágeno é extremamente variável, na verdade ocorrem variações entre os diferentes tendões em diferentes estados

fisiológicos e no mesmo tendão diferenças são observadas devido a presença de diferentes forças mecânicas a que estão sujeitos ao longo de seu trajeto. Vários fatores foram sugeridos no controle do diâmetro das fibrilas, entre eles a presença pequenos proteoglicanos capazes de modular a fibrilogênese como o decorim e o fibromodulim (VOGEL et al., 1984; VOGEL and TROTTER, 1987).

Os tendões de cauda de ratos jovens, possuem fibrilas de diâmetros menores do que os de ratos mais velhos, demonstrando que com o aumento da idade o diâmetro da fibrila também é aumentado (SCOTT, 1996).

Um dos mecanismos sugerido por VIDAL and CARVALHO (1990), é o tipo e a extensão de alguns dos processamentos pós-traducionais como as hidroxilações de resíduos de prolina e de lisina, a glicosilação dos resíduos de hidroxilisinas podem influenciar na capacidade de auto-agregação, na formação de ligações cruzadas, na capacidade de interações com outras moléculas e provavelmente no diâmetro final da fibrila.

Durante o desenvolvimento (ontogênese) de tendão de cauda de rato, há um aumento na resistência à tração durante os primeiros seis meses de vida pós-natal. Com respeito a alterações bioquímicas nas moléculas de colágeno durante a ontogênese, tem sido constatado que a taxa de formação de ligações cruzadas inter e intramolecular é intensa durante a maturação de tendão e continua mais tarde a uma taxa mais lenta (MOREIN et al., 1978).

As propriedades biomecânicas dos tendões são determinadas pelo grau de agregação e ordem molecular dos componentes da matriz e pela rica presença de fibras de colágeno (VILARTA and VIDAL, 1989). As interações entre os componentes

da MEC de tendão, os fatores que controlam a fibrilogênese de colágeno, bem como a função dos pequenos PGs são ainda pouco conhecidas. Muitos estudos têm demonstrado que tendões sujeitos a diferentes forças mecânicas, são capazes de se adaptar às diferentes situações biomecânicas.

Mudanças nos tipos e intensidades de forças mecânicas sobre os tendões, afetam as propriedades mecânicas daqueles tecidos, provavelmente devido à alterações na ordem molecular e agregação das moléculas de colágeno (VILARTA and VIDAL, 1989).

OBJETIVO GERAL

Identificar alterações bioquímicas e estruturais da (MEC) de tendão de cauda de rato sujeito a forças periódicas de tração.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito de forças de tração sobre a quantidade de proteínas não colagênicas e glicosaminoglicanos.

Analisar o perfil eletroforético dos principais componentes extraídos, com especial atenção para os proteoglicanos de baixo massa molecular.

Verificar se existe alguma alteração na celularidade e organização da (MEC) nos dois casos experimentais.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, S.S.; COLONNA, G. and EDELHOCH, H.. The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin. *J. Biol. Chem.* 254: 1501-1505, 1979.
- ASUNDI, V.K. and DREHER, K.L.. Molecular Characterization of Vascular Smooth muscle decorin: deduced core protein structure and regulation of gene expression. *Eur. J. Cell. Biol.*, 59: 315-321, 1992.
- AULT, N.K.; HOFFMAN, A. H.. A composite micromechanical model for connective tissues: Part I – Theory. *J Biomech Eng.* 114: 137-141, 1992.
- AULT, N.K.; HOFFMAN, A. H.. A composite micromechanical model for connective tissues: Part II – Application to rat tail tendon and joint capsule. *J Biomech Eng.* 114: 137-141, 1992.
- BALIAN, G.; CLICK, E.M.;CROUCH, E. DAVIDSON, J. and BORNSTEIN, P.. Isolation of a collagen binding fragment from fibronectin and cold-insoluble globulin. *J. Biol. Chem.* 254: 1429-1432, 1979.
- BENJAMIN, M. & EVANS, E.J.. Fibrocartilage. *J. Anat.* 171: 1-15, 1990.

- BIRK, D.E.; NURMINSKAYA, M.V.; ZYCBAND, E.I.. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segmets undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev. Dyn.* 202: 229-243, 1995.
- BROWN, D.C.; VOGEL, K.. Characteristics of the In Vitro Interaction of a Small Proteoglycan (PG II) of Bovine Tendon with Type I Collagen. *Matrix.* 9: 468-478, 1989.
- BROWN, N.H.. Integrins hold Drosophila together. *Bioessays.* 15:383-390, 1993.
- BUCK, C.A.; HORWITZ, A.F.. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:179-205,1987.
- BURKE, R.D.. Distribution of fibrillin I in extracellular matrix and epithelia during early development of avian embryos. *Anat. Embryol (Berl).* 201: 317-326, 2000.
- CARDINALE, G. J. and UDENFRIEND, S.. Prolyl hydroxylase. *Adv. Enzymol.* 41:245-300, 1974.
- CARVALHO, H.F. and VIDAL, B.C.. Structure and histochemistry of a pressure-bearing tendon of the frog. *Annals Anat.* 176:161-170, 1994.

- CLEARY, E.G.; GIBSON, M.A.. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 10:97-209, 1983.
- COMPER, W D.; VEIS, A .. Characterization of nuclei in *in vitro* collagen fibril formation. *Biopolymers.* 16: 2133-2142, 1977.
- DÂNGELO, J. G. J., and FATTINI, C. A.. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 2ª ed. Atheneu, p. 44, 1995.
- DARRIBÉRE, I. and SCHWARZBAUER, J.E.. Fibronectin matrix composition can regulate cell migration during amphibian development. *Mech. Dev.* 92: 239-250, 2000.
- ELLIOT DH. Structure and flinction of mammalian tendons. *Biol Ver.* 40: 392-421 1965.
- ERICKSON, H.P. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:869-876, 1993.
- EVANKO, S. P. and VOGEL, K. G.. Ultrastructure na proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix*, 10: 420-436, 1990.

EYRE, D.R.; PAZ, M.A.; GALLOP, P.M. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu. Rev. Biochem.* 53:717-748, 1984.

FISCHER, L. W.; TERMINE, J. D.; YOUNG, M.F. Deduced protein sequence of bone samll proteoglycan I (Biglycan) shows homology with protoglycan II (Decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J. Biol. Chem.* 264: 4571-4576, 1989.

GARG, A K.;BERG, R A .; SILVER, F H.. Effect of proteoglycans on Type I collagen fiber formation. *Biomaterials.* 10: 413-419, 1989.

GRANT, M.E. and PROCKOP, D.J. The biosynthesis of collagen. *N. Engl. J. Med.* 286: 194-199, 242-249,291-300, 1972.

HAM, A.W. and CORMACK, D.H. Histologia. 9ª ed. *Editores Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, 1991.

HASCALL V, KIMURA E.. Proteoglycans isolation and characterization. *Methods in Enzzmatology.* 82: 769-800, 1982.

HAY, E.D., ed. Cell Biology of Extracellular Matrix. 2nd ed. New York: *Plenum Press*, 1991.

HEDBOM, E.; ANTONSSON, P.; HJERPE, A.; AESCHLIMANN, D.; PAULSSON, M.; PIMENTEL, E.R.; SOMMARIN, Y.; WENDEL, M.; OLDBERG, A. and HEINEGÅRD, D.. Cartilage Matrix Proteins: Na acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *The J. of Biological Chemistry*. 267: 6132-6136, 1992.

HEDBOM, E.; HEINERGÅRD, D.. Interaction of a 59 kDa Connective Tissue Matrix Protein with Collagen I and Collagen II. *J. Biol. Chem.* 264: 6898-6905, 1989.

HEINEGÅRD, D.; WIESLANDER, J.; SHEEHAN, J.; PAULSSON, M.; SOMMARIN, Y.. Separation and characterization of two populations of aggregation proteoglycans from cartilage. *Biochem. J.* 225: 95-106, 1985.

HEINEGÅRD, D.; OLDBERG, A.; ANTONSSON, P. and HEDBOM, E.. Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. *Biochemical Society Transactions*. 18: 789-792, 1990.

HEINEGÅRD D, OLDBERG A.. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB*. 33: 2042-2051, 1989.

HEINEGÅRD D, LARSSON SOMMARIN Y, FRANZEN A, PAULSSON M, HEDBOM B.. Two novel proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. *Biol Chem*. 261:13866-13872, 1986.

- HOCKING AM, SHINOMURA T, MCQUILLAN DJ.. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 17: 1-19, 1998.
- HYNES, R.O. Fibronectins. *Sci Am.* 254 (6):42-51, 1986.
- HYNES, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48:549-554, 1987.
- JACKSON, R.L.; BUSCH, S.J.; CARDIN, A.D.. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 71: 481-539, 1991.
- JILEK, F. and HÖRMANN, H.. Fibronectin (cold-insoluble globulin). VI. Influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of native collagen, Hoppe-Seyler's. *Z. Physiol. Chem.* 360: 597-603, 1979.
- JOSHUA, R.S.; ENGVALL, E.; BUTKOWSKI, R. and HUNTER, D.D.. Molecular Heterogeneity of Basal Laminae: Isoforms of Laminin and Collagen IV at the Neuromuscular Junction and Elsewhere. *The Journal of Cell Biology.* 111: 1685-1699, 1990.
- JULIANO, R.L. and HASKILL, S.. Signal Transduction from the Extracellular Matrix. *The Journal of Cell Biology.* 120: 577-585, 1993.

KASTELIC, J.; PALLEY, I.; BAER, E.. A Structural Mechanical Model for Tendon Grimping. *J. of Biomechanics*. 13: 887-893, 1980.

KASTELIC, J.; PALLEY, I.; BAER, E.. The Multicomposite Ultrastructure of Tendon. *Conn. Tissue. Res.* 6: 11-23, 1978.

KEENE DR, SAN ANTONIO JD, MAYNE R, MCQUILLAN DJ, SALRIS G, SANTORO S and LOZZO RV.. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem*. 275: (29) 2000.

KJELLÉN, L. and LINDAHL, U.. Proteoglycans: Structures and interactions. *Annu. Ver. Biochem*. 60: 443-475, 1991.

KUC, I.M.; SCOTT, P.G.. Increase diameters of collagen fibrils precipitad *in vitro* in the presence of decorin from various connective tissues. *Conn. Tiss. Res.* 36 (4): 287-296, 1997.

KUIST, M.; JÓZSA, L.; KANNUS, P.; VIENO, T.; JÄRVINEN, M.; LEHTO, M..Sructure and macromolecular composition of the myotendineal junction. *Histochemical immunohistochemical and electron microscopc study of the rat calt muscle*. 39: 287-297, 1991.

- KWAN, A.P.L.; CUMMING, S.; CHAPMAN, J.A. and GRANT, M.E. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J. Cell. Biol.* 114: 597-604, 1991.
- MAYNE, R.; BREWTON, R.G.. New Members of the Collagen Superfamily. *Current Opinion in Cell Biology.* 5: 883-890, 1993.
- MERRILES, M.D.; FLINT, M.H.. Ultrastructural study of Tension and Pressure Zones in a Rabbit Flexor Tendon. *Am. J. Anat.* 157: 87-106, 1980.
- MOREIN, G.; GOLDGEFTER, L.; KOBLYANSKY, E.; GOLDSCHMIDT-NATHAN, M.; NATHAN, H.. Changes in the Mechanical Properties of Rat Tail Tendon During Post Natal Ontogenesis. *Anat. Embryol.* 154: 121-124, 1978.
- NIMNI ME, HARKAESS RD.. Molecular structures and functions of collagen. *In: Nimni ME, Collagen vol.1: Biochemistry Boca Raton CRC Press.* 1988.
- O'BRIEN M.. Structure and metabolism of tendons. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 7: 55-61, 1997.
- OLDBERG A, ANTONSSON P, LINDBLOM K, HEINEGARD D. 1989. A collagen-binding 59 kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-SI and PG-52 (decorin). *EMBO J.* 8 (9): 2601-2604.

OTTANI, V.; RASPANTI, M.; RUGGERI, A.. Collagen structure and functional implications. *Micron*. 32: 251-260,2001.

PAULSSON, M.; YURCHENCO, P.D.; RUBEN, G.C.; ENGEL, J.; TRIMPL, R.. Structure of Low Dencity Heparan Sulfate Proteoglycan Isolated from a Mouse Tumor Basement membrane. *J. Mol. Biol.* 197: 297-313, 1987.

PERKINS, M.E.; JI, T.H. and HYNES, R.O.. Cross-linking of fibronectin to sulfated proteoglycans at the cell surface. *Cell*. 16: 941-952, 1979.

PLAAS AHK, NEAME PJ, NIVENS CM, REISS L.. Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *J Biol Chem*. 265 (33): 20634-20640, 1990.

PREHM, P.. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.* 220: 597-600, 1984.

RAMIREZ, F.; PEREIRA, L; ZHANG, H.; LEE, B. The fibrillin marfan syndrome connection. *Bioessays*. 15:589-594, 1993.

REDDI, A. H.; SAMPATH, T.K.. Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation. *J Cell Biol*. 98:(6) 2192-2197, 1984.

RICHARD, O.H.. A Family of Cell Surface Receptors. *Cell*. 48: 549-554, 1987.

RICHARD, O.H.. Integrins: Versatility, Modulation and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*. 69: 11-25, 1992.

ROSEMBERG LC, CHOI HV, TANG LH, JOHSON TL, PAL S.. Isolation of dermatan sulphate proteoglycans from mature bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 260: 6304-6313, 1985.

RUOSLAHTI, E.; ENGVALL, E.. Complexing of fibronectin glycosaminoglycans and collagen. *Biochim. Biophys. Acta* 631: 350-358, 1980.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-497, 1987.

RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 64:867-869, 1991.

SADAYUKI, I.. Ultraestructure of Basement Membranes. *International Review of Cytology*. 117: 57-98, 1989.

- SAKAI, L.Y.; KEENE, D.R. and ENGVALL, E.. Fibrillin, A new 350-kD Glycoprotein, Is a Component of Extracellular Microfibrils. *The Journal of Cell Biology*. 103: 2499-2509, 1986.
- SARITA, K..Integrin Cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra-and intracellular initiated transmembrane signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 5: 819-831, 1993.
- SCHOFIELD, J.D.; FREEMAN, I.L. and JACKSON, D.S.. The isolation and amino acid and carbohydrate composition of polymeric collagens prepared from various human tissues. *Biochem. J.* 124: 467-473, 1971.
- SCHWARZBAUER, J.E. Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *Bioessays*. 13:527-533, 1991.
- SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R.. Dermatan Suphate-rich Proteoglycan Associates with Rat Tail Tendon Collagen at the d Band in the Gap Region. *Biochemical Journal*. 197: 213-216, 1981.
- SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R.; HUGHES, E.W.. Proteoglycan – Collagen arrangements in developing Rat Tail Tendon. *Biochemical Journal*. 195: 573-581, 1981.

- SCOTT, J.E.. Proteodermatan and Proteokeratan sulfate (Decorin, Lumican / Fibromodulin) Proteins are Horseshoe Shaped. Implications for Their Interactions With Collagen. *Biochemistry*. 35: 8795-8799, 1996.
- SCOTT, J.E.. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.* 252: 313-323, 1988.
- SCOTT, J.E.. Supramolecular Organization of Extracellular matrix Glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB. J.* 6:2639-2645, 1992.
- SOLOWSKA, J. et al.. Expression of normal and mutant integrin subunits in rodent cells. *J. Cell Biol.* 109:853-861, 1989.
- SCHONHERR, E.; BROSZAT, M.; BRANDAN, E.; BRUCKNER, P. and KRESSE, H.. Decorin core protein fragment leu 155-val 260 interacts with TGF- but does not compete for decorin binding to type I collagen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 355:241-248, 1998.
- SINI, P.; DENTI, A; TIRA, M.; BALDUINI C.. EGCI role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen. *Glycoconj. J.* 14: 871-874, 1997.
- STROCCHI, R.; LEONARD, L.; GUIZZARDI, S.; MARCHINI, M.; RUGGERI, A.. Ultrastructural Aspects of Rat Toil Tendon Sheaths. *J. Anat.* 140: 57-67, 1985.

- SWADISON, S.; MAYNE, R.. In Vitro Attachment of Skeletal Muscle Fibers to a Collagen Gel Duplicate the Structure of the Myotendinous Junction. *Exp Cell Res.* 193: 227-231, 1991.
- TRAIK, T.M.. Interaction of tropoelastin with the amino-terminal domains of fibrilin-2 suggests a role for the fibrillins in elastic fiber assembly. *J. Biol. Chem.* 275:(32) 24400-24406, 2000.
- ULDBJERG, N.; DANIELSEN, C C.. A study of the interaction *in vitro* between Type I collagen and a small dermatan sulphate proteoglycan. *Biochem. J.* 251: 643-648, 1988.
- VAN DER REST, M.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5:2814-2823, 1991.
- VIDAL BC.. Collagen bundle regulation and control. *Revta Bras Pesqui Med Biol* 2: 356-359, 1969.
- VIDAL BC. Dichroism on collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Annals Histochem.* 115: 289-296. 1970.

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

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

VIDAL, B. C.and MELLO, M.L.S.. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell. Mol. Biol.*, 30: (3) 195-204, 1984.

VIDAL BC.. Extracellular matrix organization: Hypothetical role for cancer growth and metastatization. Conference in the Michigan Cancer Foundation. 1985.

VIDAL, B.C. A matriz extracelular. In: VIDAL, B.C. and MELLO, M.L.S. (eds) *Biologia Celular. Livraria Atheneu, São Paulo*, p. 273-303, 1987.

VIDAL, B.C.; CARVALHO, H.F.. Aggregational State and Molecular Order of Tendons as a Function of Age. *Matrix.* 10: 48-57, 1990.

VIDAL, B.C.. "crimp" as Part of a Helical Structure. *C.R. Acad. SCI Paris, Science de la vie.* 318:173-178, 1995.

VIDAL, B.C..Image Analysis of the Tendons Helical Superstructure using Interference and Polarized Light Microscopy. Submetido à publicação, 2002.

VIIDIK, A.. Functional Properties of Collagenous Tissues. *Int. Rev. Connect Tissue Res.* 6: 127-215, 1973.

VILARTA R, VIDAL BC.. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix.* 9: 55-61, 1989.

VISSER NA, VANKAMPEN GP JOS, DEKONING MHMT, VANDERKORST JK.. The effects of loading on the synthesis of biglycan and decorin in intact mature articular cartilage in vitro. *Connect Tissue Res* 30: 241-250, 1994.

VOGEL, K.G. and HEINEGÅRD, D.. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J. Biol. Chem.* 260: 9298-9306, 1985.

VOGEL, K. G. and KOOB, T. J.. Structural specialization in tendon under compression. *Int. Ver. Cytol.*, 115: 267-293, 1989.

VOGEL, K.G.; PAULSSON, M.; HEINEGÅRD, D.. Specific inhibition of Type I and Type II Collagen Fibrillogenesis by the Small Proteoglycan of Tendon. *Biochemistry Journal.* 223: 587-597, 1984.

- VOGEL, K.G.; TROTTER, J.A.. The effect of Proteoglycan on the Morphology of Collagen Fibrils Formed In Vitro. *Coll. Relat. Res.* 7: 105-140, 1987.
- WAGNER, D.D. and HYNES, R.O.. Domain structure of fibronectin and its relation to function. *J. Biol. Chem.* 254: 6746-6754, 1979.
- WEBER, I.T.; HARRISON, R.W.; IOZZO, R.V.. Model Structure of Decorin and implications for Collagen Fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry.* 271: 31767-31770, 1996.
- WILLIAMS, B R.; GELMAN, R A .; POPPKE, D C.; PIEZ, G A ..Collagen fibril formation. *J. Biol. Chem.* 253: 6578-6585, 1978.
- YAMADA, K.M.; SCHLESINGER, D.H.; KENNEDY, D.W. and PASTAN, I. Characterization of a major fibroblast cell surface glycoprotein. *Biochemistry.* 16: 5552-5559, 1977.
- YURCHENCO, P.D. and SCHITTNY, J.C..Molecular architectures of basement membranes. *FASEB. J.* 4: 1577-1590, 1990.

ARTIGO

ESTUDO BIOQUÍMICO E ESTRUTURAL DE TENDÃO DE CAUDA DE RATO SUBMETIDO A FORÇAS PERIÓDICAS DE TRAÇÃO

RESUMO

Os tendões possuem funções importantes relacionadas com a transmissão das forças de tração geradas nos músculos a par de manter as relações morfo-estruturais e suas funções músculo-esqueléticas. No caso da cauda de rato os músculos sacrocaudal dorsal lateral e sacrocaudal ventral lateral transmitem as forças de tração aos tendões da cauda, que se inserem nas últimas vértebras caudais, auxiliando na sustentação da cauda e na sua movimentação, embora reduzida. Devido a baixa força de tração que estes tendões sofrem em relação aos tendões flexores, os primeiros são um ótimo modelo experimental para estudo dos efeitos de força de tração. O objetivo deste trabalho foi analisar a organização estrutural e a composição da matriz extracelular de tendões submetidos a forças adicionais de tração. Para tal, foram analisados tendões de cauda de ratos suspensos e ratos controle, através da análise bioquímica dos componentes da matriz, e através da análise morfológica utilizando microscopia de luz normal e polarizada e microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado uma maior concentração de proteínas não colagênicas em tendões suspensos em relação ao grupo controle. A análise eletroforética mostrou a presença de dois componente que podem representar os proteoglicanos fibromodulim e decorim, este último, no caso dos tendões suspensos, migra mais rapidamente em gel de SDS-poliacrilamida, em

relação ao controle. Isso pode ser devido a uma diminuição no comprimento da cadeia do GAG, o que poderia permitir uma maior compactação das fibrilas colagênicas. Este aumento na compactação das fibrilas colagênicas, foi refletido nas medidas de birrefringência e também no aumento de área das secções transversas das fibrilas quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. A presença de fibrilas mais espessas nos tendões suspensos, permite a estes, suportar um aumento de carga tensional. As análises morfológicas também revelaram um aumento na intensidade do dicroísmo nos tendões suspensos, devido a uma distribuição mais alinhada das moléculas do Ponceau SS e consequentemente das moléculas de colágeno nos tendões mantidos sob tração. Neste trabalho, mais uma vez o aspecto indutor das forças biomecânicas sobre a modulação da matriz extracelular foi comprovado.

INTRODUÇÃO

Os tendões são estruturas adaptadas a resistir às forças de tração geradas pela contração do músculo. São constituídos por células e uma extensa matriz extracelular (MEC), formado por proteoglicanos, proteínas não colagênicas (PNC) que representam cerca de 3% e principalmente colágeno do tipo I, que representam mais de 90% do peso seco e estão arrançados em fibras e feixes de fibras, dispendo-se paralelamente ao maior eixo do tendão (VIDAL, 1970; NIMNI and HARKNESS, 1988; O'BRIEN, 1997; VIDAL and CARVALHO, 1990; LIU et al., 1995), o que é responsável pelas propriedades biomecânicas como flexibilidade, resistência e uma certa elasticidade dos tendões (VOGEL and KOOB, 1989; BIRK et al., 1989; VIDAL and CARVALHO, 1990; MILZ et al., 1998; KUIST et al., 1991). Na matriz extracelular do tendão, entre os feixes de colágeno são encontrados tendinócitos com núcleos achatados e fibroblastos com núcleos alongados, responsáveis pela intensa atividade na síntese de macromoléculas da matriz extracelular (O'BRIEN, 1997; ROSS et al., 1995; HAM, 1991.). Os tendões que contornam articulações, estão submetidos a tensão somado a compressão. Neste locais, desenvolve uma estrutura semelhante a uma fibrocartilagem, caracterizada pela presença de depósitos de proteoglicanos (VOGEL and KOOB, 1989; BENJAMIN and EVANS, 1990; EVANKO and VOGEL, 1990). As moléculas de colágeno interagem entre si formando as fibrilas, enquanto estas, interagem com PG e PNC, permitindo uma organização funcional da matriz. Entre os componentes não colagênicos encontrados na matriz de tendão, é preciso ressaltar as presenças de Agrecan (VOGEL et al.,

1994), e principalmente pequenos PG ou proteoglicanos de baixa massa molecular como o decorim (DEC), o fibromodulim (FM) e o biglicam. O DEC e o FM provavelmente regulam a fibrillogênese das moléculas de colágeno e/ou participam na ordem molecular das fibrilas, o que está de acordo com os achados de que remoção enzimática de glicosaminoglicanos reduz a birrefringência de tendão (VIDAL, 1964; SCOTT et al., 1981; HEDLUND et al., 1994; VOGEL et al., 1986; BROWN and VOGEL, 1989). As propriedades biomecânicas dos tendões estão relacionadas com a orientação das fibrilas e feixes de fibrilas de colágeno, com o diâmetro dessas fibrilas, bem como ao seu grau de organização e ordem molecular (VIDAL and CARVALHO, 1990; BIRK et al., 1989; VILARTA and VIDAL, 1989). Desta forma, as fibrilas são elementos responsáveis pela resistência de um tendão, e a eficiência deste mecanismo depende do direcionamento paralelo destes elementos com a direção das forças à que estão sujeitas (HUKINS and ASPDEN, 1985). Os feixes de colágeno em repouso apresentam arranjos regulares e sinuosos denominados de "crimp" (KASTELIC et al., 1978). O "crimp" representa uma estrutura morfofuncional do tendão capaz de reduzir o impacto de uma força de tração sobre o osso onde o tendão se insere e no próprio tendão. Estudos anteriores, realizados com tendão de cauda de rato, "in vitro", mostraram que durante a aplicação de uma força de tração leva ao desaparecimento ou modificação no padrão de "crimp", como resultado do alongamento das fibras (GATHERCOLE, 1991). "In situ" o estresse físico ao qual a fibra é submetida, também causa mudança no comprimento do "crimp" (DIAMANT et al., 1972; O'BRIEN, 1992; O'BRIEN, 1997). Os mecanismos de modulação que determinam a readaptação de um tecido frente

às mudanças biomecânicas principalmente relacionadas com a presença maior ou menor de forças de tração, e como as células respondem àquelas mudanças, ainda restam ser esclarecidas. Neste trabalho, nosso objetivo foi estudar as alterações de ordem molecular da matriz extracelular e organização estrutural do tendão, bem como aspectos bioquímicos da MEC de um tendão submetido à forças periódicas de tração.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos wistar, com 60 dias de idade. Os ratos (N= 4), foram suspensos pela cauda, que ficava presa por um dispositivo no topo da gaiola, de modo que o animal tivesse mobilidade de 360°, e apoiasse as patas dianteiras no piso da gaiola, como relatado no trabalho de Winiarski e colaboradores (1987). A gaiola foi construída de forma que o animal ficasse distante das paredes laterais, para evitar que houvesse apoio das patas trazeiras. O dispositivo que prendia a cauda na gaiola foi construído com espuma e fita adesiva dupla face, de forma a permitir a livre circulação de sangue. Os animais do experimento (animais suspensos) foram mantidos suspensos como indicado acima, durante oito horas seguidas por dia, durante trinta dias. Os animais controle foram mantidos em gaiolas semelhantes em mesmas condições ambientais. Os animais foram sacrificados com aplicação intra-peritonial de 0,5 ml de hidrato de cloral 10%.

Análise Bioquímica

1. Extração dos componentes da matriz extracelular do tendão.

Os tendões foram devidamente dissociados em uma placa de petri sobre gelo moído para diminuir o risco de proteólise. Após rápida lavagem em (PBS NaCl 0,15 M em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 com EDTA 50 mM), o material foi secado com papel de filtro e pesado. Quantidades de 1,09 g foram submetidos a extração com 50 volumes de cloreto de guanidina (GnHCl) 4 M contendo 0,05 M EDTA, 1mM de PMSF em tampão Acetato 0,05M pH 5.8. A extração foi durante 24 horas, com temperatura de 4° C em constante agitação. Após este tempo, o material foi centrifugado em 20.000 r.p.m., durante 60 minutos, a 4° C em centrífuga Beckman J2-21 (Rotor JA-20). O sobrenadante contendo o material extraído em GnHCl, foi filtrado em Intertela e concentrado por centrifugação em tubo Centriplus de forma que seu volume ficou reduzido a $\frac{1}{3}$ do volume inicial. A centrifugação foi em centrífuga Beckman J2-21 (Rotor JA-20).

2. Dosagens

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de BRADFORD, (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G 250. Como padrão foram empregadas diferentes soluções de albumina bovina (BSA), nas concentrações: 10; 20; 40; 80;

100; $\mu\text{g/ml}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da HP em 596 nm.

As dosagens de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) foram realizadas usando DMMB (Azul de Dimetil Metileno) (FARNDAL et al., 1986). Diferentes concentrações de condroitim sulfato foram usadas como padrão. As leituras absorciométricas foram efetuadas em espectrofotômetro 8452 A Diode Array da HP em 526 nm.

3. Fracionamento do extrato total

Os extratos de tendão de animais suspensos e controle foram fracionados em resina de troca iônica de dietilaminoetil – sephacel (DEAE-sephacel). A coluna de DEAE medindo 4 x 1,5 cm, foi equilibrada com uréia 7 M em tampão acetado de sódio 0,05 M pH 6,0. Amostras do extrato contendo aproximadamente 1,628 mg de proteínas totais, foram dialisadas contra uréia 7 M em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 6,0 e aplicados sobre a coluna. O tampão uréia acetato foi usado durante toda cromatografia. O material não ligado à resina de DEAE foi eluído com tampão.

Proteínas ligadas à resina foram eluídas com a aplicação de um gradiente de NaCl de 0,1 à 1,0 M contendo o mesmo tampão acima. Para garantir que todos os componentes tenham sido eluídos da coluna, foi aplicado uma solução de NaCl 1.5 M. Foram coletadas frações com aproximadamente 2,7 ml cada. A eluição de proteína foi monitorada por absorbância em 280 nm em espectrofotômetro 8452 A

Diode Array da HP e a condutividade elétrica determinada (Condutivímetro HI 8819 N).

4. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

As frações obtidas na cromatografia foram analisadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE). Gradiente (4-16%) de poliacrilamida foi usado segundo o método de ZINGALES, (1984), com algumas modificações. O sistema tampão foi de acordo com LAEMMILI, (1970), com gel de empacotamento contendo 3,5 % de acrilamida. Amostras de 50 a 300 μ l (3X 100 μ l) das frações de cromatografia dos diferentes extratos foram precipitados em solução de 100 e 50 μ l de tampão acetato de sódio 0,5 e 1 M pH 7,4 respectivamente, e 9 volumes de etanol, durante 24 horas à 4° C. As centrifugações foram realizadas em microcentrífuga Fischer Scientific Model 235 Va 8.000, a 9.000 r.p.m. por 5 minutos. O precipitado obtido foi secado em 37° C e ressuspendido em tampão de amostra contendo Tris HCl 62,5 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, EDTA 1 mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01 %. As amostras foram incubadas por 5 minutos em 96 ° C. O tampão utilizado nas cubas de eletroforese foi Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1 % em pH 6,8. A corrente elétrica aplicada foi de 30 mA durante 4 horas. Os padrões de peso molecular empregados foram: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (64 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), α -lactoalbumina (14,4 kDa). Para o padrão de colágeno, foi empregado o colágeno tipo I extraído de tendão de cauda de rato. Após a corrida o gel foi fixado

em metanol 50 %, ácido acético 12 % durante 1 hora, e em seguida corado por Coomassie Brilliant Blue-R (CBB-R-250), 0,25 % , 50 % de metanol e 7 % de ácido acético. O gel foi descorado utilizando 50 % de metanol e 10 % ácido acético.

As massas moleculares relativas, foram deduzidas por cálculo de regressão linear de marcador de peso molecular. (KLAUS and OSBORN, 1969).

5. Eletroforese em Gel de Agarose (0.5-1.0%)

Gel de agarose (0.5-1.0%) em tampão 0.05 M de propileno diamino (PDA) foi preparado conforme (DIETRICH and DIETRICH, 1976). Amostras de 100 µl das frações eluídas da coluna de DEAE – sephacel, contendo componentes polidispersos, foram precipitados em solução alcoólica como descrito anteriormente. O precipitado foi β eliminado utilizando 150 µl de NaOH 0,5 N por 19 horas a 4° C. (BEELEY, 1985). O sobrenadante (β eliminado) contendo as cadeias de GAGs, foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto por no mínimo 7 horas, sendo então centrifugado. O precipitado, foi lavado duas vezes, em etanol 80% (2 volumes), e logo em seguida, em acetona (2 volumes) (MICHELACCI and HORTON, 1989). Algumas amostras foram digeridas com condroitinase.

6. Digestão Enzimática

Foram utilizadas condroitinases ABC e AC da SEIKAGAKU. Para a digestão por condroitinase ABC foram empregados 40UI/g de proteína, em tampão contendo

30 mM de acetato de sódio, 100 mM de Tris e 10 mM de EDTA em pH 8,0. No caso da digestão por condroitinase AC, foram utilizados 40 UI/g de proteínas, em tampão contendo 100 mM de acetato de sódio, 100 mM de Tris e 10 mM de EDTA em pH 6,0 (BEELEY, 1985). A digestão ocorreu durante 6 horas à 37°C. Após a digestão, as amostras foram precipitadas e ressuspensas em 5 µl de água milliQ, aplicando-se 5 µl no gel de agarose. Os padrões empregados, foram 5 µl de uma mistura de condroitim sulfato e dermatam sulfato e heparam sulfato (1 mg/ml). Azul de bromofenol foi usado como corante de frente. O tampão utilizado na cuba de eletroforese foi propileno diamino (PDA) 0,05 M. A corrente aplicada foi de 100 mA durante 20 minutos. Após a corrida eletroforética, os GAGs foram fixados em solução de Cetavlon, (Cetiltrimetilamonibrometo) por no mínimo 4 horas, como descrito em DIETRICH and DIETRICH (1976); DIETRICH et al., (1977). A coloração foi feita utilizando corante Azul de Toluidina 0,1 % em etanol 50 % e ácido acético 1 % durante 5 minutos. A descoloração foi em etanol 50 % e ácido acético 1 %. A lâmina foi seca sob calor e ventilação, e coberta com uma tira de papel Whatman, embebido em Cetavlon 0,1 % (DIETRICH and DIETRICH, 1976; DIETRICH et al., 1977).

7 - Análise Morfológica

Microscopia de luz e de polarização

Após a dissecação, os tendões das caudas submetidas à forças periódicas de tração e caudas controle foram fixados em solução de formol 4% em tampão Millionig pH 7,4 durante 24 h em temperatura ambiente. Em seguida as peças foram lavadas em tampão, desidratadas em banhos de álcool, seguido de diafanização com banhos de xilol e incluído em ParaplastTM (Merck). Para uma visualização geral do tecido alguns cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (Kiernan, 1981). Para observação dos feixes de colágeno, foi usada coloração por Ponceau SS 0,025 % em solução de ácido acético 1 %, durante 1 minuto (VIDAL, 1999). Para detecção de proteoglicanos, foi utilizado Azul de Toluidina 0,025 % em tampão Mc Ilvaine pH 4.0. As lâminas foram deixadas no corante por 30 minutos, lavadas no próprio tampão e colocadas para secar ao ar.

Cortes dos tendões, corados e não corados com Ponceau SS, foram analisados em microscopia de polarização para se avaliar a ordem molecular dos feixes de colágeno nos tendões de animais suspensos e animais controle. As medidas de birrefringência foram feitas por dois métodos: i) medidas feitas pelo método de Senarmont usando um compensador $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda, i.e. $\lambda = 546$ nm (VIDAL, 1986) e ii) medidas do brilho da birrefringência das bandas do "crimp" por meio de analisador de imagem, transformando o brilho em valores de cinza médio (VIDAL, 2001, informação pessoal). Os seguintes parâmetros foram

medidos por análise de imagem: áreas das bandas do "crimp" em micrômetros quadrados, diâmetro mínimo e máximo e entropia. A entropia foi analisada a partir da fórmula $S = K \ln Z$, onde S é o valor da entropia, K a constante de Boltzman e Z a quantidade de informação em bits, relativas a determinada imagem (RAWN, 1989). As medidas por análise de imagem foram feitas com microscópio Axiophot provido de analisador de imagem Kontrol 400. O dicroísmo linear, foi determinado pela diferença de absorção de luz polarizada por tendões corados com Ponceau SS, que estavam dispostos em posição paralela ($A_{||}$) e perpendicular (A_{\perp}) ao plano de luz polarizada. As medidas foram feitas por analisador de imagem (VIDAL, 2001 and 2002). Para estas observações o analisador foi removido e o polarizador mantido acoplado ao condensador (VIDAL, 1970).

Ultra-estrutura

Tendões de cauda de ratos suspensos e controle, foram fixados em solução de glutaraldeído 2% e ácido tânico 0,1 % dissolvidos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,3 durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida o material foi lavado no tampão e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% durante 1 h a 4° C. Após esta etapa os fragmentos foram lavados em salina glicosada e tratados em acetato de uranila 1% por 18 h à 4° C e por fim lavados novamente em salina glicosada e desidratados. Para detecção de PG, alguns cortes foram tratados com corante básico azul de cuprolínic (SCOTT, 1980; SCOTT et al., 1989). Após a fixação as peças foram desidratadas em série crescente de concentração de etanol, o material

foi submetido a dupla passagem pelo óxido de propileno. Após este procedimento, foram embebidos em misturas de óxido de propileno/resina epon (1:1 ; 1:2 e pura) e, finalmente, incluídas em moldes plásticos e deixados na estufa para polimerização da resina. Foram realizados cortes transversais e longitudinais. Os cortes semi-finos foram realizados com navalha de vidro e os cortes ultrafinos com navalha de diamante em ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica). Os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 2% em água e com citrato de chumbo a 2% em NaOH 0,1 N (REYNOLDS, 1963). As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906 Leica). As imagens obtidas, foram digitalizadas em "Scanner" de mesa marca Hewlett Packard. As imagens digitais de cortes transversais foram analisadas em programa tps Dig para medida do diâmetro e área dos feixes de colágeno.

8 – Análise Estatística

Para as análises de medida de birrefringência, entropia, diâmetro máximo e mínimo, foram utilizados teste de ANOVA e Mann-Whitney (Minitab-Release 11). No caso das medidas de dicroísmo foi utilizado teste ANOVA com distribuição de Fisher. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. Para análise de área de secção transversa das fibrilas, foi utilizado teste t. O teste de ANOVA e teste t, foram feitos com 5% de significância (Beiguelman, 1991).

RESULTADOS

1 - Análise Bioquímica

O material extraído em GuHCl foi utilizado para dosagens e para análise dos componentes da MEC dos tendões de animais suspensos e animais controle. Dosagens de proteínas dos tendões de animais controle e suspensos, revelou que neste último, a quantidade de proteínas foi maior (2,5 mg/g tecido) em relação aos animais controle (1,6 mg/g tecido). Não foram detectadas quantidades apropriadas de GAG sulfatado nos tendões estudados.

Análises dos fracionamentos mostrou que os dois materiais exibiam perfis cromatográficos com padrão semelhante, (Fig.1A, 1B). Amostras das frações eluídas foram analisadas por eletroforese em Gel de SDS poliacrilamida (SDS PAGE). Além da presença de colágeno, foram encontrados componentes com Mr de 28; 32; 54; 72; 86; 188; 346; 369 kDa e também um componente polidisperso com Mr entre 116 e 140 kDa, (Fig. 1C). No caso dos animais suspensos o padrão eletroforético foi semelhante, exceto para o componente polidisperso, que aparece migrando mais rápido, (Fig. 1D), quando se compara com o material do animal controle.

Análise em Gel de agarose dos glicosaminoglicanos presentes no componente polidisperso do material controle, revelou um único tipo de GAG migrando na mesma posição do dermatam sulfato (Figura 2). A digestão com condroitinases ABC/AC, confirmou que se trata de dermatam sulfato (Figura 2), pois a banda não aparece

após digestão com ABC, mas é detectada após digestão com condroitinase AC. A análise desse mesmo componente polidisperso no material dos animais suspensos, mostrou o mesmo padrão.

2 – Análise de microscopia de luz polarizada

Feixes de colágeno dos tendões orientados a 45 graus em relação aos polarizadores exibiram birrefringência aumentada quando corados pelo Ponceau SS. Estruturas onduladas (EOD "crimp") já eram observadas quando o longo eixo dos tendões estava orientado a 45 graus em relação aos polarizadores. Tendões submetidos à tração (tratados) tinham aspectos visuais, no que se refere às EOD, mais regulares e evidentes do que os tendões do grupo controle. A birrefringência foi mais intensa nos cortes dos animais tratados (Figura 3B), em relação aos não tratados (Fig. 3A). Valores da birrefringência, expressa em graus ou em cinza médio e os correspondentes valores de entropia, como medida da quantidade de bits obtidos por análise de imagem, confirmam as observações visuais. A Tabela I ilustra os valores de cinza médio e de entropia correspondente. O dicroísmo linear contém informações adicionais em termos de ordem molecular, identificado pelas diferenças de intensidade de cor do Ponceau SS quando os feixes de colágeno estão paralelos ou perpendiculares ao plano de luz polarizada. Uma maior absorbância de luz observou-se no caso dos tendões que estavam dispostos paralelamente (Fig. 3 C,E) ao plano de luz polarizada (PLP), em relação aos que estavam perpendiculares (Fig. 3 D,F). Comparando-se os cortes de tendão submetidos à tração e cortes de tendão

controle, um aspecto mais homogêneo e mais compactado foi observado no tendão tencionado (Fig 3 E, F), enquanto no tendão controle (Fig. 3 C,D), a distribuição dos componentes fibrosos não parece ser homogêneo, como aparece no material tencionado. Uma avaliação quantitativa dos valores de dicroísmo para os dois tendões estão exibidos na Tabela II.

Quanto aos parâmetros geométricos analisados, como diâmetros máximo e mínimo, e área do "crimp", foram encontrados valores mais altos nos tendões de animais suspensos (Tabela III), em relação aos controles. Também com relação à entropia, como medida da quantidade de "bits", foram encontrados valores maiores para o caso de tendões suspensos em relação ao controle, o que está em concordância com os maiores valores encontrados de área, diâmetros, e cinza médio ou birrefringência.

3 – Análise de microscopia eletrônica de transmissão

A análise das medidas de área em cortes transversais dos tendões controle e dos submetidos à forças periódicas de tração, revelou a presença de fibrilas mais espessas nos tendões dos animais suspensos do que a observada nos animais do grupo controle (Fig. 4). Também foi observado uma grande variabilidade de espessuras das fibrilas de colágeno, revelado pelo alto desvio padrão, mas as médias dos animais analisados foram proporcionalmente maiores para os animais do grupo suspenso do que para os animais controles (Fig. 4).

Observações em cortes longitudinais ao microscópio eletrônico, também mostraram diferenças em relação a espessura destas fibrilas, mas o que mais chamou a atenção foi a organização das fibrilas nos tendões de animais suspensos e de animais controle. Além disso nos animais controle, as fibrilas estão arranjadas em uma única direção, mas com aspecto entrelaçado, (Fig. 5 a, c), aparecendo em diferentes níveis do plano de corte. No caso dos tendões de animais suspensos, as fibrilas também estão arranjadas em uma só direção, mas não aparecem entrelaçadas como no controle (Fig. 5 b, d). Em observações com maior aumento é possível notar o aspecto filamentar da MEC entre duas células contíguas, (Fig. 5 c), embora não se possa descartar a possibilidade de ser um recesso da membrana plasmática do fibroblasto. As vesículas encontradas junto a membrana, (Fig. 5 d) podem ser de secreção ou de pinocitose.

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a ação de forças adicionais de tração, ocorridas periodicamente, resulta em um aumento na concentração de proteínas em geral, o que possivelmente tem relação com uma remodelação das fibrilas de colágeno, para que estas se adaptem às situações de maior carga tênsil, como foi o caso dos tendões caudais de ratos suspensos. Este aumento na concentração de proteínas também indica que com o aumento da força tensional, ocorre um aumento da capacidade sintética das células de tendões submetidos a tração em relação aos controles, que normalmente suportam menores forças de tração. Os dados aqui

apresentados confirmam resultados de outros estudos que também tem mostrado que o estímulo mecânico, seja por forças compressivas ou de tração, resultam em um aumento na atividade sintética por parte dos condrócitos ou fibroblastos (O'BRIEN, 1997). Este mesmo autor também afirma existir um aumento no "turnover" de moléculas de colágeno, concomitante ao estímulo mecânico.

As observações ultraestruturais, indicam que as fibrilas do tendão controle e do tendão suspenso aparecem todas alinhadas na mesma direção, mas no caso dos tendões suspensos aparecem arrançadas de forma mais paralela e menos entrelaçadas, em relação ao controle. Isso demonstra que a força de tração provoca um alinhamento das fibrilas de colágeno. Por outro lado quando se observa a imagem do tendão suspenso, usando microscópio de polarização com dois eixos de polarização cruzados, nota-se o aspecto de estrutura ondulada (EOD), o que não se observa no caso do tendão controle. Esta EOD equivaleria a uma adaptação do tendão para diminuir o impacto de forças de tração, devido a um alongamento ou deformação inicial do tendão.

A análise ultraestrutural realizada em cortes transversais de tendões controle e suspenso, mostrou que os tendões caudais dos animais submetidos a forças periódicas de tração se readaptam frente a estes estímulos. Esta adaptação relaciona-se diretamente com um aumento no diâmetro das fibrilas de colágeno em relação aos tendões de ratos não suspensos, conferindo desta forma uma maior resistência à tração. Alguns autores sugerem que as fibrilas de colágeno com diâmetros maiores estão mais adaptadas a resistir às forças de tração, devido ao fato de terem maior número de ligações cruzadas (PARRY et al., 1978). Outros indicam

que durante os processos de maturação e envelhecimento de feixes de colágeno “in vivo” e “in vitro”, o aumento da quantidade de ligações cruzadas coincide com a elevação dos valores de resistência à tração (DANIELSEN, 1981).

Muitos fatores estão envolvidos na formação de fibrilas, entre eles a própria estrutura e composição da molécula de colágeno já teria toda informação necessária para a formação de fibrilas (KUIVANIEMI et al., 1991). No entanto, elementos extrínsecos às moléculas de colágeno podem atuar na regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno. A intensidade da síntese de novas moléculas, é essencial para que as fibrilas possam se espessar e crescer em extensão (BRODSKY and EIKENBERRY, 1985; BRASS and BENSUSAN, 1976; MILLER, 1984). Outros fatores como, o grau de hidroxilação e glicosilação também são fatores importantes que podem estar interferindo na formação e na espessura das fibrilas, (BRASS and BENSUSAN, 1976; MILLER, 1984).

A presença de bandas nas posições correspondentes aos Mrs de 60 e 140 kDa, foi especialmente notável, e estas provavelmente representam os pequenos proteoglicanos fibromodulim e decorim. A análise eletroforética do gel de agarose, mostrou que o GAG do componente de 140 kDa, é o DS, o que sugere fortemente que a banda polidispersa que aparece no gel de SDS – poliacrilamida, é o decorim, pois as moléculas de decorim de tendão, contém DS, (CRIBB and SCOTT, 1995). Comparando-se os resultados de SDS-PAGE dos componentes nos dois casos experimentais, chamou a atenção, o comportamento nitidamente diferente do componente polidisperso de 140 kDa, que no caso do animal suspenso migrou como um componente de 116 kDa. Esta migração mais rápida deste componente que

provavelmente trata-se do decorim, poderia ser resultado de uma redução no tamanho de seu GAG (KUC and SCOTT, 1997). Outros dados a respeito do tamanho do decorim foram também observados em cultura de fragmentos de regiões de tendão bovino, sujeitas a diferentes forças mecânicas, onde as moléculas de decorim com menor M_r tinham cadeias mais curtas de DS (KOOB and VOGEL, 1987). Resultados semelhantes foram também encontrados em aorta (REGISTER and WAGNER, 1990). A significância fisiológica da redução do tamanho do GAG, no caso presente, DS, provavelmente esteja relacionada a uma maior compactação das fibrilas colagênicas, o que permitiria as fibrilas e as fibras de colágeno, suportarem aumentos de carga tensional. A ocorrência de fibrilas mais próximas umas das outras visando oferecer maior resistência aos tendões, estaria diretamente relacionada ao comprimento da cadeia de DS, que funcionaria como um espaçador entre as fibrilas de colágeno. As maiores áreas da secção transversa de fibrilas de ratos suspensos em relação aos ratos controle, possivelmente esteja diretamente relacionada com a redução do tamanho dos GAGs (SCOTT, 1996).

Em nosso trabalho mais uma vez fica demonstrado a relação entre a presença do decorim e a modulação da morfologia das fibrilas de colágeno que diretamente estão relacionados com as propriedades biomecânicas do tecido. Uma vez que tem sido demonstrado que este pequeno proteoglicano juntamente com o fibromodulim associam-se com o colágeno e que possivelmente estejam envolvidos com a modulação do diâmetro das fibrilas (HEDBOM and HEINEGÅRD, 1989; VOGEL et al., 1984; VOGEL and TROTTER, 1987).

As outras proteínas, igualmente detectadas nos tendões controle e suspenso, possivelmente tenham funções adesivas à superfície celular, ou funções interativas com os vários componentes de matriz. A semelhança nos padrões de bandas nos géis de animais controle e de animais suspensos, indicam que não houve hipóxia ou algum processo degenerativo do tecido durante o experimento.

A análise de microscopia de polarização revela que a birrefringência total observada em feixes de colágeno é causada de um lado pela birrefringência intrínseca devida à orientação e frequência de oscilação de todas as transições eletrônicas da molécula que constroem a fibra de colágeno, no caso a ligação peptídica que são planares, e por outro lado causada pela birrefringência textural ou de forma que depende da geometria molecular do colágeno, de seu volume parcial, ou seja, concentração do grau de agregação e/ou empacotamento das fibras (VIDAL, 1986a and VIDAL, 1986b, 2001). Várias estruturas compostas por colágeno são intensamente birrefringentes, mas não exibem extinção total quando posicionadas paralelamente a um dos planos de polarização, exibindo um bandado característico de faixas claras e faixas escuras, características do "crimp" (ELLIOT, 1965; VIIDIK, 1973; GATHERCOLE and KELLER, 1991). Em tendões de rato a birrefringência intrínseca ou cristalina corresponde a cerca de 16,3 % da birrefringência total (VIDAL, 1986a), nestes termos o aumento da birrefringência medida em água (birrefringência total) tem sua origem na birrefringência textural. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que nos animais suspensos há um maior grau de empacotamento fibrilar. Em animais suspensos, o achado de que há bandas do "crimp" com áreas e diâmetros maiores do que no controle, apoia a hipótese de que

deve haver maior concentração de fibrilas nos animais suspensos. Neste contexto deve ser considerado o fato de que o brilho das bandas, medido em valores de cinza médio, também é maior nos suspensos refletindo um maior grau de agregação e ordem molecular das fibrilas colagênicas, o que seria necessário para atender o aumento nas demandas biomecânicas.

A grande variabilidade das medidas de área, e mesmo de outros parâmetros, devem estar relacionadas com as variações nas direções das fibras de colágeno dentro dos feixes, pois não sendo o "crimp" uma mudança de direção no plano e sim em hélice, há maiores probabilidades de que nos cortes haja maiores variações na orientação das fibras, (VIDAL, 1985). Desta forma o aumento de diâmetro, fração volumétrica e compactação molecular dentro de cada fibra, são elementos importantes para a resistência do tecido que neste caso está submetido a aumento de intensidade de forças de tração.

De alguma forma a matriz extracelular juntamente com as células que a produzem são moduladas em resposta às ações biomecânicas a que o tecido foi submetido, fazendo com que haja além da síntese apropriada de novos componentes de matriz, também uma reorganização e redirecionamento destes elementos para devida reestruturação do tecido.

Figura 01. Cromatografia e eletroforese de tendões de ratos controle (A, C) e suspensos (B, D). Observar que o componente de 140 kDa, migra mais rápido no caso do tendão suspenso.

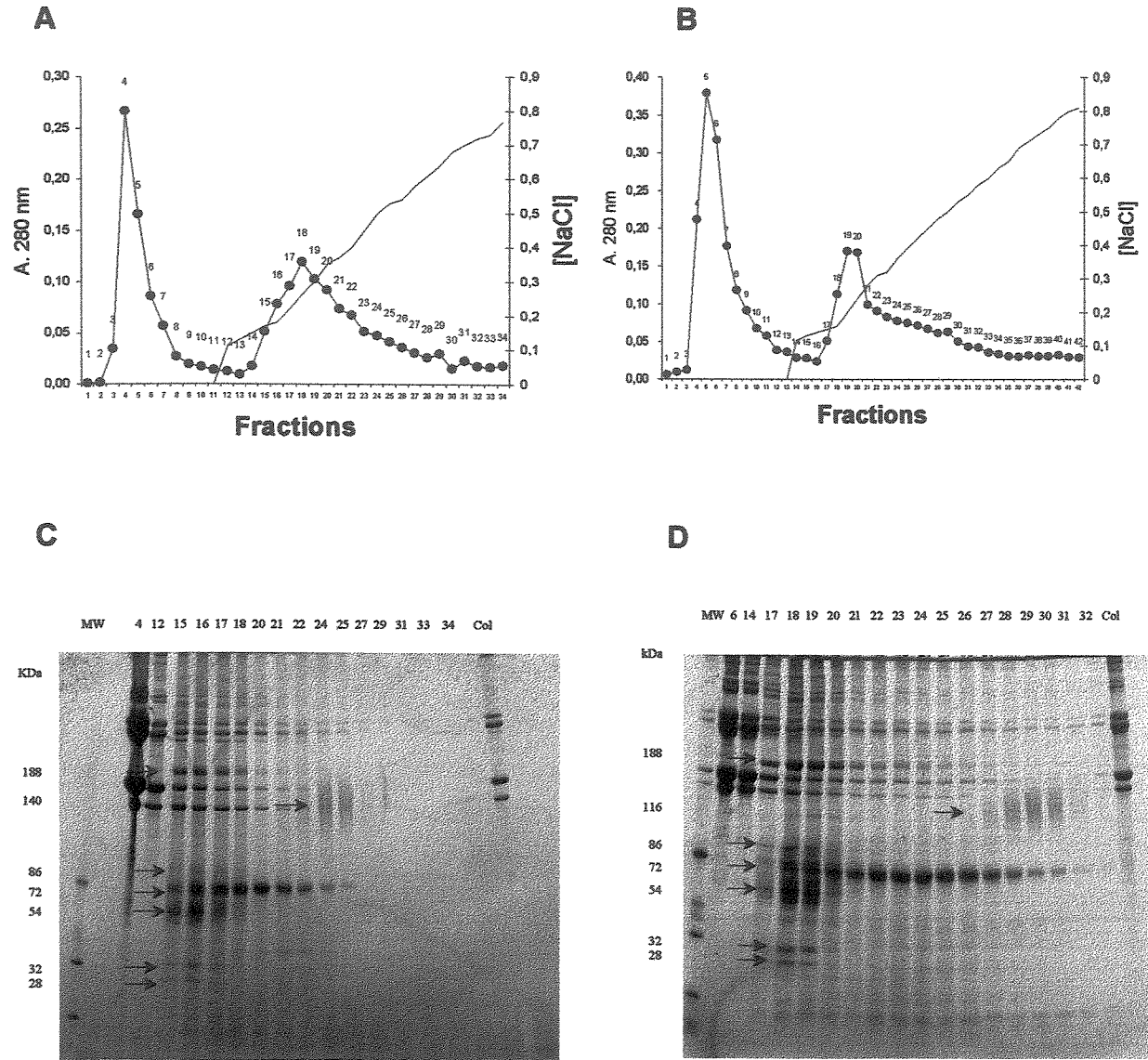


Figura 02. Gel de agarose de Glicosaminoglicano presente no componente polidisperso de 140 kDa do tendão controle (a), e 116 kDa do tendão suspenso (b). Condroitim sulfato (CS), Dermatom sulfato (DS) e Heparan sulfato (HS) foram utilizados como padrões ("slot"1). Amostras tratadas com condroitinase ABC foram completamente digeridas ("slot"3), mas não ocorreu digestão quando o tratamento foi com condroitinase AC ("slot"2). Slot 4 representa o Glicosaminoglicano não tratado com enzima.

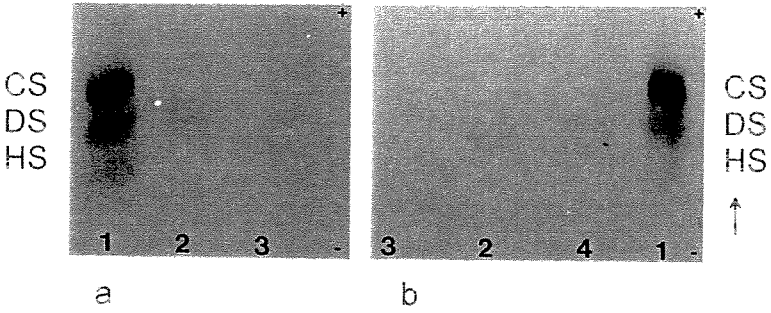


Fig. 03. – Imagens de tendão corado com Ponceau SS, obtida com microscopia de polarização. A, B - Birrefringência de tendão controle (A) e suspenso (B). Notar o aspecto mais ondulado neste último (B). C,D,E,F – Dicroísmo de tendão controle (C,D) e suspenso (E,F). Observar o dicroísmo que representa a diferença de absorção de luz quando o material está paralelo ($A_{||}$) e perpendicular (A_{\perp}) ao plano de luz polarizada, é mais intenso no caso de tendão suspenso (E, F) em comparação ao tendão controle. As barras equivalem a 25 μm .

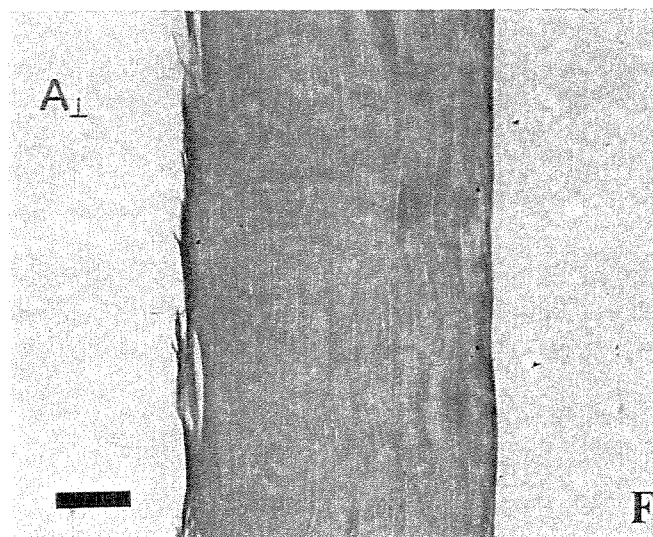
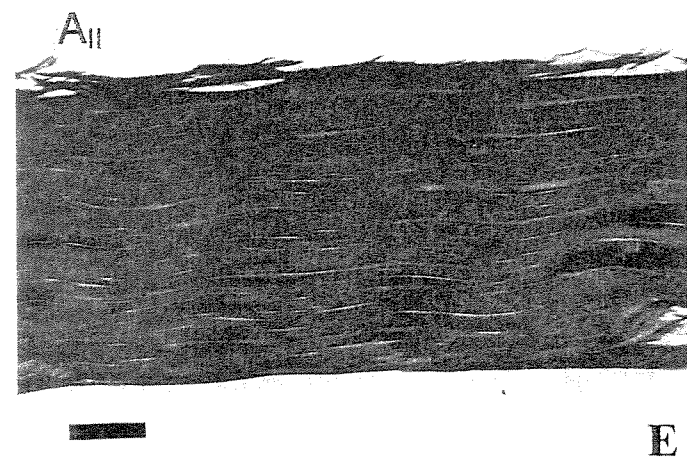
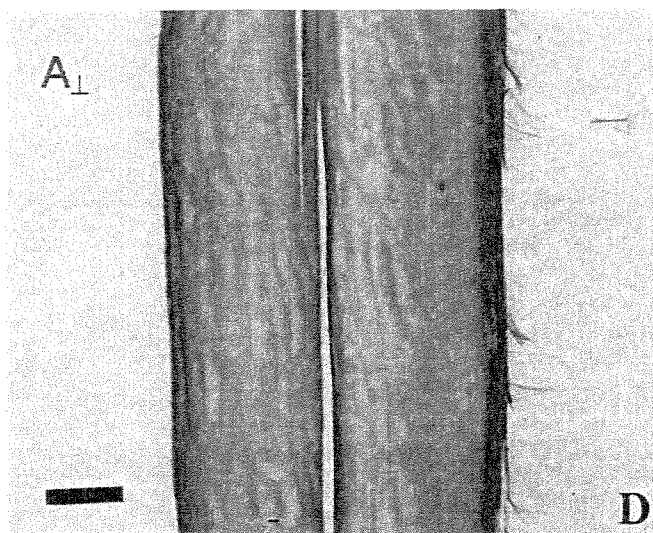
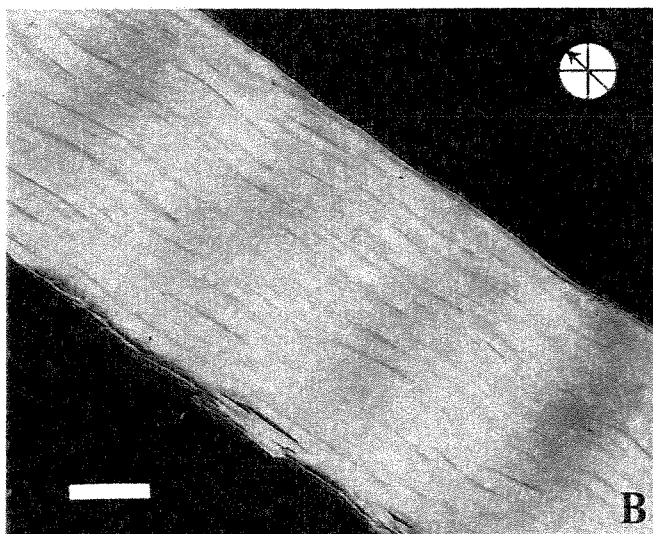
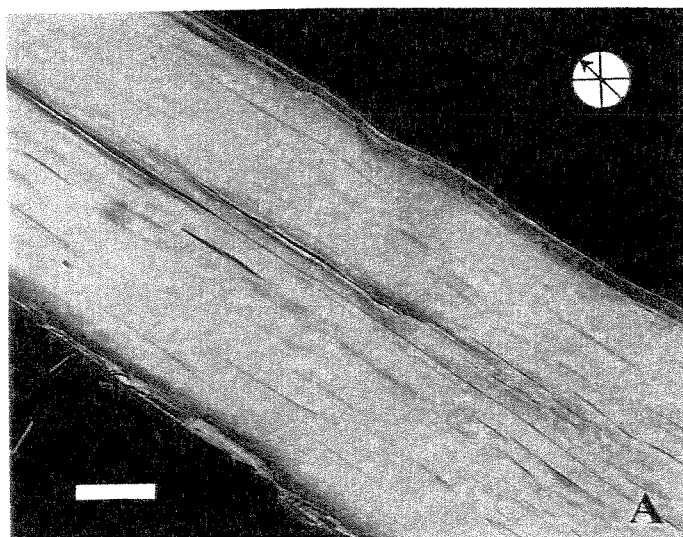


Tabela I Valores de cinza médio e entropia de "crimp" de animais controle e suspensos. Teste ANOVA*

Tendão	Cinza médio* Mediana	Entropia $\bar{X} \pm SD$
Controle (N=139)	69,60	4,125 \pm 1,964
Suspensão (N=83)	88,99	5,785 \pm 1,146

* Usando também teste de Mann-Whitney, os valores de cinza médio são diferentes ($W = 14127.0$; significância em 0,0031).

Tabela II - Valores de dicroísmo linear de tendões Controle e Suspensos

	N	Dicroísmo Linear $\bar{X} \pm SD$
Controle	39	0,2495 \pm 0,1097
Suspense	42	0,4177 \pm 0,2539

F= 14.58 p= 0.000 Teste de ANOVA

Tabela III - Valores de diâmetro máximo, mínimo e área, calculados a partir de análise de imagens de EOD.

Diâmetro Máximo (μm)		Diâmetro Mínimo (μm)		Área (μm^2)	
$\bar{X} \pm \text{SD}$		$\bar{X} \pm \text{SD}$		$\bar{X} \pm \text{SD}$	
Suspenso	Controle	Suspenso	Controle	Suspenso	Controle
N= 83	N= 139	N= 83	N= 139	N= 83	N= 139
182,81 \pm 68,55	140,92 \pm 87,71	60,92 \pm 12,41	54,92 \pm 17,35	5.132 \pm 4.852	3.306 \pm 4.359
F= 13,86		F=7,58		F=7,99	

Teste de ANOVA e Mann-Whitney

Figura 04. Micrografias eletrônicas de transmissão em cortes transversais de fibrilas de colágeno em tendão de cauda de rato controle (a), e suspenso (b). Observe o diâmetro nitidamente maior no caso das fibrilas de colágeno do animal suspenso. As barras nas duas micrografias equivalem a 1 μm . Teste $t = 7,004$ $\alpha = 0,05$.

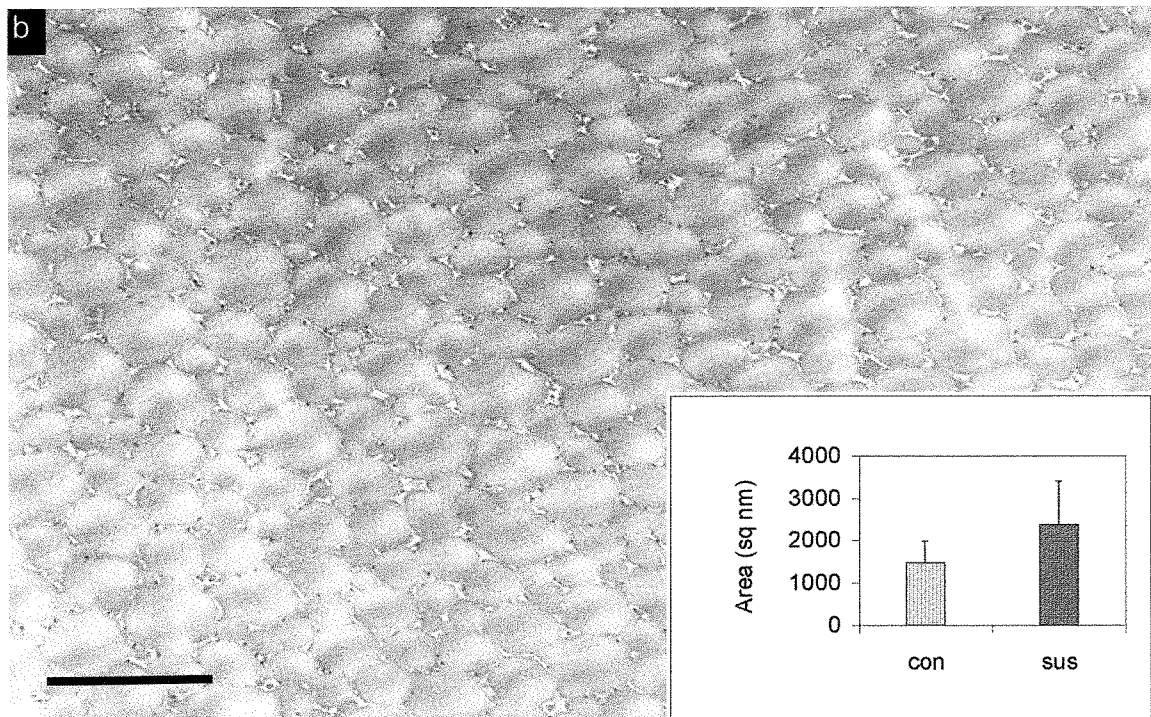
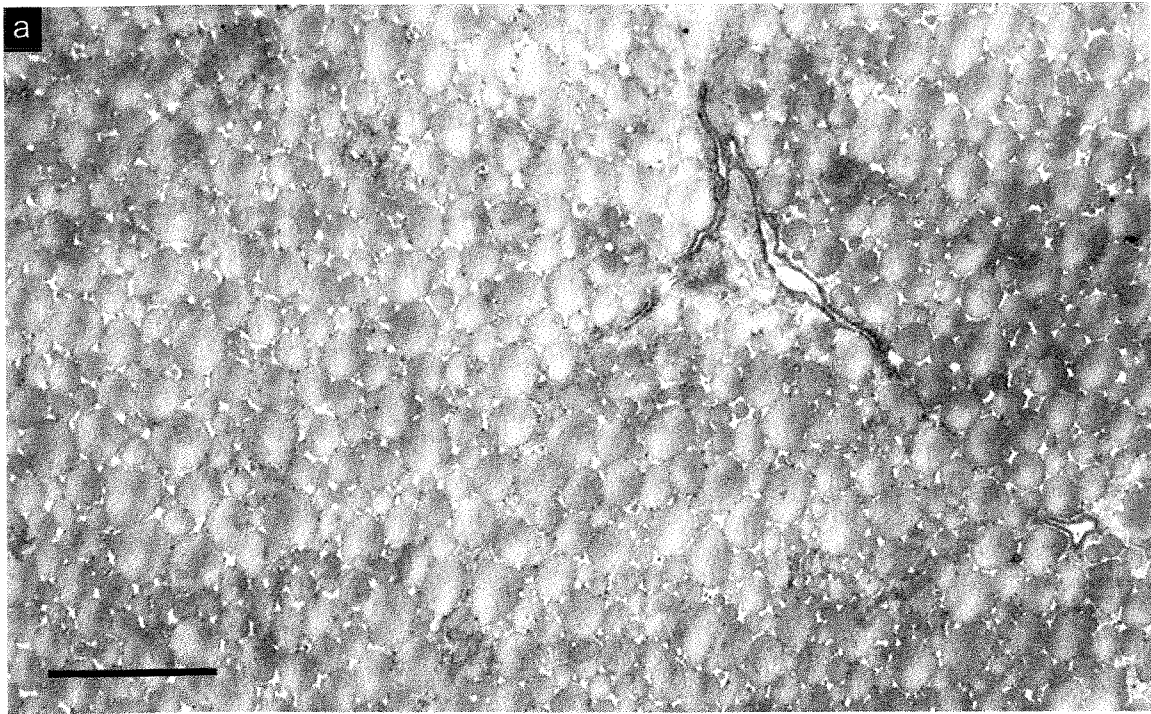
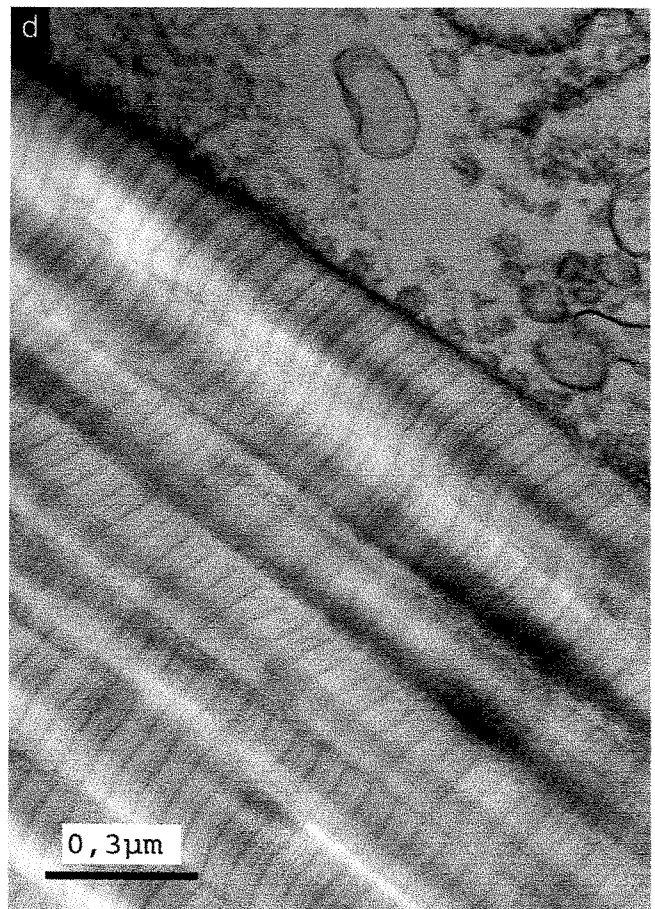
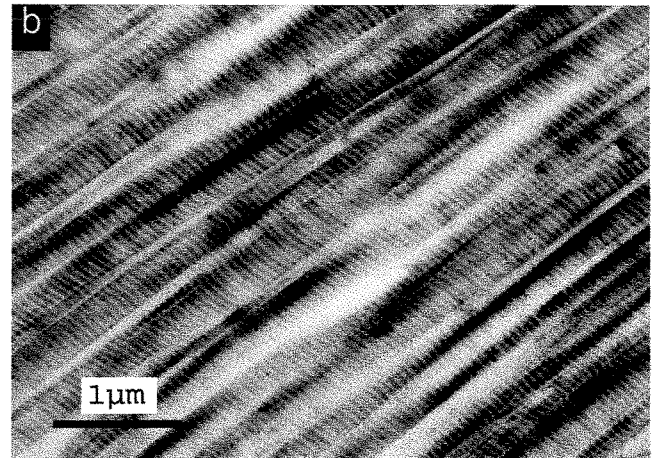
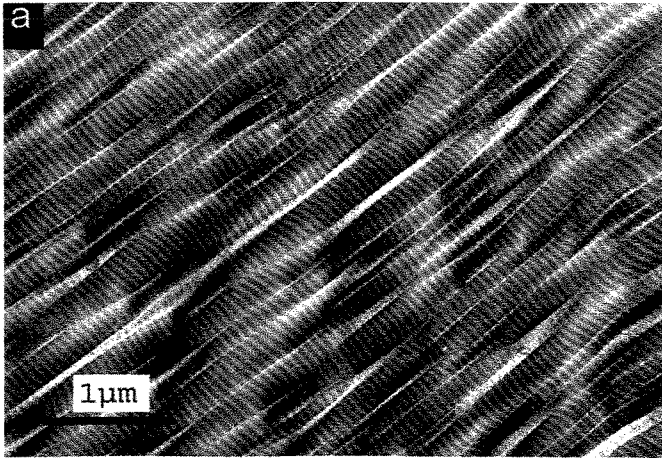


Figura 05. Micrografias eletrônicas de transmissão em cortes longitudinais de fibrilas de colágeno em tendão de cauda de rato controle (a,c), e suspenso (b,d).



REFERÊNCIAS

- BAILEY, A. J.; WOTTON, S.F.; SIMS, T.J.; THOMPSON, P.W.. Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 801-805, 1992.
- BEELEY, J. G.. Glycoprotein and proteoglycan techniques. *Elsevier*, New York, vol. 16, p.,. 268-270, 1985.
- BENJAMIN, M. and EVANS, E.J.. Fibrocartilage. *J. Anat.*, 171: 1-15, 1990.
- BIRK, D.E.; ZYCBAND, E.I.; WINKELMANN, D.A ;TRELSTAD, R.L.. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments are intermediates in matrix assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 4549-4553, 1989.
- BRADFORD, M.M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254, 1976.
- BRASS, L.F.; BENSUSAN, H.B.. On the role of the collagen carbohydrate residues in the platelet. Collagen interaction. *Biochim. Biophys Acta.* 444:1 43-52, 1976.

BRODSKY, B.; EIKENBERRY, E.. Supramolecular collagen assemblies. *Ann. NY Acad. Sci.* 460: 74-84, 1985.

BROWN, D.C.; VOGEL, K.. Characteristics of the In Vitro Interaction of a Small Proteoglycan (PG II) of Bovine Tendon with Type I Collagen. *Matrix.* 9: 468-478, 1989.

CRIBB, A.M.; SCOTT, J.E.. Tendon Response to Tensile Stress: na Ultrastructural investigation of Collagen: Proteoglycan Interactions in Stressed Tendon. *Journal Anat.* 187: 423-428, 1995.

DANIELSEN, C.C.. Mechanical properties of reconstituted collagen fibrils. *Connect. Tissue. Res.* 9: 51-57, 1981.

DIAMANT, J.; KELLER, A.; BAER, E.; LITT, M.; ARRIDGE, R.. Collagen structure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc. R. Soc. Lond.* B180: 293-315, 1972.

DIETRICH, C.P. and DIETRICH, S.M.C.. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.* 70: 645-647, 1976.

DIETRICH, C.P.; MCDUFFIE, N. M. and SAMPAIO, L. O..Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. *J. Chromat* 130: 299-304, 1977.

ELLIOT DH.. Structure and flinction of mammalian tendons. *Biol Ver* 40: 392-421, 1965.

EVANKO, S. P. and VOGEL, K. G.. Ultrastructure na proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix*, 10: 420-436, 1990.

FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.J. and BARRET, A.J.. Improved quantatition and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylenblue. *Biochim. Biophys. Acta*. 883: 173-177, 1986.

GATHERCOLE, L.J.; KELLER, A.. "crimp" Morphology in the Fibre Forming Collagen. *Matrix*. 11: 214-234, 1991.

HAM, A.W. and CORMACK, D.H. Histologia. 9ª ed. *Editora Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, 1991.

HEDBOM, E.; HEINERGARD, D.. Interaction of a 59 kDa Conective Tissue Matrix Protein with Collagen I and Collagen II. *J. Biol. Chem*. 264: 6898-6905, 1989.

- HEDLUND, H.; MENGARELLI-WIDHOLM, S. HEINEGÅRD, D.; REINHOLT, F.P.; SVENSSON, O..Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biol.* 14: 227-232, 1994.
- HUKINS, D.W.L. and ASPDEN, R.M. Composition and properties of connective tissues. *Tibs*, 10: 260-264, 1985.
- KASTELIC, J.; PALLEY, I.; BAER, E.. The Multicomposite Ultrastructure of Tendon. *Conn. Tissue. Res.* 6: 11-23, 1978.
- KIERNAN, J.A . Histological and histochemical methods. Theory and practice. 3^a ed., Pergamo Press, p. 81-82, 1981.
- KLAUS, W. and OSBORN, M.. The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412, 1969.
- KUC, I.M.; SCOTT, P.G.. Increase diameters of collagen fibrils precipitated *in vitro* in the presence of decorin from various connective tissues. *Conn. Tiss. Res.* 36 (4): 287-296, 1997.

KUIST, M.; JÓZSA, L.; KANNUS, P.; VIENO, T.; JÄRVINEN, M.; LEHTO, M..Structure and macromolecular composition of the myotendineal junction. *Histochemical immunohistochemical and electron microscopc study of the rat calf muscle*. 39: 287-297, 1991.

KUIVANIEMI, H.; TROMP, G.; PROCKOP, D.J.. Mutation in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J*. 5: 2052-2060, 1991.

KOOB, T.J.; VOGEL, K.G.. Site related variation in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J. Orthop. Res*. 5: 414-424, 1987.

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

LIU, S.H.; YANG, R.S.; SHAIKH, R. and LANE, J.M. Collagen in tendon, ligament and bone healing. *Clin. Orthop. Rel. Res*. 318: 265-278, 1995.

MICHELACCI, M. J. and HORTON, D. S. P. Q.. Proteoglycans from thwe cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp. Biochem. Phisiol.*, 92 B, n. 4, p. 651-658, 1989.

MILLER, E.J.. hemistry of the collagens and their distribution. In: Piez K A.; Reddi, A H. (eds) *Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier, NY. P. 41-81, 1984.

- MILZ, S.; MCNEILLY, C.; PUTZ, R.; RALPHS, J.; BENJAMIN, M.. Fibrocartilages in the extensor tendons of the interphalangeal joints of human toes. *Anat. Rec.* 252: 264-270, 1998.
- NIMNI ME, HARKAESS RD.. Molecular structures and functions of collagen. *In*: Nimni ME, Collagen vol.1: *Biochemistry Boca Raton CRC Press*. 1988.
- O'BRIEN M..Functional anatomy and physiology of tendons. *Clin. Sport. Med.* ii: 505-520, 1992.
- O'BRIEN M.. Structure and metabolism of tendons. *Scan. J. Med. Sci. Sport.* 7: 55-61, 1997.
- PARRY, D.A.; GRAIG, A.S.. Collagen fibrils and Elastic Fibers in Rat Tail Tendon; on Electron Microscopic investigation. *Biopolymers.* 17: 843-845, 1978.
- ROSS, M.H.; ROMRELI, L.J.; KAYE, G.I.. Histology, a text and atlas. 3^a ed. P. 95, 1995.
- REGISTER, R.C.; Wagner, w.d.. Heterogeneity in glycosilation of dermatan sulfate proteoglycan core proteins isolated from human aorta. *Connect. Tissue. Res.* 25: 35-48, 1990.

REYNOLDS, E.S.. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-211, 1963.

SCOTT, J.E.. Collagen – proteoglycan interaction: localization of proteoglycan in tendon by electron microscopy. *Biochem. J.* 187: 887-892, 1980.

SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R.. Dermatan Sulfate-rich Proteoglycan Associates with Rat Tail Tendon Collagen at the d Band in the Gap Region. *Biochemical Journal.* 197: 213-216, 1981.

SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R.; HUGHES, E.W.. Proteoglycan – Collagen arrangements in developing Rat Tail Tendon. *Biochemical Journal.* 195: 573-581, 1981.

SCOTT, J.E.; HAIGH, M.; NUSGENS, B.; LAPEIERE, C.M.. Proteoglycan: collagen interactions in dermoepithelial skin and tendon. An electron histochemical study using cupromeronic blue in a critical electrolyte concentration method. *Matrix.* 9: 437-442, 1989.

SCOTT, J.E.. Proteodermatan and Proteokeratan sulfate (Decorin, Lumican / Fibromodulin) Proteins are Horseshoe Shaped. Implications for Their Interactions With Collagen. *Biochemistry.* 35: 8795-8799, 1996.

VIDAL BC.. Dichroism on collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Annals Histochem.* 115: 289-296, 1970.

VIDAL BC.. Extracellular matrix organization: Hypothetical role for cancer growth and metastatization. Conference in the Michigan Cancer Foundation. 1985.

VIDAL B. C.. Evalution of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell. molec. Biol.*, 32:527-535, 1986.

VIDAL, B.C.; CARVALHO, H.F.. Aggregational State and Molecular Order of Tendons as a Function of Age. *Matrix.* 10: 48-57, 1990.

VIDAL, B.C.. Mesophasic sulfonic Dyes with oriented Chromophores docked in Collagen Fiber: Ponceau SS supramolecular order. Plano de pesquisa apresentado a CNPq, 1999.

VIDAL, B.C.. Collagen fibers optical anisotropy and Reticulin morphometry as assessed by image analysis after silver impregnation. Submetido em 2001.

VIDAL, B.C. and JOAZEIRO, P.. Electron microscopic determination of silver incorporation in collagen fibers as a model of organic-metal chiral supramolecular structure with optical anisotropic properties. *Micron.* 33: 507-509, 2002.

VIDAL, B.C..Image Analysis of the Tendons Helical Superstructure using Interference and Polarized Light Microscopy. Submetido à publicação, 2002.

VIIIDIK, A.. Functional Properties of Collagenous Tissues. *Int. Rev. Connect Tissue Res.* 6: 127-215, 1973.

VILARTA R, VIDAL BC. 1989. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix* 9: 55-61.

VOGEL, K.G.; KELLER, E.J.; LENHOFF, R.J.; KOOB, T.J..Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Eur. J. Cell. Biol.* 41: 102-112, 1986.

VOGEL, K. G. and KOOB, T. J.. Structural specialization in tendon under compression. *Int. Ver. Cytol.*, 115: 267-293, 1989.

VOGEL, K.G.; PAULSSON, M.; HEINEGARD, D.. Specific inibition of Type I and Type II Collagen Fibrillogenesis by the Small Proteoglycan of Tendon. *Biochemistry Journal.* 223: 587-597, 1984.

VOGEL, K.G.; TROTTER, J.A.. The effect of Proteoglycan on the Morphology of Collagen Fibrils Formed In Vitro. *Coll. Relat. Res.* 7: 105-140, 1987.

VOGEL, K.G.; SANDY, J.D.; PAGONY, G.; ROBBINS, J.R.. Agrecan in bovine tendon. *Matrix Biol.* 14: 171-179, 1994.

WINIARSKI, A M.; ROY, R.R.; ALFORD, E.K.; CHIANG, P.C.; EDGERTON, V.R.. Mechanical properties of rat skeletal muscle after hind limb suspension. *Exp. Neurol.* 96:3 650-660, 1987.

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

CONCLUSÕES

1. Tendões submetidos a forças adicionais e periódicas de tração apresentam em sua matriz extracelular uma maior concentração de proteínas não colagênicas em relação aos tendões controle.
2. Nos tendões tracionados foram observados uma maior compactação das fibrilas colagênicas e um alinhamento mais acentuado das moléculas de colágeno, na direção do maior eixo do tendão.
3. Os maiores valores de entropia, como medida da quantidade de "bits", encontrados nos tendões suspensos, estão de acordo com os maiores valores de diâmetro máximo, mínimo e cinza médio ou birrefringência.
4. Fibrilas de tendões tracionados tem diâmetro maiores do que as fibrilas de tendão controle.
5. O pequeno proteoglicano de 140 kDa aparece com valor de M_r mais baixo (116 kDa) quando o tendão é submetido à tração.