

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Fernanda Martins De Almeida

**EFEITOS DO ALONGAMENTO SOBRE A MATRIZ
EXTRACELULAR DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Fernanda Martins de Almeida
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 blue ink, appearing to read "Edson Rosa Pimentel".

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Campinas, 2006

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

AL64e

Almeida, Fernanda Martins de
Efeitos do alongamento sobre a matriz extracelular do
tendão calcâneo de ratos / Fernanda Martins de
Almeida. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Tendão calcâneo. 2. Matriz extracelular. 3.
Alongamento (Fisiologia). I. Pimentel, Edson Rosa. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effects of stretching on the extracellular matrix on the calcaneal tendon of rats.

Palavras-chave em inglês: Calcaneal tendon; Extracellular matrix; Stretch (Physiology).

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Edson Rosa Pimentel, Paulo Pinto Joazeiro, Tânia de Fátima Salvini.

Data da defesa: 05/05/2006.

Campinas, 05 de Maio de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)



Assinatura

Profª. Dra. Tania de Fátima Salvini



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

Assinatura

De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos começando,
a certeza de que é preciso continuar
e a certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar.

Façamos da interrupção um caminho novo.

Da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sonho uma ponte,
da procura um encontro!

(Fernando Sabino)

A DEUS

Senhor, como se têm multiplicado os meus adversários!

Muitos se levantam contra mim.

Muitos são os que dizem de mim:

Não há socorro para ele em Deus.

Mas tu, Senhor, és um escudo ao redor de mim,
a minha glória, e aquele que exulta a minha cabeça.

Com a minha voz clamo ao Senhor,
e ele do seu santo monte me responde.

Eu me deito e durmo; acordo, pois o Senhor me sustenta.

Não tenho medo dos dez milhares de pessoas
que se puseram contra mim ao meu redor.

(Salmo 3)

Dedicatória

A minha família

Regina, Albino, Dani, Cacá, Henrique, Ivan e Dinda. Agradeço a vocês, principalmente ao meu pai e a minha mãe pela compreensão, apoio, amizade e amor incondicional. Como foi difícil e doloroso ficar longe de vocês. Obrigada pelas palavras de conforto, quando a saudade estava quase insuportável e pelo apoio sem esperar nada em troca. Essa experiência, apenas confirmou a importância de vocês na minha vida. Com uma família bem estruturada, as coisas tornaram-se mais fáceis.

Ao meu noivo

A distância só fez aumentar meu amor e admiração por você, que soube entender minhas ausências e ainda me incentivava a continuar. Sua confiança, respeito e amor foram essenciais para mim.

**SEM VOCÊS TUDO SERIA MUITO MAIS DIFÍCIL. AMO MUITO
TODOS VOCÊS!**

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

(FERNANDO PESSOA)

**Aos meus grandes amigos Tati, Flávia, Sheila, Taíze,
Wilson, Manuel e Esdras,**

“Não há como substituir um velho companheiro.
Nada vale o tesouro de tantas recordações comuns,
De tantos momentos difíceis vividos juntos,
Tantas desavenças e reconciliações,
Tantas emoções compartilhadas.
Não se reconstroem essas amizades.
È inútil plantar um carvalho na esperança de poder,
em breve, se abrigar sob sua sombra.”

(Antoine de Saint-Exupéri)

Agradecimento especial

Prof. Edson Rosa Pimentel,

Você foi muito mais que um professor e tornou-se um amigo. Obrigada pela orientação, dedicação, amizade, apoio, preocupação e confiança. Todos esses elementos foram determinantes para a confecção deste trabalho. Somente pessoas como você são capazes de reunir tantas qualidades além de imensa sabedoria.

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que se ganha, mas o que ele nos torna."

(John Ruskin)

Agradecimentos

À Profa. Dra. Laurecir Gomes pelas sugestões e auxílio na resolução dos problemas durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade e carinho. Como foram divertidos os passeios e conversas.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal pela valiosa colaboração no trabalho, pela paciência e disponibilidade em ensinar parte de seu enorme conhecimento.

À Profa. Dra. Yara Michellacci da UNIFESP pelo fornecimento de condroitinases que foram utilizadas neste trabalho.

Aos professores do exame de qualificação e proficiência pelas críticas e sugestões.

Aos professores Dr. Paulo Pinto Joazeiro da UNICAMP e Dra. Tania de Fátima Salvini da UFSCAR pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

Aos Professores Dr. Sérgio Felisbino e Dra. Stela M. Matiello G. Rosa pela análise prévia da tese e pelas sugestões.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta pela ajuda na realização dos experimentos, pelas explicações e amizade.

À secretária Liliam S. Panagio pela amizade, pelas conversas e pelo auxílio nos momentos de correria. Somente uma pessoa muito especial e alegre como você para conseguir entender a angústia dos alunos.

Ao meu querido Professor Severo de Paoli, que sempre me incentivou. Não tenho dúvidas de que você é uma pessoa muito importante na minha formação.

Ao Bruno Mazziotti pelos conselhos, incentivo, amizade e confiança. Você tornou-se um amigo, a quem sempre vou escutar. Obrigada pela sua capacidade de encontrar as palavras certas para as horas certas.

Aos amigos do laboratório de Matriz Extracelular Tati, Wilson, Adriano, Gustavo, Alexandre e Lúcia, pela ótima convivência.

Aos amigos da Pós graduação Juarez, Patrick, Sérgio, Juliana, Fabrícia, Sílvia, Eliane, Flávia, Juliano, Alberto, Manuel, Alexandre, Taíze, Lucinha, Esdras, Tati, Sheila, Wilson, Adriano e Lúcia pelo apoio, companheirismo, amizade e conversas. Espero que fiquem para sempre na minha vida.

A minha grande amiga Tati, que se tornou uma irmã. Espero que você conte nossas aventuras com o mesmo entusiasmo de Rio Preto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Objetivos	17
Referências	18
Artigo 1	26
Resumo	27
Introdução	29
Materiais e Métodos	31
Resultados	38
Discussão	42
Figura 1- Cortes corados com HE	49
Figura 2- Cortes corados com AT	51
Figura 3- Cortes corados pela Reação de Feulgen	53
Figura 4- Tabela com quantidade de núcleos	55
Figura 5- Reação de Von Kossa	57
Figura 6- Eletroforese em gel de SDS-PAGE	59
Figura 7- Eletroforese em gel de agarose-PDA	61
Figura 8- Eletroforese em gel de agarose-PDA com condroitinase	63
Figura 9- Concentração de glicosaminoglicanos	65
Figura 10- Dosagem de proteínas	67
Referências	68
Artigo 2	72
Resumo	73
Introdução	74
Materiais e Métodos	76
Resultados	79
Discussão	81
Figura 1- Concentração de hidroxiprolina	85
Figura 2- Propriedades mecânicas do tendão	87
Figura 3- Curva Tensão X Deformação	89
Figura 4- Módulo Elástico	91
Referências	92
Conclusões	95

RESUMO

Os tendões servem para realizar a transferência de força dos músculos para os ossos, sendo capazes de suportar altas forças de tensão. Muitos trabalhos descreveram alterações nas propriedades estruturais, bioquímicas e biomecânicas dos tendões de animais que foram submetidos a exercícios prolongados, porém pouco se sabe sobre o que ocorre no tendão que passa por um processo de alongamento, um procedimento bastante comum em academias e clínicas de Fisioterapia. Assim, nosso trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos morfológicos e bioquímicos dos tendões de ratos submetidos ao alongamento três e cinco vezes por semana. Os ratos tiveram seus músculos alongados por um período de 30 segundos intercalados com 30 segundos de relaxamento, com 10 repetições, 3 e 5 vezes por semana durante 21 dias. Os tendões foram removidos e utilizados para os procedimentos de morfologia e de bioquímica. Os tendões também foram submetidos ao ensaio mecânico sob tração a fim de avaliar suas propriedades biomecânicas. Nos cortes corados com AT, na entese dos tendões dos grupos alongados, observou-se um aumento na quantidade de células com morfologia arredondada. Já na região próxima à entese pode ser observado metacromasia mais intensa nos grupos alongados. Observações feitas nos cortes corados com HE, nas regiões de tensão, mostraram que as células apresentaram-se mais alinhadas. Nos grupos alongados, em ambas regiões ocorreu aumento na quantidade de células. Nos cortes que foram submetidos à Reação de Von Kossa, observou-se uma região calcificada em todos os grupos, porém esta apresentou uma MEC mais densa nos tendões dos grupos alongados três e cinco vezes. Análise do gel de SDS-PAGE revelou uma maior quantidade de colágeno nos grupos alongados e a presença do componente de 65 kDa nas regiões de tensão e compressão em todos os grupos. A quantidade de proteínas, de glicosaminoglicanos e de hidroxiprolina também foi superior nos animais alongados. O gel de agarose revelou a presença de dermatam sulfato nas regiões de tensão e de compressão e de condroitim sulfato somente nesta última. Durante o ensaio mecânico, os tendões dos grupos alongados suportaram valores de tensão máxima superiores, com deslocamentos semelhantes, sugerindo que estes tendões são mais resistentes à ruptura. Esses resultados mostraram que o estímulo do alongamento acarretou modificações nas características estruturais, bioquímicas e biomecânicas, confirmando o caráter adaptativo do tendão em resposta à aplicação dos procedimentos de alongamento.

ABSTRACT

The tendons are structures that transmit forces from the muscles to the bone, and are capable of supporting high tensile strengths. Many studies have shown alterations in tendons of animals submitted to strenuous exercises, however, just a little is known about what happens in tendons when they are under a stretching program, a common procedure in academies and physiotherapy institutes. So our objective was to evaluate the morphological, biochemical and biomechanical aspects of tendons submitted to stretching exercises. Rats had their muscles stretched for a period of 30 seconds with 30 seconds of resting, with 10 repetitions, three and five times a week during 21 days. The tendons were used for morphological and biochemical procedures. They were also submitted to mechanical tensile strain test and their mechanical properties were evaluated. Analysis of AT stained sections of enthesis from stretched tendons, showed a high amount of rounded cells. In the region next to enthesis, which passes close to the calcaneus, the metachromasy was more intense in stretched groups. In the tension region, in the HE stained sections, it was found a larger alignment of the cells in the stretched group. In both regions occurred an increase on the amount of cells. In the sections submitted to Von Kossa reaction, was observed, a calcified region in all groups, but the extracellular matrix were denser in stretched ones. Analysis of SDS-Page showed a high amount of collagen and the presence of a polydisperse component of 65 kDa in the tension and compression regions in all groups. The amount of proteins, glycosaminoglycans and hydroxiprolin was higher in the tendons of three and five times stretched groups. The agarose gel revealed the presence of dermatan sulfate in the tension and compression regions and chondroitin sulfate only in this last one. During the mechanical tensile strain test, the stretched tendon supported high values of maximum stress with the same strain, when compared to the control group, suggesting that the stretched tendons were more resistant to the failure. These results show that the stimulus of stretching leads to alterations in the structural, biochemical and biomechanical characteristics, confirming the adaptative character of tendons, in response to the application of stretching exercises.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Características anatômicas do tendão calcâneo

Os tendões são estruturas responsáveis por transmitir ao osso as forças de tração geradas pela contração do músculo (VOGEL, KOOB, 1989; CRIBB, SCOTT, 1995), apresentando características elásticas pois retornam ao tamanho original depois de serem alongados durante os movimentos fisiológicos (HAYEM, 2001). Nem sempre os tendões estão presos aos ossos, podendo se fixar em outros elementos como cartilagens, septos intramusculares, cápsulas articulares e até mesmo em tendões de outros músculos. Apresentam variações na forma e no tamanho podendo ser achatados ou cilíndricos, e são encontrados formando a origem e a inserção dos músculos ou nas interseções tendinosas dentro dos músculos (DÂNGELO; FATTINI, 1995).

O tendão calcâneo é cilíndrico e é responsável pela fixação dos músculos gastrocnêmio e sóleo no calcâneo. Esses dois músculos são potentes flexores plantares, sendo que o gastrocnêmio, por cruzar o joelho posteriormente, também pode participar no processo de flexão dessa articulação (DÂNGELO; FATTINI, 1995). Este tendão tem sido bastante utilizado para substituir tecidos que suportam altas forças de tensão, como ocorre na reconstrução do ligamento cruzado anterior (LEVITT *et al*, 1994) além de ser bastante acometido por tendinopatias em atletas (SMITH *et al*, 2002).

1.2 Características Histológicas

Os tendões são constituídos por células e uma matriz extracelular (MEC), formada por componentes fibrilares e não fibrilares. Entre os primeiros estão as fibras de colágeno e as elásticas e alguns componentes microfibrilares. Os componentes não fibrilares são representados pelos proteoglicanos (PGs) e proteínas não colagênicas (PNC).

Os tenócitos, tipo celular encontrado em tendões, são semelhantes a fibroblastos especializados que possuem uma complexa maquinaria enzimática necessária para a renovação dos componentes da MEC. A população de tenócitos é esparsa, correspondendo a cerca de 3% do peso seco do tendão. Quando jovens, essas células produzem os constituintes macromoleculares da matriz e são freqüentemente chamadas de tenoblastos. Depois da fase de desenvolvimento, os tenócitos perdem espontaneamente suas características anabólicas e tornam-se quiescentes, embora mantenham a capacidade de síntese, que pode ser reativada durante processos de reparo após injúria do tendão (HAYEM, 2001). Durante o desenvolvimento, apresentam o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi bastante desenvolvidos, típicos de células que estão produzindo grandes quantidades de componentes da MEC. Com o decorrer da idade essas organelas, tornam-se menos proeminentes (NAKAGAWA *et al*, 1994; CREVIER-DENOIX *et al*, 1998).

Estudos recentes em microscopia confocal enfatizaram a complexidade do formato dos fibroblastos em tendões de ratos adultos (MC NEILLY *et al*, 1996). Esse tipo celular apresenta numerosos processos que se estendem até células adjacentes, comunicando-se por junções do tipo GAP, bastante evidenciada com a utilização de técnicas de imunocitoquímica (KJAER, 2004). Essas junções são formadas por duas subunidades nas membranas de células adjacentes, sendo cada uma formada por seis cadeias de conexinas e funcionam como um canal, permitindo a passagem de pequenas moléculas de sinalização e íons. Assim, as células formam um sistema de túneis, através dos quais as fibras de colágeno organizam-se longitudinalmente (BENJAMIN; RALPHS, 2000). A forma e o arranjo dos fibroblastos são favoráveis para a formação de compartimentos, nos quais haverá deposição dos componentes da matriz extracelular (BIRK; ZYCBAND, 1994).

1.3 A matriz extracelular de tendões

Na matriz extracelular dos tendões, são encontradas moléculas de colágeno principalmente do tipo I, que representam mais de 90% do peso seco do tecido e estão arranjadas em fibras e feixes de fibras, dispendo-se paralelamente ao maior eixo do tendão (VIDAL, 1970; NIMNI, HARKNESS, 1988; VIDAL, CARVALHO, 1990; LIU *et al.*, 1995; O'BRIEN, 1997). As moléculas de colágeno são constituídas por três cadeias α , formando uma tripla hélice. Geralmente as extremidades não estão em conformação helicoidal, favorecendo a ocorrência de ligações cruzadas (crosslinks) entre as moléculas. Cada cadeia contém repetições dos aminoácidos glicina - X - Y, onde X geralmente é a prolina e Y, a hidroxiprolina. Este último aminoácido está presente somente nas moléculas de colágeno.

Os feixes colágenos do tendão formam conjuntos envolvidos por tecido conjuntivo frouxo, denominado endotenon, que contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (KAINBERGER *et al.*, 1997). Externamente, o tendão é envolvido por uma bainha de tecido conjuntivo denso, o epitenon, que se encontra dividido em duas camadas: a visceral, que fica presa ao tendão, enquanto que a parietal, se liga a estruturas vizinhas (CHOWDURY *et al.*, 1991; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999). Forma-se assim, uma cavidade, que encerra um líquido viscoso contendo água, proteínas, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e íons e serve como um lubrificante para facilitar o deslizamento do tendão dentro de sua bainha (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Além disso, as camadas visceral e parietal encontram-se ligadas pelo mesotenon, enquanto que o paratenon é uma falsa bainha que envolve o tendão, mas é completamente separada deste (BENJAMIN; RALPHS, 2000).

Os feixes de colágeno em repouso apresentam arranjos regulares e sinuosos denominados de "crimp" (GATHERCOLE; KELLER, 1991) que permite ao tendão reduzir o impacto de uma força de tração sobre o osso onde o tendão se insere. Estudos realizados com tendão de cauda de rato, "in vitro", mostraram que durante a aplicação de uma força de tração ocorre o desaparecimento ou modificação do padrão de "crimp", como resultado do alongamento das fibras (GATHERCOLE; KELLER, 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).

As fibras colágenas são responsáveis por propriedades biomecânicas como flexibilidade, resistência e até mesmo uma certa elasticidade dos tendões (VOGEL, KOOB, 1989; BIRK *et al.*, 1989; VIDAL, CARVALHO, 1990; JÓZSA *et al.*, 1991 MILZ *et al.*, 1998). A base molecular para a flexibilidade do colágeno tipo I se dá pela falta dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina. Nessas seqüências, podem ocorrer a formação de alças internas na tripla hélice (PATERLINI *et al.*, 1995).

Na MEC, as fibras de colágeno se associam, o que favorece o aumento da resistência do tendão (MC BRIDE *et al.*, 1988) e essas associações são geralmente laterais (BIRK *et al.*, 1995), conferindo uma resistência mecânica ao tecido já que há uma continuidade ao longo da extensão do tendão (BIRK *et al.*, 1997). Junto com o colágeno tipo I, também podem ser encontrados o colágeno tipo II na região de compressão dos tendões (BERENSON *et al.*, 1996), tipo III, tipo VI (KJAER, 2004). Em tendões de feto bovino, já foi identificada a presença de colágeno tipo V e os da classe FACIT (colágenos associados a fibrilas com a tripla hélice interrompida), especialmente os tipos XII e XIV (SUGRUE *et al.*, 1989, CASTAGNOLA *et al.*, 1992).

Outro componente da matriz extracelular dos tendões, são os proteoglicanos (PGs), constituídos por um esqueleto protéico central, ao qual estão ligadas uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. Desempenham diversas funções nos tecidos devido à variabilidade da proteína central e das diferentes classes de glicosaminoglicanos que podem ser encontrados (IOZZO; MURDOCH, 1996). Estudos feitos por Cribb e Scott (1995) destacaram a função dos proteoglicanos na estabilidade estrutural dos tendões e descreveram que essas moléculas encontram-se arranjadas ortogonalmente na matriz, circundando as fibrilas de colágeno, sugerindo que esses elementos estejam envolvidos na transmissão de forças. A quantidade de PGs associado com as fibrilas de colágeno em tendões, diminui com a idade e com o aumento do diâmetro das fibrilas (SCOTT *et al*, 1981).

Os GAGs encontrados nos proteoglicanos dos diversos tecidos são o dermatam sulfato, o condroitim sulfato, o queratam sulfato e o heparam sulfato. Um outro tipo de GAG é o ácido hialurônico, que diferentemente dos anteriores não é sulfatado e não se liga covalentemente a uma proteína central (GOMES,2001). No entanto, ele interage por meio de ligações eletrostáticas com PGs, formando agregados de alto peso molecular, especialmente em cartilagens (HARDINGHAM *et al*, 1986; HEINEGÅRD, SOMMARIM, 1987; OLDBERG *et al*, 1990) e regiões de compressão em tendões (VOGEL *et al*, 1994). Estes agregados de PGs retêm grande quantidade de água, devido a elevada densidade de cargas negativas, conferida pelas cadeias de GAGs e é responsável pelo alto teor hídrico da MEC. Assim a matriz apresenta-se como um gel hidratado, que fica retido pelas fibrilas de colágeno, possibilitando ao tecido suportar altas forças compressivas com um mínimo de deformidade (HASCALL; HASCALL, 1983).

O agregam é um exemplo de grande proteoglicano que interage com o ácido hialurônico, formando agregados e está presente no tecido cartilaginoso e também nas regiões dos tendões submetidas a forças compressivas (VOGEL; KOOB, 1989). Uma outra classe de proteoglicanos são os pequenos proteoglicanos, ou de baixo peso molecular. Alguns exemplos de pequenos proteoglicanos são o decorim, o biglicam e o fibromodulim,

O decorim possui uma e o biglicam duas cadeias de glicosaminoglicanos que podem ser de condroitim ou de dermatam sulfato, dependendo do tecido, ligados a uma proteína central de 36 e 38 kDa, respectivamente. Estes PGs apresentam grande homologia no conteúdo e na seqüência de aminoácidos (HEINEGÅRD; PIMENTEL, 1992). O fibromodulim apresenta quatro cadeias de queratam sulfato que se ligam a uma proteína central de 48 kDa (OLDBERG *et al*, 1989; PLAAS *et al*, 1990), podendo ser encontrado em tendões e cartilagens (OLDBERG *et al*, 1990). Este pequeno PG é membro de uma subfamília de proteoglicanos com repetição de seqüência de leucinas (IOZZO, 1999). Sua interação com o colágeno se dá através da proteína central, não dependendo das cadeias de glicosaminoglicanos (HEDBOM; HEINEGÅRD, 1989).

Alguns trabalhos têm mostrado que os pequenos PGs como o decorim e o fibromodulim são capazes de inibir a agregação lateral das fibrilas de colágeno (VOGEL *et al*, 1984; VOGEL, TROTTER, 1987), provavelmente através da ligação do PG à molécula de colágeno (SCOTT; ORFORD, 1981). Essa ligação ocorre de forma ordenada, de modo que as cadeias de GAGs fiquem paralelas ao eixo maior dos feixes de colágeno (VIDAL; MELLO, 1984), o que contribui para a manutenção das propriedades biomecânicas (SCOTT, 1988).

Além do colágeno e dos proteoglicanos, as proteínas não colagênicas (PNC) também estão presentes na MEC e correspondem cerca de 0,5 % do peso úmido do tendão (FRANK *et al*, 1987). Um exemplo de PNC é a COMP, proteína oligomérica de matriz extracelular,

que foi identificada primeiramente em cartilagem articular (SPITZ-FIFE, BRANT, 1984; SPITZ-FIFE, 1985) e posteriormente em tendão (HEDBOM *et al*, 1992; EFIMOV *et al*, 1994). Sua função precisa, ainda não está esclarecida, embora já tenha sido descrito sua ligação através de seu domínio globular C-terminal, a moléculas de colágenos fibrilares (tipo I, II) e também ao colágeno IX, através de um mecanismo dependente de zinco (ROSEMBERG *et al*, 1998). Outros exemplos de PNC são a fibronectina e a tenascina (JÓSZÁ, 1997).

A maioria das proteínas não colagênicas apresentam vários domínios estruturais dentro da mesma molécula, sendo consideradas multifuncionais, e estão envolvidas nos processos de interação célula-matriz (JOHANSSON, 1996).

A MEC do tendão contém ainda um Sistema Elástico, formado por fibras elaunínicas, oxitalânicas e elásticas. A elastina é o principal componente das fibras elásticas, cuja composição é rica em glicina (33%), prolina (10-13%), aminoácidos hidrofóbicos(44 %) e lisina (4%). As fibras elásticas são formadas por um material amorfo na parte central com formato cilíndrico (elastina), envolvido por microfibrilas (10 a 12 nm de diâmetro) formadas por várias glicoproteínas, como a fibrilina. As fibras elaunínicas contêm proporcionalmente muitas microfibrilas, dispostas em feixes no interior de pequenas quantidades de elastina, enquanto as fibras oxitalânicas são constituídas exclusivamente de microfibrilas, sem elastina (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999; MIAO *et al*, 2005).

1.4 Adaptações da matriz extracelular de tendões

Os tendões que contornam articulações ou que passam junto a alguma protuberância óssea, estão submetidos às forças de tensão e compressão. Nestes locais, desenvolvem uma estrutura semelhante a uma fibrocartilagem, caracterizada pelo acúmulo de proteoglicanos

(VOGEL, KOOB, 1989; BENJAMIN, EVANS, 1990; EVANKO, VOGEL, 1990; COVIZI *et al.*, 2001; FEITOSA *et al.*, 2002) e expressão do colágeno II (BERENSON *et al.*, 1996). As células da fibrocartilagem geralmente são redondas ou ovais e ficam dispostas em lacunas como os condrócitos de cartilagem articular (MERRILEES; FLINT, 1980). Acumulam grandes quantidades de filamentos intermediários no citoplasma, que podem se fundir com o tempo (MERRILEES, FLINT, 1980; BENJAMIN *et al.*, 1991; RALPHS *et al.*, 1991).

A presença dessa fibrocartilagem sugere que as células nesse tecido são capazes de responder a estímulos mecânicos, sintetizando uma matriz capaz de suportar forças de compressão (EVANKO; VOGEL, 1990). No caso do tendão calcâneo, esta estrutura aparece na porção do tendão junto ao calcâneo e que, portanto recebe compressão, e também na "entheses", onde ocorre a inserção do tendão no osso (RUFAl *et al.*, 1992).

A região da entese é o local onde o tendão se insere no osso, sendo uma região sujeita a intenso estresse e bastante acometida por tendinopatias (BENJAMIN *et al.*, 2006). A composição da MEC da entese está diretamente relacionada com a demanda biomecânica. Como esses locais estão sujeitos a forças compressivas, demonstrou-se que os GAGs são componentes típicos, incluindo dermatam sulfato e queratam sulfato, que também podem ser encontrados na região de tensão de tendões (MILZ *et al.*, 2005). O condroitim sulfato também está presente (MILZ *et al.*, 1998). Os PGs (que contêm GAGs) como o versicam e a tenascina, que são componentes típicos de tecido conjuntivo denso, tornam-se menos evidente e desaparecem eventualmente com o aumento das forças compressiva. Já o agregam, torna-se mais proeminente nessas regiões sujeitas a intensas forças de compressão (MILZ *et al.*, 2004; 2005).

No tendão calcâneo de humanos e de ratos, Rufai e colaboradores (1995, 1996) distinguiram histologicamente três tipos de fibrocartilagem relacionadas com a inserção do tendão no calcâneo: a fibrocartilagem entesial, que se localiza na junção tendão-osso e permite uma transição gradual das propriedades mecânicas entre tendão e osso; a sesamóide encontrada na superfície profunda do tendão ao lado da entese, e permite ao tendão suportar forças de compressão quando pressionado contra o calcâneo durante caminhadas e corridas; e a periosteal que cobre a superfície oposta ao osso. Essas duas últimas fibrocartilagens formam a bursa retrocalcaneal. Todas essas estruturas estão ilustradas na figura 1:

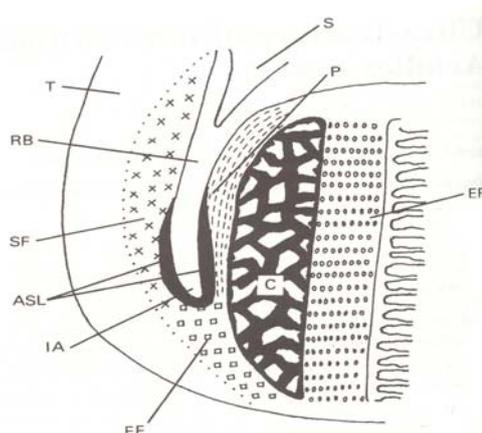


Figura 1: Representação das três fibrocartilagens na inserção do tendão de Aquiles no calcâneo (C) e a posição da lâmina da superfície articular (ASL) alinhando a porção distal da bursa retrocalcaneal (RB). A fibrocartilagem da entese (EF) encontra-se na junção tendão-osso, enquanto que a sesamóide (SF) e a periosteal (P) formam os limites da bursa. EP – epífise; IA – ângulo de inserção. Entre o tendão e o osso; S - sinóvia; T - região de tensão do tendão. (RUFAl *et al*, 1996).

A fibrocartilagem entesial também previne a concentração de estresse na interface tendão-osso e é parte de uma seqüência de quatro tecidos: tecido conjuntivo denso, fibrocartilagem, fibrocartilagem descalcificada e osso (RUFAl *et al*, 1996; BENJAMIN *et al*, 2006). Aspectos da estrutura e ultraestrutura em fibrocartilagem de tendão calcâneo podem ser encontrados nos artigos de Rufai e colaboradores (1992, 1996).

Conectando o tendão ao músculo, existe a junção miotendinosa, sendo caracterizada como o local onde ocorre a interação entre as células musculares e as fibras tendíneas. A transmissão de forças do músculo para o tecido conjuntivo ocorre ao longo de todo o tecido e não somente na junção miotendinosa. Suas células apresentam especializações estruturais. As membranas das células musculares apresentam dobras que aumentam a superfície de contato com o tendão de 10 a 50 vezes (GELBER *et al*, 1960; TROTTER *et al*, 1981). Com isso, ocorre um aumento na estabilidade da junção e diminuição dos níveis de estresse da contração (TIDBALL, 1991).

Tem sido observado que as regiões do tendão apresentam diferenças importantes em sua composição como presença de proteoglicanos de alto peso molecular na região de compressão e uma alta quantidade de proteoglicanos ricos em dermatam sulfato, na região que predominantemente transmite tensão (WAGGETT *et al*, 1998; COVIZI *et al*, 2001), indicando que a composição da matriz extracelular dos tendões está diretamente relacionada com a presença de forças biomecânicas.

1.5 Aspectos biomecânicos dos tendões

O tendão é considerado um tecido não contrátil, e seu comportamento mecânico é determinado pela proporção de fibras de colágeno, fibras elásticas e pela orientação de suas fibras, sendo o primeiro, o elemento estrutural que absorve a maior parte da sobrecarga de tensão.

A curva de tensão-deformação de um tendão é caracterizada por três regiões distintas. Inicialmente ocorre realinhamento das fibras colágenas que se encontram em um padrão ondulatório, denominado crimp (KISNER; KOLBY, 1998). Nesta região, uma quantidade mínima de força produz uma grande deformação. Após essa fase, o tecido entra na região elástica, onde a deformação apresentada aumenta linearmente com a força aplicada (ENGLES, 2001). A inclinação da curva nessa região representa a rigidez do tecido, também chamada de módulo elástico e está diretamente relacionado com a resistência do material à deformação (LATASH; ZATSIORK, 1993). Na fase elástica, o tecido retorna a sua forma original com a retirada da carga (ENGLES, 2001; NORDIN *et al*, 2001). Quando o tendão excede seu limite elástico, ele entra no limite plástico da curva, e o tecido torna-se permanente deformado, não sendo capaz de se recuperar após a retirada da força, ocorrendo assim, falha tecidual (NORDIN *et al*, 2001). Quando o músculo contrai, o tendão torna-se tenso e aumenta seu comprimento linearmente até um limiar, no qual o alongamento ocorre mais devagar, sendo um risco para injúria. Esse limiar varia de 20-50% do comprimento em repouso do tendão (HAYEM, 2001).

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 (BIRK *et al*, 1989; VILARTA, VIDAL, 1989; VIDAL, CARVALHO, 1990). 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; ASPDEN, 1985).

1.6 Alterações em tendões devido à realização de atividades físicas

Os exercícios físicos acarretam alterações nos tecidos, como aumento do comprimento de tendões (HITCHCOCK *et al* 1987). Embora alguns autores tenham encontrado aumento nas concentrações de proteoglicanos (HEIKINEN *et al*, 1970) e colágeno (OPSHAL; EHRHART, 1987) em outros estudos, este aumento não tem sido verificado em tendões (HITCHCOCK *et al* 1987; CURWIN *et al*, 1988). Também tem sido notado que o exercício físico leva a uma redução no número ligações cruzadas do tipo piridinolina (CURWIN *et al*, 1988) e alterações no metabolismo dos componentes da matriz extracelular (HARVEY *et al*, 1982) em tendões de aves submetidas a um programa de corrida em esteiras.

Em ratos treinados em esteira, ocorreu um aumento na área de secção transversa acompanhada de uma diminuição das propriedades biomecânicas bem como alterações histológicas do tendão supraespinhoso: uma maior quantidade de células com morfologia arredondada foi encontrada nos tendões dos animais treinados quando comparados com o grupo controle (HUANG, 2003). A diminuição da prática de exercícios físicos, ocasionada pela idade ou por períodos de imobilização leva a diminuição da atividade dos tenócitos no processo de renovação da MEC, ocorrendo perdas de água, proteoglicanos, glicoproteínas e elastina (HAYEM, 2001). Como se pode observar existem vários trabalhos mostrando relação entre exercício e matriz extracelular de tendões, mas muito pouco se sabe sobre o que ocorre no tendão que passa por um processo de alongamento.

1.7 O alongamento

Os exercícios de alongamento reduzem tensões musculares, previnem lesões no tecidos musculares e nos tendões, ativam a circulação, além de preparar o organismo para a prática de atividades físicas, sendo definido como uma manobra utilizada para aumentar o comprimento de estruturas de tecidos moles, aumentando assim a amplitude de movimento (KISNER; COLBY, 1998). Destaca-se como um procedimento bastante utilizado por atletas, pessoas saudáveis, que não apresentam nenhuma patologia, para manutenção da amplitude geral. Além disso, também pode ser indicado na reabilitação de pacientes que tenham passado por longo período de imobilização, seja por gesso, tala plástica, ou até mesmo por estar acamado.

O comportamento dos tecidos biológicos em resposta ao estresse mecânico é representado por um gráfico em que é plotado a magnitude da força aplicada sobre o material em relação ao deslocamento sofrido (ENGLES, 2001). A curva força-deslocamento pode ser transformada em curva tensão-deformação, dividindo-se a força pela área de secção transversa do tecido e a variação no comprimento pelo comprimento original. A análise desta curva permite a comparação de respostas de diferentes materiais biológicos à aplicação de carga. A curva de tensão-deformação fornece informações importantes sobre a elasticidade, plasticidade, rigidez, ponto de falha e energia que um tecido é capaz de absorver antes da ruptura (AKESON *et al*, 1987; BINKLEY, 1989).

A falta de informações sobre o que ocorre na matriz extracelular de tendões, cujos músculos passaram por um processo de alongamento, foi a principal razão desta investigação. Um maior conhecimento sobre os efeitos do alongamento sobre o tendão, 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 a essas mudanças, poderá auxiliar na definição de procedimentos nos

protocolos de reabilitação utilizados em clínicas e hospitais, como por exemplo, o tempo e a frequência necessários para que o alongamento ocasiona alterações no tendão.

Alguns estudos têm mostrado os efeitos da contração e do alongamento sobre as propriedades viscoelásticas do tendão (KUBO *et al*, 2002), mas faltavam ainda ser analisados os aspectos morfológicos, bioquímicos e biomecânicos. Assim neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar as características da matriz extracelular dos tendões que foram submetidos ao alongamento, assim como comparar as diferenças estruturais encontradas entre os grupos que tiveram diferentes frequências de alongamento.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- analisar aspectos morfológicos, dos tendões dos animais que foram submetidos ao alongamento três e cinco vezes por semana, incluindo a análise do formato dos núcleos das células das regiões de tensão e de compressão;
- verificar se houve alterações na composição geral da matriz extracelular do tendão em função dos procedimentos utilizados;
- quantificar e identificar os tipos de glicosaminoglicanos presentes nas regiões de tensão e de compressão do tendão calcâneo dos diferentes grupos experimentais;
- analisar se houve alteração no conteúdo de proteínas não colagênicas e de colágeno em função do alongamento;
- analisar as propriedades biomecânicas dos tendões.

REFERÊNCIAS

- AKESON, W.H. Effects of immobilization on joints. *Clin. Orthop.*, v.219, p. 28-37, 1987.
- BENJAMIN, M.; EVANS, E.J. Fibrocartilage. *J. Anat.*, v.171, p.1-15, 1990.
- BENJAMIN, M.; TYERS, R.N.S.; RALPHS, J.R. Age-related changes in tendon fibrocartilage. *J. Anat.*, v.179, p.127-136, 1991.
- BENJAMIN, M; RALPHS, J.R. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.*, v.196, p. 85-130, 2000.
- BENJAMIN, M. et al. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J. Anat.*, v. 208, p. 471-490, 2006.
- BERENSON, M. C. et al. Proglycans of human rotator cuff tendons. *J. Orthop. Res.*, v.14, p. 518-525, 1996.
- BINKLEY, J. Overview of ligament and tendon structure and mechanics: implications for clinical practice. *Physioter.*, v. 41, p. 24-30, 1989.
- BIRK, D.E. et al. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments are intermediates in matrix assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, v. 86, p. 4549-4553, 1989.
- BIRK, D.E.; ZYCBAND, E. I. Assembly of the tendon extracellular matrix during development. *J. Anat.*, v. 184, p.457-463, 1994.
- BIRK, D.E.; NURMINKAYA, M.V.; ZYCBAND, E.I. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev. Dyn.*, v. 202, p.229-243, 1995.
- BIRK, D.E. et al. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Dev. Dyn.*, v. 208, p.291-298, 1997.
- CASTAGNOLA, P. et al. Tissue specific expression of type XIV collagen, a member of FACIT class of collagens. *Eur. J. Cell Biol.*, v.59, p. 340-347, 1992.
- CHOWDURY, P.; MATYAS, J. R.; FRANK, C. B.. The "epiligament" of the rabbit medial collateral ligament: a quantitative morphological study. *Connect. Tissue Res.*, v.27, p. 33-50, 1991.

COVIZI, D.Z. et al. Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell.*, v.33, p. 483-490, 2001.

CREVIER-DENOIX, N. et al. Mechanical correlations derived from segmental histologic study of the equine superficial digital flexor tendon from foal to adult. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p. 969-977, 1998.

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

CURWIN, S.L.; VAILAS, A.C.; WOOD, J. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.*, v. 65, p. 2297-2301, 1988.

DÂNGELO J.G.J.; FATTINI, C.A. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 686 p.

DIAMANT, J. et al. Collagen structure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v.180:, p. 293-315, 1972.

EFFIMOV, V.P.; LUSTIG, A.; ENGEL, J. The thrombospondin-like chains of cartilage oligomeric matrix protein are assembled by a five-stranded α -helical bundle between residues 20 and 83. *FEBS Lett.*, v. 341, p. 54-58,1994.

ENGLES, M. Tissue response. In: *Orthopaedic and Sports Physical Therapy*. St. Louis, 2001.

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

FEITOSA, V.L.C.; VIDAL. B.C.; PIMENTEL, E.R. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. *J. Anat.*, v. 200, p. 105-111, 2002.

FRANK, C.; WOO, S.; ANDRIACCHI, T.; BRAND, R.; OAKES, B. AND DAHNERS,L. Normal ligament: structure, function and composition. In: *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Am. Acad. of Orthop. Surg., Park Ridge, Illinois, 1987.

GATHERCOLE, L.J.; KELLER, A. "crimp" Morphology in the fibre forming collagen. *Matrix.*, v. 11, p. 214-234, 1991.

GELBER, D.; MOORE, D.H.; RUSKA, H. Observations of the myotendinous junction in mammalian skeletal muscle. *Z. Zellforsch.*, v.52, p. 396-400, 1960.

GOMES, L. Proteoglicanos In: *A Célula*. São Paulo, Manole, 2001, 287 p.

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

HARDINGHAN, T.E.; EWINS, R.J.; MUIR, H. Cartilage proteoglycans. Structure and heterogeneity of the protein core and the effects of specific protein modification on the binding to hyaluronate. *Biochem. J.* , v.157, p. 27-43, 1986.

HARVEY, S. et al. Endocrine responses of ducks (*Anas platyrhynchos*) to treadmill exercise. *Gen. Comp. Endocrinol.* , v.48, p. 415-420, 1982.

HASCALL, V.C.; HASCALL, G.K. Proteoglycans. In: *Cell Biology of extracellular matrix*. New York, 1983, p. 39-60.

HEDBOM, E.; HEINEGÅRD, D. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem*. V. 264, p. 6898-6905, 1989.

HEDBOM, E. et al. Cartilage matrix protein. an acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J. Biol. Chem.*, v.267, p. 6132-6136, 1992.

HEIKKINEN, E.; VUORI, I. Effect of physical activity on the connective tissues metabolism in mice. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, v. 113, p. 36-41, 1970.

HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y. Proteoglycans: an overview. *Methods in Enzymol.* v.144, 1987.

HEINEGÅRD, D.; PIMENTEL, E. R. Cartilage matrix proteins. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York:Raven Press, 1992. 757p.

HITCHOCK, T.F. et al. The effect immediate constrained digital motion on the strenght of flexor tendon repairs in chickens. *J. Hand Surg.*, v.12 A, p. 590-595, 1987.

HUANG, T. F.; PERRY, S.M.; SOSLOWSKY, L. J. The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: a biomechanical study. *Ann. Biomed. Eng.*, v.32, p. 336-341, 2004.

HUKINS, D.W.L.; ASPDEN, R.M. Composition and properties of connective tissues. *Trends Biochem. Sci.*, v.10, p.260-264, 1985.

IOZZO, R. V.; MURDOCH, A. D. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB.*, v.10, p.598-614, 1996.

IOZZO, R. V. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.18843, 18846, 1999.

JOHANSSON, S. Non-collagenous proteins matrix. In: *Extracellular matrix*. Amsterdam, 1996. 476p.

JÓZSA, L. et al. Structure and macromolecular composition of the myotendineal junction. Histochemical immunohistochemical and electron microscopic study of the rat calf muscle. *Acta Morphol. Hung.*, v. 39, p. 287-297, 1991.

JÓZSA, L.G.; KANNUS, P. *Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaign: Human Kinetics, 1997. 574p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

KAINBERGER, F. et al. Imaging of tendons – adaptation, degeneration, rupture. *Eur. J. Radiol.*, v. 25, p. 209-222, 1997.

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

KISNER, C.; COLBY, L. A.. *Exercícios Terapêuticos: Fundamentos e Técnicas*. 3 ed. São Paulo: Manole, 1998. 746 p.

KUBO, K.; KANEHISA, H.; FUKUNAGA, T. Effects of transient muscle contractions and stretching on the tendon structures *in vivo*. *Acta Physiol. Scand.*, v.175, p. 157-164, 2002.

LATASH, M.L.; ZATSIORSKI, V.M. Joint stiffness: Myth or reality? *Human Mov. Scie.*, v. 12, p. 653-692, 1993.

LEVITT, R.L. et al. Reconstruction of anterior cruciate ligaments with bone-patellar tendon-bone and Achilles tendon allografts. *Clin Orthop.*, v. 303, p. 67-78, 1994.

LIU, S.H. et al. Collagen in tendon, ligament and bone healing. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, v. 318, p. 265-278, 1995.

MC BRIDE, D.J.; TRELSTAD, R.L. AND SILVER, F.H. Structural and mechanical assessment of developing chick tendon. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 10, p. 194-200, 1988.

MC NEILY, C. M. et al. Tendons cell in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J. Anat.*, v. 189, p. 593-600, 1996.

MERRILEES, M. J.; FLINT, M. H. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am. J. Anat.*, v.157, p. 87-106, 1980.

MIAO, M. et al. Structural determinants of cross-linking and hydrophobic domains for self-assembly of elastin-like polypeptides. *Biochem.*, v.44, p. 14367-14375, 2005.

MILZ, S. et al. Fibrocartilages in the extensor tendons of the interphalangeal joints of human toes. *Anat. Rec.*, v. 252, p. 264-270, 1998.

Milz. S. et al. The molecular composition and pathology of entheses on the medial and lateral epicondyles of the humerus – a structural basis for epicondylitis?. *Ann Rheum Dis* v. 63, p. 1015–1021, 2004.

Milz S.; Benjamin M.; Putz R. Molecular parameters indicating adaptation to mechanical stress in fibrous connective tissue. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* v.178, p.1-71, 2005.

NAKAGAWA, Y.; MAJIMA, T.; NAGASHIMA, K. Effect of ageing on ultrastructure of slow and fast skeletal muscle tendon in rabbit Achilles tendons. *Acta Physiol. Scand.*, v. 152, p. 307-313, 1994.

NIMNI M. E.; HARKAESS R. D. Molecular structures and functions of collagen. *In: Collagen*, Boca Raton CRC Press, 1988.

NORDIN, M.; LORENZ, T.; CAMPELLO, M. Biomecânica de tendões e ligamentos. In: Biomecânica básica do sistema músculo-esquelético. Rio de Janeiro: Guanabara Kooan, 2003. 401p.

O'BRIEN M. Functional anatomy and physiology of tendons. *Clin. Sport. Med.*, v.11, p. 505-520, 1992.

O'BRIEN M. Structure and metabolism of tendons. *Scan. J. Med. Sci. Sport.*, v. 7, p. 55-61, 1997.

OLDBERG, A. et al. Collagen-binding 59 kDa protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.*, v. 8, p. 2601-2604, 1989.

OLDBERG, A. et al.. Structure and function of extracellular matrix proteoglycan. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 18, p. 789-792, 1990.

OPSHAL, W.P.; EHRHART, L.A. Compartmentalization of proline pools and apparent rates of collagen and noncollagen protein synthesis in arterial smooth muscle cells in culture. *Biochem. J.*, v. 243, p. 137-144, 1987.

PATERLINI, M.G.; NEMETHY, G.; SCHERAGA, H.A. The energy of formation of internal loops in triple-helical collagen polypeptides. *Biopolymers.*, v. 35, p. 607-619, 1995.

PLAAS, A.H.K. et al. Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 20634-20640, 1990.

RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M.; THORNETT, A. ; Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subject to compression. *Anat. Rec.*, v. 231, p. 167-177, 1991.

ROSEMBERG, K. et al. Cartilage oligomeric protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 20397-20403, 1998.

RUFAL, A.; BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat achilles tendon. *Anat embriol.*, v. 186, p. 611-618, 1992.

RUFAL, A.; RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. *J Orthop. Res.*, v. 13, p. 585-93, 1995.

RUFAL, A.; BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. Ultrastructure of fibrocartilages at the insertion of the rat achiles tendon. *J.Anat.*, v. 189, p. 185-191, 1996.

SCOTT, J.E.; ORFORD, C.R. Dermatan sulphate-rich proteoglycans associated with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem. J.*, v. 197, p. 213-216, 1981.

SCOTT, J.E. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.*, v.252, p. 313-323, 1988.

SMITH, R.K. et al. The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration-hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, v.133, p. 1039-1050, 2002.

SPITZ-FIFE, R.; BRANDT, K,D. Identification of a high-molecular weight, (400000) protein in hyaline cartilage. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 802, p. 506-514, 1984.

SPITZ-FIFE, R. Identification of link proteins and 11600 dalton matrix in canine meniscus. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 241, p. 682-688, 1985.

SUGRUE, S.P. et al. Immunoidentification of type XII collagen in embryonic tissues. *J. Cell. Biol.*, v.109, p. 939-945, 1989.

TIDBALL, J.G; Force transmission across muscle cell membranes. *J. Biomech.*, v. 24, p. 43-52, 1991.

TROTTER, J.A.; CORBETT, J.; AVNER, B.P. Structure and function of the murine muscle-tendon junction. *Anat. Rec.*, v. 201, p. 293-302, 1981.

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

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell Mollec. Biol.*, v. 30, p. 195-204, 1984.

VIDAL, B.C.; CARVALHO, H.F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of Age. *Matrix.*, v. 10, p. 48-57, 1990.

VILARTA R.; VIDAL BC. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix.*, v. 9, p. 55-6, 1989.

VOGEL, K.G.; PAULSSON, M.; HEINEGÅRD, D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.*, v. 223, p. 587-597, 1984.

VOGEL, K.G.; TROTTER, J.A. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll. Rel. Res.*, v. 7, p. 105-114, 1987.

VOGEL, K. G.; KOOB, T. J.. Structural specialization in tendon under compression. *Int. Rev. Cytol.*, v. 115, p. 267-293, 1989.

VOGEL, K.G. et al. Agrecan in bovine tendon. *Matrix Biol.*, v. 14, p. 171-179, 1994.

WAGGETT, A.D. et al., Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human achilles tendon. *Matrix Biol.*, v. 16, p. 457-470, 1998.

ARTIGO 1

**EFEITOS DO ALONGAMENTO SOBRE A MORFOLOGIA E BIOQUÍMICA DA
MATRIZ EXTRACELULAR DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS**

ALMEIDA, F.M.¹; TOMIOSSO, T.C.¹; MATTIELLO-ROSA, S.²; GOMES, L.¹; VIDAL,
B.C.¹; PIMENTEL, E.R.¹

¹ Universidade Estadual de Campinas – Departamento de Biologia Celular

² Universidade Federal de São Carlos – Departamento de Fisioterapia

RESUMO

Muitos trabalhos mostram a relação entre exercício e matriz extracelular dos tendões e descrevem alterações em suas propriedades estruturais e bioquímicas quando submetidos a exercícios prolongados, porém pouco se sabe sobre o que ocorre no tendão que passa por um processo de alongamento. O objetivo deste trabalho foi verificar as alterações na composição e estrutura do tendão calcanear submetidos a um programa de alongamento. Os animais tiveram seus músculos alongados por um período de 30 segundos intercalados com 30 segundos de relaxamento, com 10 repetições, três e cinco vezes por semana durante 21 dias. Para análise morfológica, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina, azul de toluidina, sendo também realizadas a Reação de Feulgen, para análise e contagem dos núcleos e Reação de Von Kossa para detectar a presença de calcificação nos tecidos. Para análise bioquímica, os componentes da matriz extracelular foram extraídos com cloreto de guanidina 4M e analisados em gel de SDS-PAGE. A partir dos extratos totais foram realizadas dosagens de proteínas totais e glicosaminoglicanos. Estes últimos, também foram analisados em gel de agarose-PDA. Nos cortes corados com AT, na região da entese, observou-se um aumento de células com morfologia arredondada. Já na região próxima à

entese do grupo controle e do grupo que foi alongado três e cinco vezes por semana pode ser observado metacromasia, porém esta apresenta-se mais intensa nestes dois últimos grupos. Nas regiões de tensão as células apresentaram-se mais alinhadas. Em ambas regiões ocorreu aumento na quantidade de células. Análise do gel de SDS-PAGE revelou uma maior quantidade de colágeno nos grupos alongados e um componente polidisperso de 65 kDa em todos os grupos. A quantidade de proteínas e de glicosaminoglicanos também foi superior nos animais alongados. O gel de agarose revelou a presença de dermatam sulfato nas regiões de tensão e de compressão e de condroitim sulfato somente nesta última. Esses dados foram confirmados com a utilização de condroitinases. Nossos resultados mostraram que o estímulo do alongamento acarreta mudanças na quantidade e compactação das moléculas de colágeno, no conteúdo de proteínas não colagênicas e de glicosaminoglicanos. A quantidade de células também aumentou nos grupos alongados. Nossos dados também confirmam que os tendões são estruturas bastante dinâmicas e com capacidade de detectar alterações nas forças às quais estão submetidos.

INTRODUÇÃO

Os tendões são descritos como tecidos conjuntivos denso, cuja função é transmitir forças do músculo para os ossos (Birk *et al*, 1989; Cribb, Scott, 1995).

Os tendões variam na forma e no tamanho podendo ser achatados ou cilíndricos, e são encontrados formando a origem e a inserção dos músculos ou nas interseções tendinosas dentro dos músculos. O tendão calcâneo é cilíndrico e é responsável pela fixação dos músculos gastrocnêmio e sóleo no calcâneo. Esses dois músculos são potentes flexores plantares, enquanto que o gastrocnêmio, por cruzar a articulação do joelho posteriormente, também pode participar no processo de flexão do mesmo (Dângelo; Fattini, 1995).

Os tendões apresentam poucas células circundadas por uma extensa matriz extracelular ricas em fibrilas de colágeno tipo I, orientadas ao longo do maior eixo do tendão (Benjamin, Ralphs, 2000; Wagget *et al*, 1998; O'Brien, 1997). Além do colágeno tipo I, os tipos III, V, VI e IX também são encontrados (Gelberman, 1988; Vogel, Koob, 1989).

Outro componente da MEC são os proteoglicanos, que desempenham diversas funções nos tecidos devido à variabilidade da proteína central e dos diversos tipos de glicosaminoglicanos que podem ser encontrados. (Iozzo; Murdoch, 1996). O decorim e o fibromodulim são exemplos de pequenos proteoglicanos e atuam na regulação da fibrilogênese do colágeno (Hedbom; Heinegård, 1989) exercendo um papel importante nas propriedades estruturais e funcionais dos tecidos (Vogel; Fischer, 1986).

Os grandes proteoglicanos, como o agregam, também são encontrados em tendões, especialmente em regiões sujeitas a forças compressivas (Vogel *et al*, 1994).

Além do colágeno e dos proteoglicanos, as proteínas não colagênicas também estão presentes na MEC, correspondem a 0,5% do peso úmido do tendão (Frank *et al*, 1987), sendo representada pela COMP (Hedbom *et al*, 1992), tenascina e fibronectina (Jòsza, 1997).

Alguns tendões que contornam articulações e estão sujeitos a forças compressivas e de fricção além da força de tensão, desenvolvem fibrocartilagem nessas regiões de compressão, acompanhadas de alterações bioquímicas na matriz extracelular (Vogel, Koob, 1989; Gillard *et al*, 1979). Nessas regiões há expressão do colágeno tipo II e níveis elevados de GAGs associados ao agregam (Berenson *et al*, 1996).

O tendão calcanear é um desses tendões que recebe compressão na região da entese e quando contorna o calcâneo. Este tendão vem sendo utilizado para substituir tecidos que suportam altas forças de tensão, como ocorre na reconstrução do ligamento cruzado anterior (Levitt *et al*, 1994), além de ser bastante acometido por tendinopatias em atletas (Smith *et al*, 2002). Em condições normais, o tendão calcanear, está sujeito a forças de tensão e de compressão, às quais são maximizadas durante os procedimentos de alongamento.

O alongamento é definido como uma manobra utilizada para aumentar o comprimento de estruturas de tecidos moles, aumentando assim a amplitude de movimento (KISNER; COLBY, 1998). Destaca-se como um procedimento bastante utilizado por atletas, pessoas saudáveis, que não apresentam nenhuma patologia, para manutenção da amplitude geral, sendo também indicado na reabilitação de pacientes que tenham passado por longo período de imobilização, seja por gesso, tala plástica, ou até mesmo por estar acamado.

Alguns estudos têm mostrado os efeitos da atividade física sobre a MEC de tendões (Woo *et al*, 1980; Kjaer *et al* 2005, 2006), porém, ainda não existem muitos dados sobre as alterações em tendões ocasionadas pelo alongamento. Este é o primeiro trabalho que correlaciona as alterações na morfologia das células e na composição da matriz extracelular devido à utilização de procedimentos de alongamento. Vale ressaltar, que por questões éticas, o trabalho não foi realizado em humanos, sendo feito com ratos. Porém, as conclusões são válidas para serem aplicadas em humanos, devido à semelhança entre os mamíferos, embora existam diferenças biomecânicas entre as espécies. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi

analisar padrões de respostas frente ao estímulo do alongamento, assim como alterações nas características estruturais e bioquímicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos wistar machos, adultos jovens, com três meses pesando entre 250 e 350 gramas. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, com livre acesso à água e ração.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Conforme protocolo utilizado no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, os animais foram divididos em três grupos:

Grupo I: grupo controle, no qual não foi realizado nenhum procedimento. Os animais foram apenas mantidos na gaiola durante o período do experimento

Grupo II: os animais foram submetidos ao alongamento por 30 segundos, com 30 segundos de relaxamento com 10 repetições, 3 vezes por semana num período de 21 dias.

Grupo III: os animais tiveram seus músculos alongados por 30 segundos intercalados com 30 segundos de relaxamento, com 10 repetições, 5 vezes por semana num período de 21 dias.

Para os procedimentos de Morfologia e Bioquímica foram utilizados oito e dez animais em cada grupo, respectivamente.

Após cada sessão de alongamento os animais foram mantidos em gaiolas e em cada uma ficaram apenas dois animais, para que fosse possível uma boa locomoção.

3. PROCEDIMENTOS PARA O ALONGAMENTO

Os animais foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (5 mg/Kg). Para o alongamento, a articulação tibiotársica foi mantida em flexão dorsal na amplitude máxima por 30 segundos intercalados com 30 segundos de relaxamento, sendo realizadas 10 repetições como descrito anteriormente. O alongamento foi feito manualmente a fim de mimetizar uma situação clínica conforme descrito por Ikeda (2003).

4. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após a dissecação, os tendões calcaneares foram fixados em solução de formol 4% em tampão Millonig pH 7,4 durante 24 horas em 4°C. Em seguida as peças foram lavadas em água, desidratadas em banhos de álcool, seguido de diafanização com banhos de xilol e incluídas em parafina (Allkplast). Foram realizados cortes longitudinais com 7 µm de espessura.

4.1. Coloração

Para uma visualização geral do tecido alguns cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (Kiernam, 1981).

As lâminas foram mergulhadas em solução de hematoxilina por 4 minutos, lavadas em água corrente, e posteriormente mergulhadas na eosina por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em uma seqüência alcoólica (70, 80, 95 e 100%), mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

Para detecção de proteoglicanos, foi utilizado Azul de Toluidina 0,025 % em tampão MacIrvine pH 4,0. As lâminas foram deixadas no corante por 15 minutos, lavadas no próprio tampão, colocadas para secar ao ar, mergulhadas rapidamente em xilol e montadas em bálsamo do Canadá (Mello; Vidal, 1980). As observações e documentação foram feitas em microscópio Zeiss Axioplan2 equipado com câmera fotográfica.

4.2 Análise da morfologia do núcleo

Para uma análise mais detalhada sobre o aspecto dos núcleos celulares, algumas lâminas contendo cortes desparafinizados foram submetidas à reação de Feulgen, tendo sido feita a hidrólise ácida com HCl 4 N durante 90 minutos em 25⁰C.

Para cessar a hidrólise as lâminas foram lavadas com HCl 0,1 N, sendo depois tratadas com Reativo de Schiff por 40 minutos. As lâminas foram secadas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá. Foi realizada a contagem dos núcleos com morfologia arredondada e alongada das regiões da entese e de tensão dos diferentes grupos.

4.3 Identificação de calcificação em tendões

Para detectar a presença de regiões de calcificação nos tendões, as lâminas foram tratadas com uma solução de nitrato de prata 1,5% por 30 minutos sob a luz do sol. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em uma solução oxidante de tiosulfato de sódio 5% (Bills *et al*, 1971). Os cortes também foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, para detectar núcleos de células. As lâminas foram secadas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

4.4 Análise morfométrica

A densidade numérica foi realizada com ocular quadriculada com aumento de 12 vezes da Carl-ZEISS, sendo realizada em uma área de 0,15 mm² na região da entese e de 0,4 mm² na região de tensão.

5. ANÁLISE BIOQUÍMICA

5.1 Extração dos componentes da matriz extracelular do tendão.

O tendão calcâneo foi retirado e dividido em duas regiões: a proximal, que recebe forças de tensão, e a distal, que além de tensão também recebe compressão do calcâneo e inclui a região da entese. Os feixes de fibras foram devidamente dissociados em uma placa de petri mantida em torno de 4°C para diminuir o risco de proteólise.

Após rápida lavagem em PBS (NaCl 0,15 M em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4 com EDTA 50 mM), o material foi secado com papel de filtro e pesado. As porções proximal e a distal do tendão foram extraídas com 25 volumes de cloreto de guanidina (GuHCl) 4 M contendo 0,05 M EDTA, 1mM de PMSF em tampão acetato 0,05M pH 5.8 (Heinegård; Sommarin, 1987), por 24 horas, com temperatura de 4° C em constante agitação.

Após a extração, o material foi centrifugado em 13000g durante 25 minutos, a 4°C. Amostras do sobrenadante contendo o material extraído em GuHCl, foram precipitadas para eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, e também foram utilizadas para dosagem de glicosaminoglicanos e proteínas não-colagênicas.

5.2 Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Bradford, (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas em 595 nm.

5.3 Dosagem de glicosaminoglicanos

As dosagens de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) foram realizadas usando DMMB (Azul de Dimetil Metileno) (Farndale *et al*, 1986). Diferentes concentrações de condroitim sulfato (1mg/mL) foram usadas como padrão. As leituras absorciométricas foram efetuadas em leitor de microplacas, em 540 nm.

5.4 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

As proteínas extraídas foram analisadas em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com gradiente (4-16%) de poliácridamida segundo o método de Zingales (1984). O sistema tampão foi de acordo com Laemmili, (1970), com gel de empacotamento contendo 3,5 % de acrilamida. Amostras de 50 µl dos diferentes extratos foram precipitados em 100 µl de tampão acetato de sódio 0,5M pH 7,4 , contendo 9 volumes de etanol, durante 24 horas em 4°C. Depois, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga Fischer Scientific Model 235 Va 8.000, a 9.000 r.p.m. por 5 minutos e lavadas com 150µL de tampão acetato 0,5 M pH 7,4 e 9 volumes de etanol. Nas amostras das regiões de tensão dos grupos alongados esse procedimento foi realizado por duas vezes. O precipitado obtido foi seco em 37° C e ressuspendido em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, EDTA 1 mM em pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01 %. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37 ° 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 para cada gel. Os padrões de peso molecular foram analisados em paralelo, contendo: 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, sendo aplicado 80 µg no gel. Após a corrida o gel foi fixado em metanol 50 %, ácido acético 12 % durante 2 horas, 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; Osborn, 1969).

5.5 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 e Dietrich (1976).

Amostras do tecido das regiões proximal e distal foram tratados com acetona por 24 horas para desidratação, secas a 37° C e pesadas. Essas amostras foram digeridas com papaína na proporção de 40 mg/g de tecido em tampão citrato 30 mM contendo EDTA 40 mM, 2-mercaptoetanol 80 mM em pH 6,4. A digestão foi feita por 24 horas à 50⁰C. Após este tempo o material foi centrifugado em microcentrífuga Fischer, em 9000 r.p.m. durante 4 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 2 volumes de etanol a 4°C por no mínimo 8 horas, sendo então centrifugado. O precipitado foi lavado em etanol 80% (2 volumes), logo em seguida, em acetona (2 volumes) (Michelacci and Horton, 1989), e colocado para secar . Depois de secas, as amostras foram ressuspensas em 5 µl de água milli-Q, aplicando-se 5 µl no gel de agarose. Algumas amostras foram digeridas com condroitinases B e AC. Como padrão foram aplicados 5 µl de uma mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato (1 mg/ml). O tampão utilizado foi o 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 e Dietrich (1976) e Dietrich e colaboradores (1977), corados com Azul de Toluidina 0,1 % em etanol 50 % e ácido acético 1 % durante 5 minutos e descorados em etanol 50 % e ácido acético 1%.

5.6 Digestão enzimática

Para análise dos GAGs, o tecido foi previamente tratado com papaína (40 mg/g de tecido) em tampão citrato 30 mM, contendo EDTA 40 mM, 2-mercaptoetanol 80 mM em pH 6,4 durante 24 horas. A ação da papaína foi interrompida com a adição de ácido iodoacético 4mM por 1 hora. Em seguida, foram utilizadas condroitinases B e AC, produzidas e

gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Yara Michellacci da UNIFESP. A digestão foi feita overnight em 37°C para condroitinase AC e em 20°C para B. Após a digestão, as amostras foram precipitadas em etanol, lavadas em etanol 80% e acetona, ressuspensas em água e aplicadas no gel de agarose. Como padrão também utilizou-se uma mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato (1 mg/mL).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As dosagens e quantificações dos grupos foram comparadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com $p < 0.05$.

RESULTADOS

MORFOLOGIA

Os cortes longitudinais dos tendões controle e alongados três e cinco vezes por semana, foram corados com HE (fig. 1) e AT (fig.2). Também foi realizada Reação de Feulgen (fig. 3) e o Método de Von Kossa (fig. 5) para detectar a presença de calcificação. Todos os cortes foram analisados em microscopia de luz comum.

Nos cortes corados com HE destacaram-se as regiões da entese (figs. 1A, C, E) e a de tensão (figs. 1B, D, F). Na região da entese, nos grupos que foram submetidos a três (fig. 1C) e a cinco (fig 1E) sessões de alongamento semanais, as células apresentaram morfologia e arranjo diferentes, mostrando-se arredondadas e distribuídas em grupos (figs. 1C, E), diferentemente das células do grupo controle, que são mais alongadas (fig. 1A). Na região de tensão (figs. 1B, D, F), foi observado que as células aparecem mais alinhadas e a MEC apareceu mais fortemente corada pela eosina nos grupos que foram submetidos aos procedimentos de alongamento (figs. 1D, F) em relação ao grupo controle (fig. 1B).

Observações feitas em cortes de tendões corados com AT mostraram que na região da entese dos tendões alongados três (fig. 2C) e cinco (fig. 2E) vezes por semana, ocorreu um aumento na quantidade de células em relação ao grupo controle (fig. 2A). Estas células pareciam mais arredondadas. Também foi observado que a MEC territorial, que circunda essas células, encontrava-se mais densamente corada pelo AT, sugerindo que com o estímulo do alongamento ocorra um aumento da síntese de proteoglicanos.

Na região próxima à entese, que contorna a extremidade do calcâneo (figs. 2B, D, F), foi notado um aumento da área metacromática nos tendões dos animais que foram alongados (figs. 2D, F), significando um acúmulo de proteoglicanos nessa região. Curiosamente, este acúmulo de material metacromático não ocorreu em toda largura do tendão, mas delimitada a uma pequena área da região que contorna o calcâneo. A presença de grande quantidade de proteoglicanos ocorre em resposta às forças compressivas, já que as regiões de compressão no tendão calcanear de ratos encontram-se na entese, e também na região em que o tendão contorna o calcâneo.

Para uma melhor visualização dos núcleos e contagem das células em tendões alongados e não alongados, foi realizada a Reação de Feulgen, e analisadas as regiões da entese (figs. 3A, C, E) e a de tensão (figs. 3B, D, F). Na entese dos tendões alongados (figs. 3C, E), observou-se a predominância de núcleos com morfologia arredondada em comparação ao controle, enquanto que a região de tensão (figs. 3D, F) desses tendões, também exibiu um número maior de núcleos, só que estes, apresentaram-se com formato alongado, característico das células da região de tensão.

Os cortes corados pela Reação de Feulgen foram usados para contagem de células nas regiões da entese e tensão de tendões alongados e não alongados (Fig. 4). De acordo com análise morfométrica, nos tendões dos grupos alongados, ambas regiões apresentaram maior quantidade de núcleos tanto com morfologia arredondada, quanto alongada em relação ao

controle, mostrando que o estímulo do alongamento levou a um aumento da celularidade. Entre os grupos alongados, não houve diferença significativa na quantidade de células.

Para avaliar a presença regiões com depósito de cálcio, os cortes foram submetidos à Reação de Von Kossa, e foi observada uma área com acúmulo de cálcio nos três grupos, na região que está sujeita a forças compressivas do calcâneo (fig. 5A, B, C), apresentando-se mais densa nos tendões alongados.

BIOQUÍMICA

Eletroforese em Gel de SDS-Page

Os extratos totais das regiões de tensão e de compressão dos três grupos foram precipitados e analisados em gel de SDS-PAGE, como mostra a figura 6. Na região de tensão (T) do grupo que foi submetido ao alongamento cinco vezes por semana (T/5x) houve a presença mais marcante de colágeno tipo I, quando comparado com a região de tensão dos grupos controle (T/cont) e alongado três vezes (T/3x). Foi observada ainda um componente polidisperso de 65 kDa em todos os grupos e duas proteínas de 71 e 83 kDa, presentes em maior quantidade no grupo alongado cinco vezes por semana.

Comparando-se as regiões de compressão (C) dos diferentes grupos, observou-se um discreto aumento na quantidade de colágeno no grupo alongado três (C/3x), em relação ao controle (C/cont) e ao alongado cinco vezes (C/5x).

Eletroforese em Gel de Agarose-PDA

A eletroforese em gel de agarose do material previamente tratado com papaína, mostrou os tipos de glicosaminoglicanos presentes nas regiões de tensão e de compressão dos diferentes grupos (Figs. 7A, B, C). Em todos os grupos, nas duas regiões foi observada a presença de dermatam sulfato, sendo que a região de compressão também apresentou condroitim sulfato.

Digestão Enzimática

Algumas amostras foram tratadas com condroitinase AC, a qual digere somente condroitim sulfato, e outras com condroitinase B, que degrada dermatam sulfato. A análise em gel de agarose de GAGs da região de tensão mostrou que o GAG não foi digerido por condroitinase AC, mas foi digerido pela B, comprovando tratar-se de DS (fig. 8).

Resultado semelhante foi obtido para os GAGs dos tendões alongados. Na região de compressão foram encontrados GAGs que aparentemente tratavam-se CS e DS. As digestões com condroitinase AC removeu completamente CS e a B removeu o DS, confirmando a presença destes GAGs na região de compressão de tendões alongados e não alongados (Fig 8).

Dosagem de Glicosaminoglicanos e de Proteínas Totais

A quantificação dos GAGs e das proteínas totais está representado nas figuras 9 e 10, respectivamente. As regiões de tensão e de compressão dos grupos alongados apresentaram maior quantidade de GAGs e de proteínas totais em relação ao controle. Quando foi feita a comparação entre os grupos alongados três e cinco vezes, não houve diferença significativa no conteúdo desses componentes da MEC.

DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que o alongamento ocasionou mudanças na morfologia celular e nos constituintes da matriz extracelular. Os tendões alongados exibiram maior celularidade e matriz mais rica em proteínas não colagênicas, glicosaminoglicanos e colágeno, que também mostrou-se mais compactado e alinhado. Este trabalho destaca-se como o primeiro a mostrar que o estímulo de alongamento intermitente de curto período é capaz de alterar os aspectos estruturais e bioquímicos dos tendões com remodelação do tecido.

Outro aspecto importante é que os tendões que foram alongados três vezes por semana exibiram características semelhantes aos que foram alongados cinco vezes. Sendo assim, o alongamento, quando realizado com a frequência de três vezes por semana, já funciona como um estímulo capaz de alterar as características bioquímicas e estruturais dos tendões.

Os tendões servem primariamente para realizar a transferência de força dos músculos para os ossos, sendo capazes de suportar altas forças de tensão (Benjamin; Ralphs, 1998). Além disso, exibem a capacidade de reparação após sofrerem injúria (Mello; Vidal, 2003) e também respondem ao exercício e à imobilização (Frank *et al*, 1987; Woo *et al*, 1988). Essas características sugerem um comportamento dinâmico do tendão, pois suas células são capazes de detectar mudanças na intensidade, direção ou tipo de força mecânica e coordenar sua resposta para alterar a composição da MEC.

Durante o alongamento, o tendão calcâneo recebe uma força de estiramento maior do que o normal tanto na região proximal ou de tensão quanto na distal ou de compressão. Nossas observações mostraram um aumento da metacromasia tanto na entese como na região de compressão de tendões alongados e corados com AT. Este corante catiônico, com estrutura molecular planar (Vidal, 1980) em pH 4, liga-se preferencialmente aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucleicos e aos radicais sulfato e carboxila das cadeias de GAGs na MEC, e tais cadeias estão dispostas longitudinalmente ao longo do eixo principal das fibrilas de colágeno (Vidal, Vilarta, 1988; Mello, Vidal, 2003), de modo a otimizar as interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos GAGs e positivas do colágeno (Vidal, 1964; Mello, Vidal, 1973).

A forte metacromasia observada na região que contorna o calcâneo indica que nesta área há uma maior concentração de PGs, devido a presença mais intensa de forças compressivas. Aparentemente esta compressão não ocorre em toda a largura do tendão, mas parece estar concentrada em uma área determinada da região que contorna o calcâneo.

Na região da entese e também próximo a ela, em tendões alongados, foi observado um aumento na quantidade de células arredondadas assim como um aumento na intensidade de metacromasia, o que indica um maior acúmulo de PGs em resposta ao aumento da força tensional durante o alongamento. Benjamin e Ralphs (1998), descreveram que um dos exemplos mais óbvios da modificação da matriz é a formação de matriz fibrocartilaginosa em sítios em que os tendões estão sob compressão. Essa matriz fibrocartilaginosa contém moléculas características de tecidos fibrosos, como colágeno tipo I e tipo III, que são importantes para resistir às forças de tensão, e também macromoléculas próprias de cartilagem, colágeno tipo II e agregam, que contribuem para resistir às forças de compressão (Wagget *et al*, 1998). Essas alterações como mudanças na morfologia celular e na quantidade de proteoglicanos, observadas na região da entese de tendões alongados, devem ser importantes para que o tendão não sofra deformações na interface com o osso.

As células do tendão são sensíveis às mudanças na força física imposta sobre o tendão (Merrilees *et al*, 1980). Alguns tendões contornam articulações e recebem forças compressivas perpendiculares (Vogel, Koob, 1989; Benjamin, Evans, 1990). Estas, tornam-se mais intensas durante o alongamento, e possivelmente tenham relação com o acúmulo de cálcio observado na região em que o tendão sofre compressão do calcâneo.

Estudos feitos em 1980 por WOO e colaboradores mostraram que em tendões submetidos ao exercício há uma alteração na produção de colágeno que promove mudanças tanto microscópicas e macroscópicas, que levam ao fortalecimento do tendão. No caso do alongamento, observamos, especialmente na região de tensão, a matriz mais fortemente corada nos tendões alongados do que nos não alongados, sugerindo uma presença mais marcante de colágeno ou uma maior agregação dos feixes de colágeno. Nesta região e também na de compressão ocorreu uma maior celularidade nos tendões alongados três e

cinco vezes em relação ao controle. Esses dados foram confirmados com a contagem dos núcleos nas lâminas que foram submetidas à Reação de Feulgen.

A análise da eletroforese dos componentes extraídos em hidrócloro de guanidina 4M mostrou que uma maior quantidade de colágeno foi extraída da região de tensão de tendões alongados cinco vezes, sugerindo que o alongamento ocasiona aumento na produção de colágeno tipo I, tal como ocorre em tendões de animais submetidos a exercícios físicos (Woo *et al*, 1980), e que tem como consequência, o fortalecimento de tendões de músculos exercitados. Esses resultados confirmam as observações feitas em cortes de tendões corados com HE, onde a matriz mais intensamente corada foi encontrada nos tendões alongados. Além da presença de colágeno nas amostras estudadas, merece atenção a presença de uma banda polidispersa, na posição referente a 65 kDa, que foi igualmente encontrada em tendões alongados e não alongados. Este componente apresenta um comportamento eletroforético semelhante ao do pequeno proteoglicano fibromodulim, que está relacionado com a modulação e regulação da fibrilogênese do colágeno, atuando no comportamento das fibrilas (Vogel *et al* 1994; Hedbom, Heinegård, 1989).

Variações regionais ocorrem na composição dos tendões, quando determinadas porções experimentam forças compressivas e de fricção em adição às forças de tensão exercidas pelos músculos. Essas forças levam ao desenvolvimento de estruturas fibrocartilaginosas (Vogel, Koob, 1989, Benjamin, Ralphs, 1998) e sua diferenciação e manutenção são dependentes da estimulação mecânica (Gillard *et al*, 1979; Vogel, Koob, 1989). Uma característica do tendão dessas regiões é a presença de pequenos proteoglicanos, principalmente de dermatam sulfato, na região de tensão (Vogel, Heinegård, 1985) e de grandes proteoglicanos de condroitim sulfato nas regiões que recebem forças compressivas (Koob, Vogel, 1987).

Nossos dados mostraram a presença de CS somente nas regiões de compressão e de DS em ambas regiões tanto no grupo controle como nos alongados três e cinco vezes por semana, mostrando que o alongamento não interferiu no tipo de GAG de cada região. Esses resultados foram confirmados com a utilização de condroitinases AC e B e estão de acordo com o que foi descrito por Covizi e colaboradores em 2001, que mostraram as diferenças regionais ao longo do tendão quanto à estrutura, ao tipo de GAGs, propriedades de intumescimento e distribuição de fibras elásticas em diferentes tendões de ratos.

Em relação à quantidade de GAGs, Benevides e colaboradores (2004), realizaram um estudo comparativo, com tendões flexores superficiais de frangos criados em ambiente restrito e amplo, e mostraram que não houve diferença no conteúdo de GAGs na região de compressão entre esses dois grupos, porém na região de tensão foi descrito uma maior quantidade de GAGs nos tendões de animais criados em ambiente amplo. Nossos resultados mostraram um aumento na quantidade de GAGs nos tendões que foram submetidos ao alongamento em ambas regiões, o que indica que a força aplicada durante esse procedimento foi responsável pelo aumento na síntese de GAGs.

Os tendões alongados três e cinco vezes por semana também exibiram maior quantidade de proteínas nas regiões de tensão e de compressão, como foi descrito Slack e colaboradores (1984), que mostraram maior atividade de síntese dos componentes da matriz em tendões de animais submetidos a atividades físicas mais intensas.

Nossos resultados mostraram alterações morfológicas e estruturais nos tendões dos animais que foram submetidos ao protocolo de alongamento, como ocorrido no músculo sóleo após imobilização e alongamento (Coutinho *et al*, 2004). Com o alongamento, foi observado um aumento no número de células, que passaram a sintetizar mais intensamente os componentes da MEC, visando o fortalecimento do tendão.

Com as informações descritas neste trabalho, torna-se evidente que o alongamento pode ser útil para prevenção de lesões nos tendões, sendo recomendado para pessoas saudáveis e também para pacientes que apresentem algum tipo de tendinopatias, pois acarreta mudanças na quantidade das células e na composição da matriz extracelular, com conseqüente fortalecimento do tendão. Um maior conhecimento sobre os mecanismos de modulação que determinam a readaptação de um tecido frente às mudanças de forças, principalmente relacionadas com a presença maior ou menor de forças de tração, e como as células respondem às mudanças, poderá auxiliar na definição de um programa de tratamento e prevenção de lesões.

Figura 1: Cortes longitudinais de tendões corados com HE. A, C e E correspondem à região da entese de tendões controle (A), alongados três (C) e cinco vezes (E). Observe na entese a presença de células alongadas (►) nos tendões controle (A) e células arredondadas nos tendões alongados (➡) três(C) e cinco vezes (E). B, D e F representam a região de tensão de animais controle (B), alongados três (D) e cinco (F) vezes. Nota-se maior quantidade de células e matriz extracelular mais fortemente (*) corado por eosina, nos tendões alongados (D e F). Barra=75µm

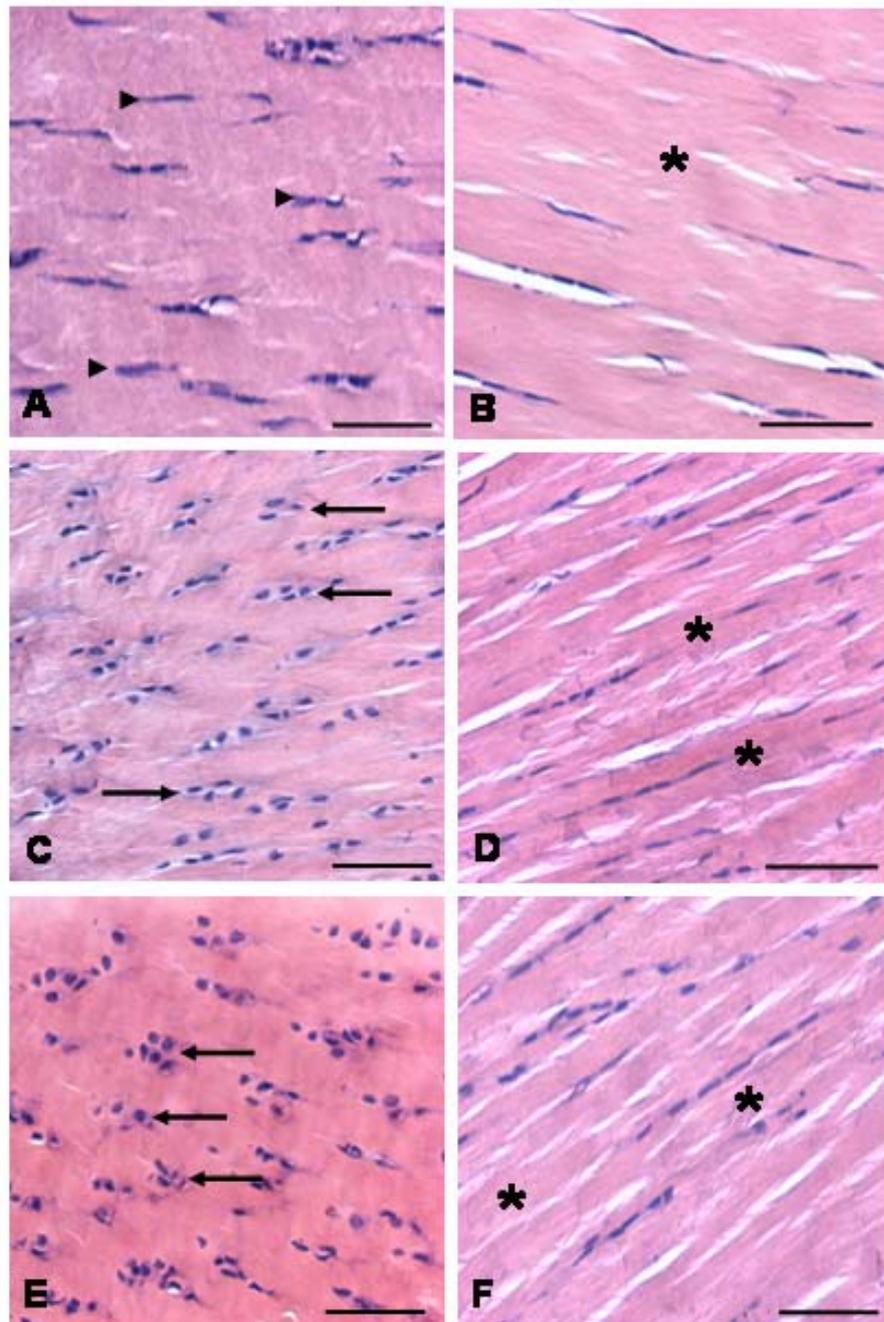


Figura 1

Figura 2: Cortes longitudinais dos tendões corados com AT. A, C e E correspondem à entese de tendões controle (A), alongados três (C) e cinco vezes (E). Observe um aumento na quantidade de células com morfologia arredondada (→) nos tendões alongados (C, E) e matriz territorial mais fortemente metacromática especialmente nos tendões alongados cinco vezes (E). B, D e F correspondem às regiões próximas à entese dos tendões grupo controle (B), alongado três (D) e cinco vezes (F) por semana. Note a metacromasia mais intensa (*) na MEC dos tendões destes dois últimos. Barra=75µm

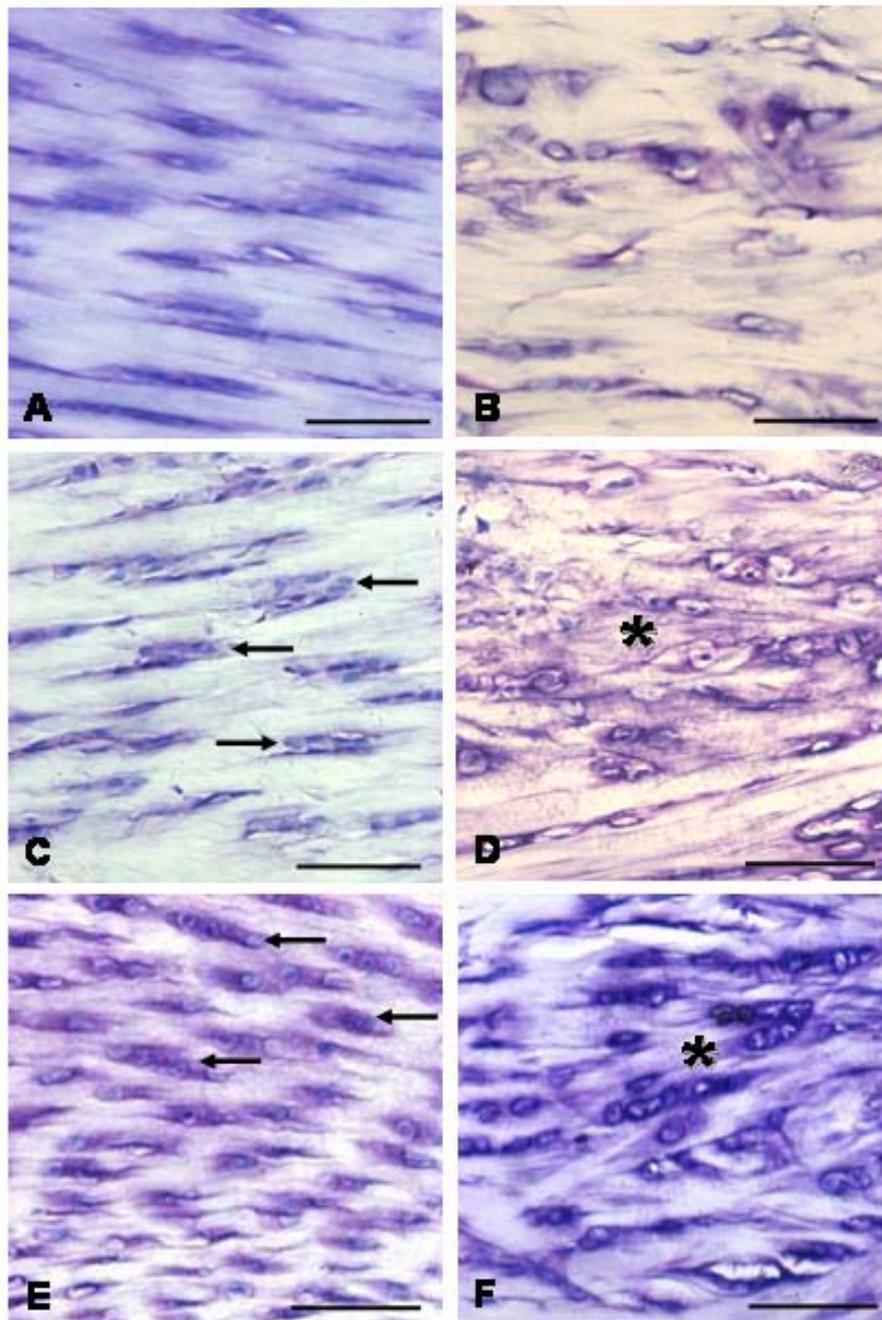


Figura 2

Figura 3: Cortes longitudinais dos tendões, corados pela Reação de Feulgen para evidenciar o núcleo das células. A, C e E representam a região da entese de tendões controle (A), alongados três (C) e cinco vezes (E). Os núcleos da região da entese em tendões alongados (C, E) aparecem arredondados (→) e em maior número do que no controle (A). No caso da tensão, (B, D, F) de animais alongados três (D) e cinco vezes (D), os núcleos (▶) exibem formato alongado. Barra= 100 μm.

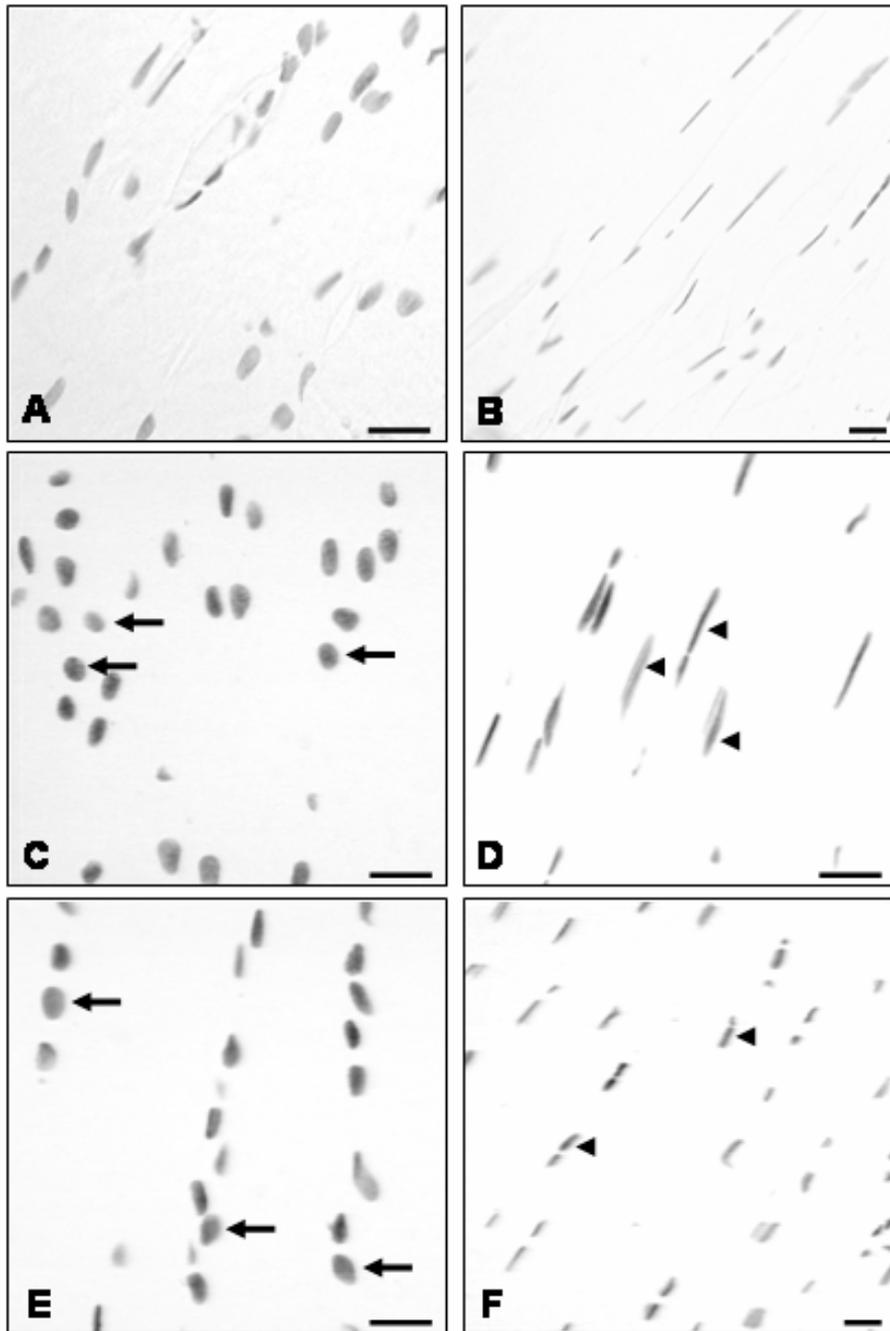


Figura 3

Figura 4: A quantidade de núcleos totais e com morfologia esférica e alongada das regiões da entese e de tensão dos três grupos experimentais. Os valores estão expressos em número de núcleos/mm². Observe que em ambas regiões ocorreu um aumento na quantidade de núcleos nos tendões dos grupos alongados. # $p < 0.05$, quando cada região dos grupos alongados foi comparada com o grupo controle.

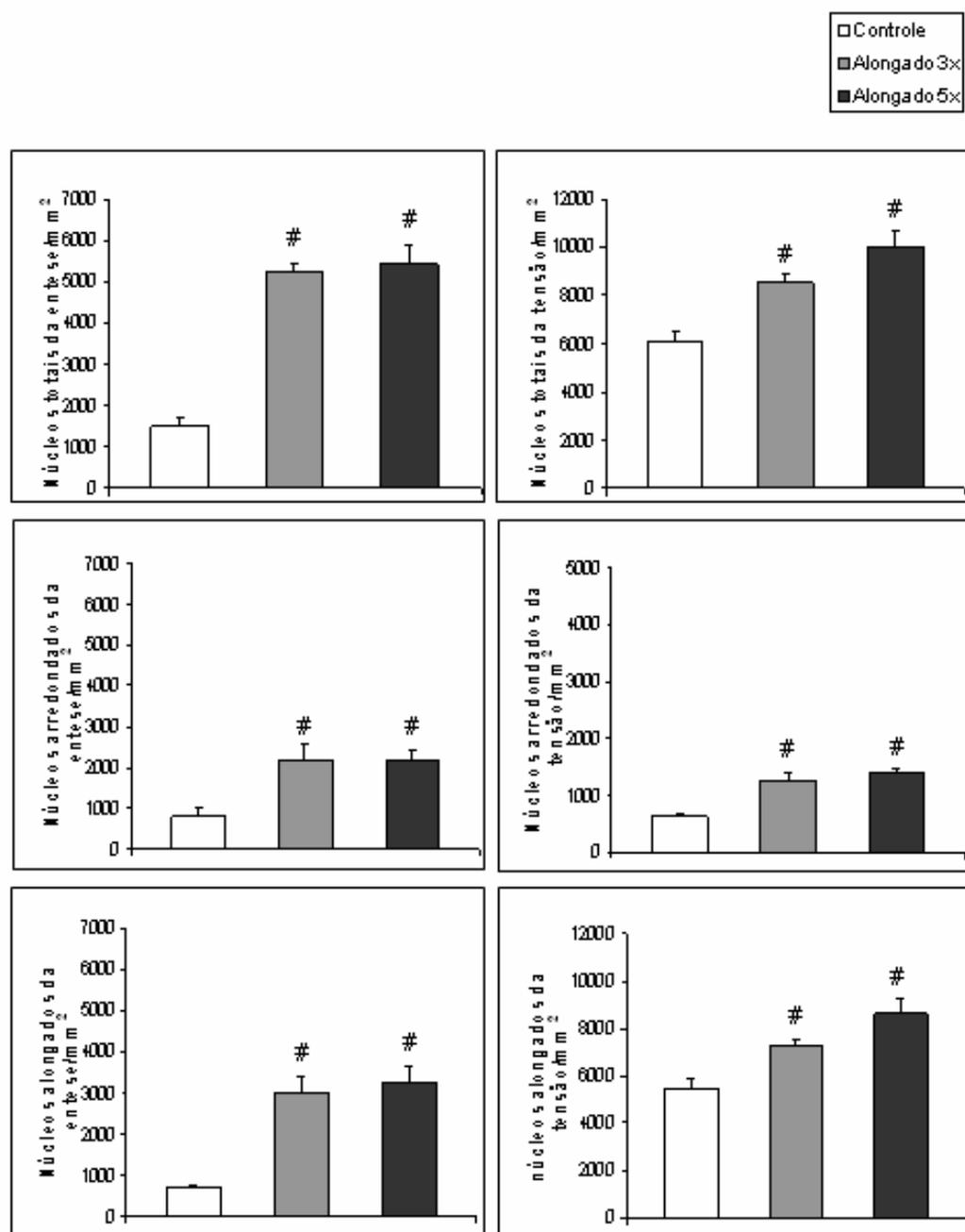


Figura 4

Figura 5: Cortes longitudinais dos tendões submetidos à Reação de Von Kossa e contra-corados com Hematoxilina. Observe que a maior deposição de cálcio (*) ocorre nos tendões alongados três (B) e cinco vezes (C), em relação ao controle (A). Células arredondadas (➔) circundadas por matriz com depósitos de cálcio podem ser vistas no tendão controle. Barra=75µm

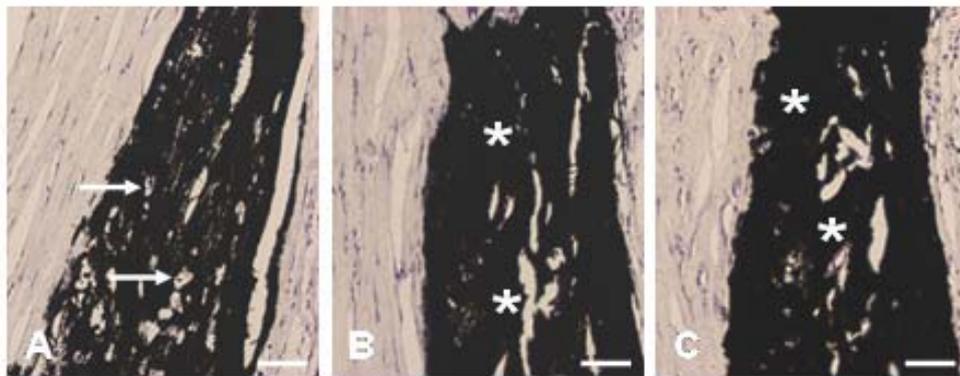


Figura 5

Figura 6: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida das regiões de tensão e compressão dos grupos controle e dos que foram submetidos ao alongamento três e cinco vezes por semana. Nas regiões de tensão (T/cont, T/3x, T/5x), observe a maior quantidade de colágeno tipo I (→) e de proteínas com 71 e 83 kDa (→) no grupo alongado 5x (T/5x). Nas regiões de compressão (C/cont, C/3x, C/5x), note uma maior quantidade de colágeno (→) nos tendões alongados três vezes (C/3x) em relação ao alongado cinco vezes. O componente de 65 kDa (▶) foi igualmente detectado em todas as amostras. Padrões de baixo peso molecular (LMW) e de colágeno tipo I (Col), foram analisados em paralelo no gel. As cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno foram destacadas.

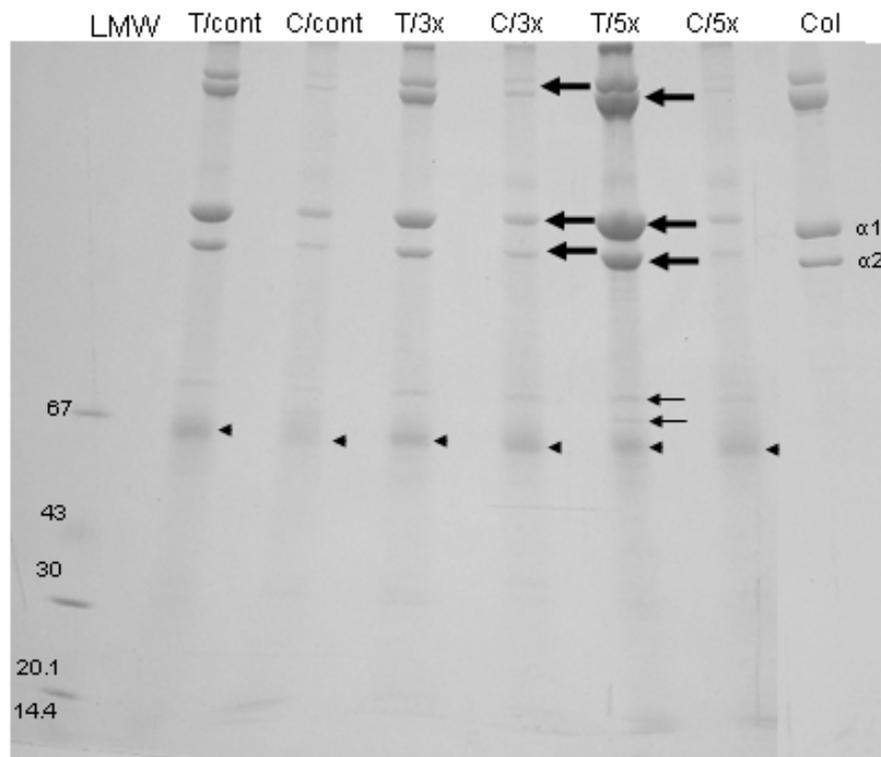
**Figura 6**

Figura 7: Eletroforese em gel de Agarose das regiões de tensão (T) e compressão (C) dos grupos controle, alongado três e cinco vezes. As regiões de tensão de todos os grupos apresentaram dermatam sulfato, enquanto que na região de compressão também ocorreu a presença de condroitim sulfato. Em todos os géis foi utilizado um padrão contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparim sulfato. A seta indica a direção da corrida.

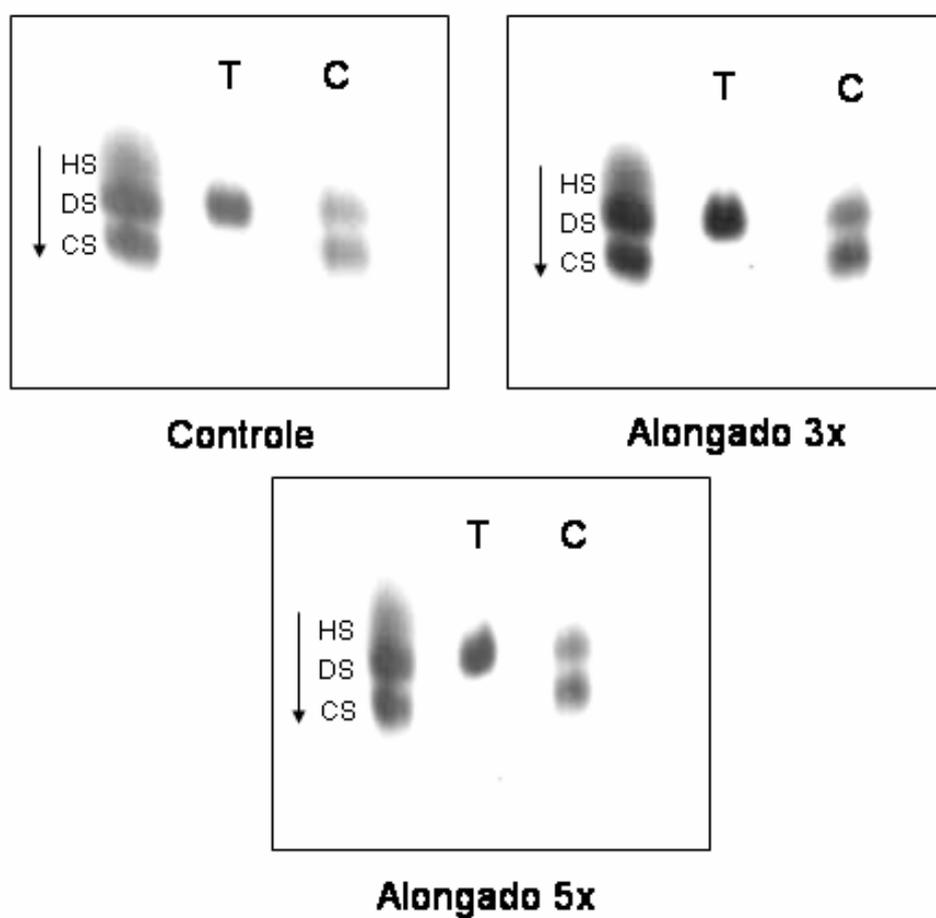
**Figura 7**

Figura 8: Gel de Agarose dos GAGs de tendões controle e alongados sem (1) e com tratamento com chase AC(2) e chase B (3). O GAG da região de tensão de tendões alongados e não alongados não foi digerido por chase AC(2) mas sim pela chase B(3). Na região de compressão aparecem bandas nas posições correspondentes a CS e DS, que foram digeridas respectivamente por chase AC (2) e B (3).

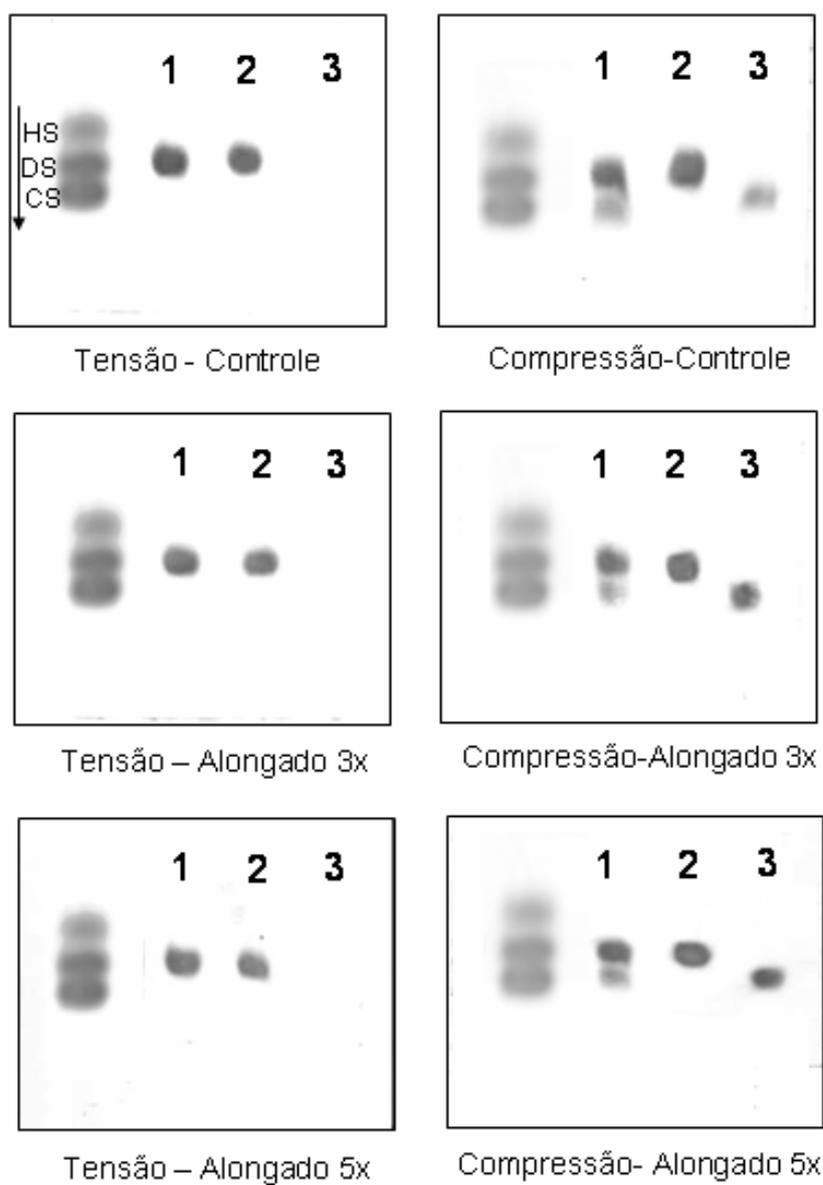
**Figura 8**

Figura 9: Concentrações de glicosaminoglicanos (mg/g de tecido) das regiões de tensão e de compressão dos grupos controle, e dos que foram alongados três e cinco vezes por semana. Em ambas regiões foi observada uma maior quantidade de GAGs nos grupos alongados em relação ao controle. Não houve diferença significativa quando comparou-se a quantidade de GAGs dos grupos alongados três e cinco vezes. # $p < 0.05$, em relação ao grupo controle.

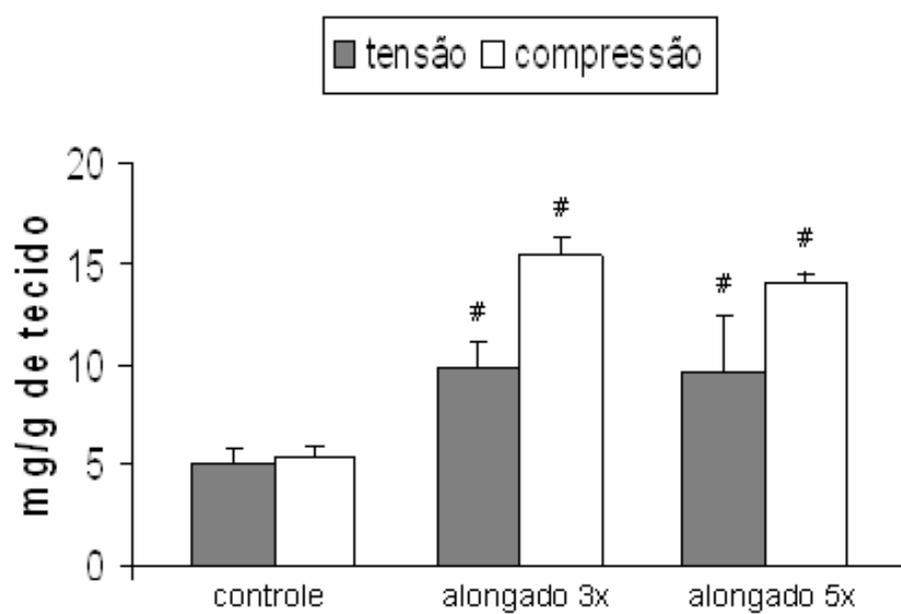


Figura 9

Figura 10: Dosagem de proteínas (mg/g de tecido) das regiões de tensão e de compressão dos diferentes grupos. Observe que os grupos alongados apresentaram maiores quantidades de proteínas quando comparados com o controle. Entre os grupos alongados, não houve diferença significativa no conteúdo de proteínas. * $p < 0.05$, em relação ao grupo controle.

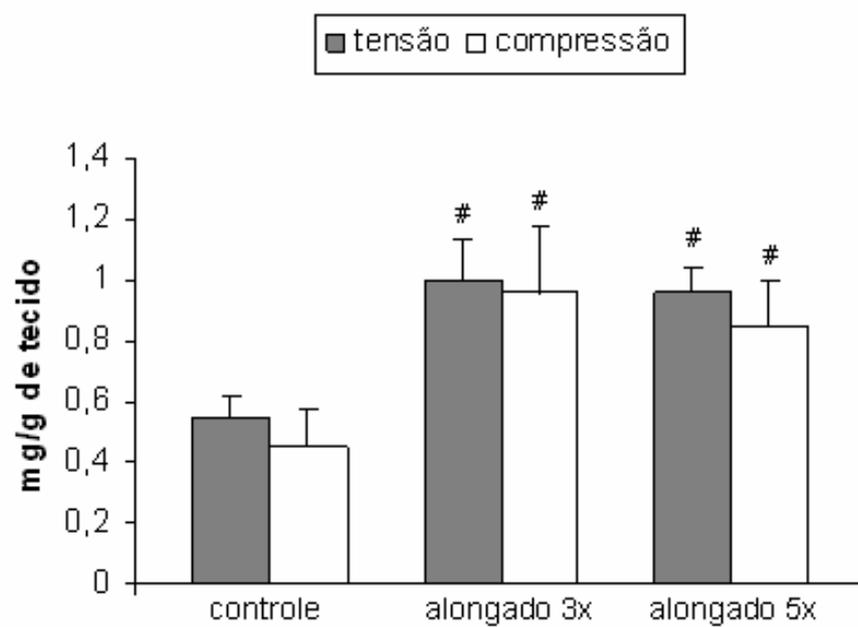


Figura 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENEVIDES GP, PIMENTEL ER, TOYAMA MH, NOVELLO JC, MARANGONE S, GOMES, L, 2004. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res* **45**: 206-215.
- BENJAMIN M, RALPHS JR, 1998. Fibrocartilage in tendons and ligaments – an adaptation to compressive load. *J Anat* **193**: 481-495.
- BENJAMIN M, RALPHS JR, 2000. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol* **196**: 85-130.
- BENJAMIN M, EVANS EJ, 1990. Fibrocartilage. *J Anat* **171**: 1-15.
- BERENSON MC, BLEVINS FT, PLAAS AHK, VOGEL KG, 1996. Protoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res* **14**: 518-525.
- BILLS CE, EISENBERG H, PALLANTE SL, 1971. Complexes of organic acids with calcium phosphate: the von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J* **128**: 194– 207.
- BIRK DE, ZYCBAND EI, WINKELMANN DA, TRELSTAD RL, 1989. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments are intermediates in matrix assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* **86**: 4549-4553.
- BRADFORD MM, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- COUTINHO EL, GOMES ARS, FRANÇA CN, OISHI J, SALVINI TF, 2004. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* **37**: 1853-1861
- COVIZI DZ, FELISBINO L, GOMES L, PIMENTEL ER, CARVALHO H, 2001. Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell* **33**: 483-490.
- CRIBB M, SCOTT JE, 1995. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycans interactions in stressed tendons. *J Anat* **187**:423-428.
- DÂNGELO JGJ, FATTINI CA, 1995. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar.* 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 44-46.
- DIETRICH CP, DIETRICH SMC, 1976. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* **70**: 645-647.
- DIETRICH CP, MCDUFFIE NM, SAMPAIO LO, 1977. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. *J Chromat* **130**: 299-304.

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

FRANK C, WOO S, ANDRIACCHI T, BRAND R, OAKES B, DAHNERS L, 1987. Normal ligament: structure, function and composition. In: WOO S L-Y, BUCKWALTER JA, Eds. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Am. Acad. of Orthop. Surg., Park Ridge, Illinois, p. 45-101.

GELBERMAN R, GOLDBERG V, AN K, BANNES A, 1988 Tendon. In: WOO S L-Y, BUCKWALTER JA, Eds. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Amer. Acad. Orthop. Surg., Park Ridge, Illinois, p. 120-235.

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

HEDBOM E, HEINEGÅRD D, 1989. Interaction of a 59 kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J Biol Chem* **264**: 6896-6905.

HEDBOM E, ANTONSSON P, HJERPE A, AESCHLIMANN D, PIMENTEL ER, SOMMARIN Y, WENDEL M, OLDBERG A, HEINEGÅRD D, 1992. Cartilage matrix protein. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* **267**: 6132-6136.

HEINEGÅRD D, SOMMARIN I, 1987. Proteoglycans: an overview. *Methods in Enzymol* **144**: 305-372.

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

IKEDA S, YOSHIDA A, MATAYOSHI S, TANAKA N, 2003. Repetitive stretch induces *c-fos* and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil*. **84**: 419-23.

JÓZSA LG, KANNUS P, 1997. *Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaigne: *Human Kinetics*, p: 20-75.

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

KJAER M, MAGNUSSON P, KROGSGAARD M, MOLLER JB, OLESEN J, HEINEMEIER K, HANSEN M, HARALDSSON B, KOSKINEN S, ESMARCK B, LANGBERG H. 2006. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J Anat*. **208**: 445-450.

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

- KISNER C, COLBY LA, 1998. *Exercícios Terapêuticos: Fundamentos e Técnicas*. 2ed. São Paulo : Manole, p. 75-89.
- KLAUS W, OSBORN M, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**:4406-4412.
- KOOB TJ VOGEL KG, 1987. Site related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J Orthop Res* **5**: 414-424.
- LAEMMLI VK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- LEVITT RL, MALININ T, POSADA A, MICHALOW A, 1994. Reconstruction of anterior cruciate ligaments with bone-patellar tendon-bone and Achilles tendon allografts. *Clin Orthop* **303**:67-78.
- MELLO MLS, VIDAL BC, 1973. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann Histochem* **18**: 103-122.
- MELLO MLS, VIDAL BC, 1980. *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo: Funcamp, p. 71.
- MELLO MLS, VIDAL BC, 2003. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement newly synthesized collagen fibers. *Cell Molec Biol* **49**: 579-585.
- MERRILEES MJ, FLINT MH, 1980. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat* **157**: 87-106.
- MICHELACCI YM, HORTON DSPQ, 1989. Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. *Comp Biochem Physiol* **92**: 651-658.
- O'BRIEN M, 1997. Structure and metabolism of tendons. *Scan J Med Sci Sport* **7**: 55-61.
- SLACK C, FLINT MH, THOMPSON BM, 1984. The effect of tensional load on isolated embryonic chick tendons in organ culture. *Connect Tissue Res* **12**: 229-247.
- SMITH RKW, BIRCH HL, GOODMAN S, HEINEGÅRD D, GOODSHIP AE, 2002. The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration-hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comp Biochem and Phys Part A* **133**: 1039-1050.
- VIDAL BC, 1964. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. *Protoplasma* **59**: 472-479.
- VIDAL BC, 1980. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell Molec Biol* **26**: 415-421.
- VIDAL BC, VILARTA R, 1988. Articular cartilage: collagen II-proteoglycan interactions. Availability of reactive groups. Variation in birefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem* **83**: 189-205.
- VOGEL KG HEINEGÅRD D, 1985. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* **260**: 9298-9306.

VOGEL K, FISCHER LW, 1986. Comparison of antibody reactivity and enzyme sensitivity between small proteoglycans from bovine tendon, bone and cartilage. *J. Chem Biol* **261** (24): 11334-11340.

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

VOGEL KG, SANDY JD, PAGONY G, ROBBINS JR, 1994. Agrecan in bovine tendon. *Matrix Biol* **14**: 171-179.

WAGGETT AD, RALPHS JR, KWAN APL, WOODNUT D, BENJAMIN M, 1998. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human achilles tendon. *Matrix Biol* **16**:457-470.

WOO SL-Y, RITTER MA, AMIEL D, SANDERS TM, GOMEZ MA, Kuei SC, GARFIN SRH, 1980. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons- long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect Tissues Res* **7**: 177-183.

WOO SL-Y, MAYANARD J, BUTLER D, LYON R, TORZILLI P, AKESON W, COOPER R, OAKES B, 1988. Ligament tendon and joint capsule insertions to bone In: WOO S L-Y, BUCKWALTER JA, Eds. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Am. Acad. of Orthop. Surg., Park Ridge, Illinois.

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

ARTIGO 2

**EFEITOS DO ALONGAMENTO SOBRE AS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E
BIOMECÂNICAS DO TENDÃO CALCANEAR DE RATOS**

ALMEIDA, F.M.¹; TOMIOSSO, T.C.¹; MATTIELLO-ROSA, S.²; GOMES, L.¹;

PIMENTEL, E.R.¹

¹ Universidade Estadual de Campinas – Departamento de Biologia Celular

² Universidade Federal de São Carlos – Departamento de Fisioterapia

Alguns estudos têm mostrado alterações na MEC e nas propriedades mecânicas de tendões devido à prática de atividades físicas, mas muito pouco se sabe sobre os efeitos dos processos de alongamento sobre a MEC dos tendões. O objetivo desse trabalho foi analisar se o alongamento ocasiona mudanças na composição e nas propriedades mecânicas dos tendões. Os animais foram divididos em três grupos: controle, que corresponde aos não alongados, alongados três e cinco vezes por semana, durante 21 dias. Após esse período, os tendões calcaneares foram retirados e utilizados para dosagem de hidroxiprolina e ensaio mecânico sob tração. Análise dos resultados das regiões de tensão e compressão mostrou maiores quantidades de hidroxiprolina nos grupos alongados, sugerindo a presença de uma maior quantidade de colágeno. No ensaio mecânico sob tração, os tendões dos grupos que foram submetidos ao alongamento três e cinco vezes, exibiram valores de tensão máxima superiores, em relação ao controle, porém a deformação sofrida foi semelhante nos três grupos. O Modo de Young OU Módulo Elástico também foi calculado, e os resultados mostraram que os tendões alongados apresentaram-se mais resistentes. Esses dados indicam que o estímulo do alongamento acarreta alterações na síntese dos componentes da matriz e nas propriedades mecânicas dos tendões.

INTRODUÇÃO

Os tecidos e órgãos são estruturas dinâmicas capazes de se adaptarem mecanicamente e estruturalmente em resposta às forças num fenômeno de adaptação funcional, para atender à demanda biomecânica (Hayashi, 1996).

Os tendões não se comportam como um material inextensível, mas agem como molas biológicas que se alongam elasticamente, armazenam e liberam energia durante a locomoção, além de regular a performance mecânica dos músculos (Alexander, 1981; Zajac, 1989). São compostos principalmente por moléculas de colágeno do tipo I, que estão arranjadas em fibras e feixes de fibras, dispendo-se paralelamente ao maior eixo do tendão (Vidal, 1970; Nimni, Harkness, 1988; Vidal, Carvalho, 1990; Liu *et al.*, 1995; O'Brien, 1997) em combinação com proteoglicanos e proteínas não colagênicas.

As moléculas de colágeno são constituídas por três cadeias α , formando uma tripla hélice. Geralmente as extremidades não estão em conformação helicoidal, favorecendo a ocorrência de ligações cruzadas (crosslinks) entre as moléculas. Estas, associam-se para formar as fibrilas e posteriormente as fibras colágenas. 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 (Birk *et al.*, 1989; Vilarta, Vidal, 1989; Vidal, Carvalho, 1990). 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; Aspden, 1985).

Cribb e Scott (1995) destacaram a função dos proteoglicanos na estabilidade estrutural dos tendões e descreveram que essas moléculas encontram-se arranjadas ortogonalmente em relação aos feixes de colágeno. Alguns estudos têm sugerido que o “core” protéico dos proteoglicanos estão inclinados em relação aos feixes de colágeno e os glicosaminoglicanos ficariam dispostos paralelamente a esses feixes (Vidal; Mello, 1984).

Os feixes de colágeno em repouso apresentam arranjos regulares e sinuosos denominados de "crimp" (Gathercole; Keller, 1991) que permitem ao tendão reduzir o impacto de uma força de tração sobre o osso onde o tendão se insere. Sob tensão, esse padrão ondulado do crimp se altera, não sendo mais visível, sugerindo que a extensão inicial do tendão envolve o alongamento do crimp (Cribb; Scott, 1995).

A curva de Tensão – Deformação do tendão é caracterizada por uma região inicial não linear, com baixa tensão, conhecida como “toe region”. Em seguida, há uma região linear, caracterizada como a fase elástica do tendão e por último, encontra-se uma região não linear, na qual ocorre ruptura do tendão (Silver *et al*, 1992). Na “toe region”, uma pequena força de tensão é necessária para que ocorra alongamento do crimp, iniciação do alongamento da tripla hélice, das extremidades não helicoidais e dos crosslinks (Mosler *et al*, 1985). Na região linear, o alongamento molecular e o deslizamento molecular e fibrilar são os modos predominantes de deformação, até ocorrer a ruptura do tendão, após a quebra das ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno e fibrilas (Silver *et al*, 1987; Torp *et al*, 1975).

As propriedades mecânicas dos tendões têm sido bastante estudadas. Alguns trabalhos mostraram que essas propriedades alteram-se durante o desenvolvimento, com a idade (Torp *et al*, 1975; Mc Bride, 1988) e em resposta à atividade física (Woo *et al*, 1980).

Porém ainda não existem muitos estudos relacionando propriedades mecânicas, ou composição da MEC de tendões com um protocolo de alongamento. Nosso estudo é o primeiro a verificar as propriedades biomecânicas dos tendões que foram submetidos a

alongamentos intermitentes e embora por questões éticas, tenha sido desenvolvido em ratos, as conclusões são aplicáveis para humanos. Assim, nosso objetivo foi avaliar o conteúdo de colágeno das regiões de tensão e compressão de tendões calcaneares de ratos submetidos ao alongamento e também os efeitos deste procedimento sobre as propriedades mecânicas desse tecido.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos wistar machos, adultos jovens, com três meses pesando entre 250 e 350 gramas. Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, com livre acesso à água e ração.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Conforme protocolo utilizado no Laboratório de Neurociências do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, os animais foram divididos em três grupos:

Grupo I: grupo controle, no qual não foi realizado nenhum procedimento. Os animais foram apenas mantidos na gaiola durante o período do experimento

Grupo II: os animais foram submetidos ao alongamento por 30 segundos, com 30 segundos de relaxamento com 10 repetições, 3 vezes por semana num período de 21 dias.

Grupo III: os animais tiveram seus músculos alongados por 30 segundos intercalados com 30 segundos de relaxamento, com 10 repetições, 5 vezes por semana num período de 21 dias.

Após cada sessão de alongamento os animais foram mantidos em gaiolas e em cada uma ficaram apenas dois animais, para que fosse possível uma boa locomoção.

3. PROCEDIMENTOS PARA O ALONGAMENTO

Os animais foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (5 mg/Kg). Para o alongamento, a articulação tibiotársica foi mantida em flexão dorsal na amplitude máxima por 30 segundos intercalados com 30 segundos de relaxamento, sendo realizadas 10 repetições como descrito anteriormente. O alongamento foi feito manualmente a fim de mimetizar uma situação clínica conforme descrito por Ikeda (2003).

4. ANÁLISE BIOQUÍMICA

4.1 Quantificação de hidroxiprolina

Amostras das regiões de tensão e de compressão foram hidrolisadas em HCl 6N na proporção de 1mL para cada 10 mg de tecido, por 4 horas a 130° C. Do material hidrolisado, foram utilizados somente 5µL para cada leitura. A essa quantidade de amostra foi acrescentado 1 mL de solução de cloramina T (1,41 g de cloramina T, 10 mL de água, 10 mL de n-propanol e 80 mL de tampão pH 6,0). Após 20 minutos foi adicionado 1 mL de aldeído perclórico (15 g de dimetilaminobenzaldeído, 60 mL de n-propanol, 26 mL de ácido perclorico a 60% e n-propanol para completar o volume para 100 mL). O material foi incubado por 15 minutos em 60° C, resfriado e analisado em espectrofotômetro em 550nm.

5. ENSAIO MECÂNICO SOB TRAÇÃO

Após o sacrifício dos animais, os músculos gastrocnêmio e sóleo, o tendão calcâneo, o osso calcâneo e também as falanges foram retiradas, como uma peça única. Seis tendões de cada grupo foram utilizados para o ensaio mecânico, e estes foram mantidos em solução fisiológica até o momento do teste para evitar o ressecamento das fibras. Antes do teste, determinou-se o comprimento, a largura e a espessura de cada tendão com o auxílio de um

paquímetro e retiraram-se os músculos ao final do tendão. Os tendões foram fixados por garras ao anteparo mecânico, que prenderam a junção miotendinosa em uma extremidade e os ossos próximos ao calcâneo na outra, conforme descrito por Benevides *et al*, 2004.

Os testes foram realizados em máquina servohidráulica de teste de materiais, modelo TETSTAR II, da marca MTS do Departamento de Engenharia de Materiais na Faculdade de Engenharia Mecânica – UNICAMP. Durante o teste, os tendões foram submetidos a um aumento gradual de carga em uma velocidade constante de 20 mm/min usando célula de carga de 1KN (Tohyama; Yasuda, 2000) até ocorrer o rompimento do tendão.

Para cada grupo foram analisados os valores de secção transversa ($ST = \pi \times R \times r$, onde R é o raio maior, e r o menor), de força máxima, deslocamento máximo, tensão máxima ($T = \text{força máxima} / \text{área de secção transversa}$) Esses dados referem-se à média dos valores encontrados nos tendões de cada grupo.

Com as médias aparentes da tensão e deformação, feitas a partir da superposição dos valores, construiu-se o gráfico de Tensão x Deformação ($L = L_f - L_i / L_i$, onde L_f é o comprimento final antes de ocorrer a ruptura do tendão, e L_i é o comprimento inicial). Com esse gráfico, foi possível calcular o Módulo de Young ou Módulo elástico que determina a rigidez do tecido, e é definido como a inclinação da porção linear da curva na fase elástica (Louis-Ugbo *et al*, 2004)

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As dosagens e quantificações dos grupos foram comparadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com $p < 0.05$.

RESULTADOS

Dosagem de Hidroxiprolina

A quantificação de hidroxiprolina foi feita para estimar uma possível variação no conteúdo de colágeno em tendões alongados e não alongados. A região de tensão do grupo que foi submetido ao alongamento 5 vezes por semana apresentou maior concentração quando comparado com os grupos controle e alongado 3 vezes, sendo essa diferença altamente significativa (Fig. 1).

Na região de compressão dos grupos alongados, observou-se maior quantidade de hidroxiprolina em relação ao controle. Porém, quando comparou-se o conteúdo de hidroxiprolina dos grupos alongados três e cinco vezes, não houve diferença significativa entre os mesmos.

ENSAIO MECÂNICO SOB TRAÇÃO

Os tendões dos grupos controle e alongados, apresentaram comportamentos diferentes durante o ensaio mecânico sob tração. Foram analisados dados reais que correspondem à média dos valores máximos de cada parâmetro, assim como valores aparentes, que se referem a uma superposição das curvas para construção dos gráficos de tensão x deformação.

Análises dos dados reais mostraram que a secção transversa dos tendões (fig. 2A) e o deslocamento (fig. 2B) sofrido foram semelhantes nos três grupos, não havendo diferença significativa entre os valores. A força máxima (fig. 2C) e a tensão máxima (fig. 2D) foram significativamente superiores nos grupos alongados, quando comparada com o controle, não havendo diferença significativa entre os alongados. Os valores de tensão máxima dos grupos controle, alongados três e cinco vezes foram de 1,03, 1,28 e 1,22N, respectivamente. Essa diferença entre os valores de tensão máxima ($T = \text{força}/\text{área}$) ocorreu devido ao aumento da

força, tendo em vista que a secção transversa dos tendões dos três grupos apresentou-se semelhante. Sendo assim, estes tendões foram capazes de suportar forças maiores, sofrendo um deslocamento semelhante ao do grupo controle.

No gráfico de tensão x deformação (fig. 3), os tendões alongados exibiram valores de tensão superiores quando comparados com o controle. A deformação sofrida apresentou-se semelhante nos três grupos, sugerindo que os tendões alongados são capazes de suportar maiores cargas de tensão do que os tendões não alongados. Ainda nesse gráfico, foram feitos os cálculos do módulo elástico ou módulo de Young (fig. 4), no qual os tendões alongados três e cinco vezes exibiram valores superiores ao do controle, o que indica que estes primeiros são mais resistentes. Os valores do módulo elástico dos tendões do grupo controle e dos alongados três e cinco vezes foram 33, 53 e 49MPa, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os valores dos grupos alongados.

DISCUSSÃO

A maior quantidade de hidroxiprolina encontrada na região de tensão dos animais alongados cinco vezes em relação ao alongado três vezes e ao controle, sugere que o alongamento estimula as células a produzirem mais colágeno (Woo et al, 1980; Benevides et al, 2004). Porém, os resultados dos testes mecânicos não acompanharam a proporção de hidroxiprolina, ou seja, os tendões alongados três e cinco vezes, exibiram valores semelhantes de módulo elástico, o que indica que ambos têm a mesma rigidez, porém, maior que do controle. Dessa forma, supõe-se que embora tenha ocorrido um estímulo na síntese de colágeno, especialmente na região de tensão do grupo alongado cinco vezes, os feixes colagênicos não exibiram maior resistência à ruptura. É possível que neste caso, os feixes de colágeno recém-formados, não apresentassem ligações cruzadas suficientes para suportar maiores níveis de tensão.

Os tendões exibem respostas adaptativas ao uso crônico e ao desuso, além de desenvolverem propriedades mecânicas diferentes devido às alterações nas forças e funções (Butler *et al*, 1978; Woo *et al*, 1980). Shadwick em 1990, realizou um estudo comparativo utilizando tendões flexores e extensores de porco e demonstrou que os flexores, que são tendões sujeitos a níveis de forças mais intensas, eram mais espessos e também mais elásticos que os extensores.

Estudos feitos por Curwin e colaboradores (1988) mostraram alterações nas propriedades estruturais e bioquímicas de tendões de animais submetidos a um programa de exercícios prolongados. Em nosso estudo também foram encontradas alterações bioquímicas e nas propriedades biomecânicas devido ao protocolo de alongamento utilizado, em que o tendão sofre uma força de tensão maior durante um determinado período. A força de tensão possui um efeito positivo na resposta de reparo intrínseca do tendão, pois aumenta a proliferação dos fibroblastos, a síntese protéica, ocasionando um aumento de colágeno na matriz extracelular (Slack *et al*, 1984)

A curva de tensão x deformação de um tendão pode ser dividida em três regiões: a toe region, que é o início da curva, caracterizada pelo alongamento dos crimps, a região linear, na qual o tendão é reversivelmente extensível e a região de ruptura, na qual a extensão das fibras do tendão prejudica sua estrutura (Cribb; Scott, 1995). Análise das curvas de tensão x deformação dos tendões do grupo controle e dos alongados três e cinco vezes por semana, mostraram que os tendões alongados suportaram níveis de tensão superiores, antes de romperem. Em 1995, Cribb e Scott compararam a tensão dos tendões da cauda de ratos com idades de 3 e 10-12 semanas e constataram que os tendões deste último grupo suportaram níveis superiores de tensão, antes da ruptura. Essa resistência à tensão está provavelmente relacionada à quantidade de cross-links entre as moléculas de colágeno (Viidik, 1978).

As fibrilas de colágeno organizadas em fibras, também são responsáveis pela estabilização da estrutura e dos atributos mecânicos do tecido (Ezura, 2000).

Os valores de módulo elástico encontrados neste trabalho diferem dos encontrados em tendões humanos, onde esses valores foram 585 MPa para aponeurose plantar (Kim; Voloshin, 1995), 1161-1673 MPa para tendões da mão (Carlson *et al*, 1993), 504-660 MPa para o tendão patelar (Johnson *et al*, 1994) e 1160 MPa para o tendão do músculo gastrocnêmio (Magnarius; Paul, 2002). Esses valores são superiores aos encontrados em tendões de ratos, por estarem sujeitos a forças fisiológicas diferentes.

Este trabalho demonstrou que o alongamento ocasionou alterações no conteúdo de colágeno e nas propriedades biomecânicas, tendo em vista que os tendões alongados apresentaram-se mais resistentes à ruptura. Assim, torna-se evidente que alterações nas forças biomecânicas que atuam sobre os tendões acarretam alterações no conteúdo dos componentes da matriz extracelular, a fim de que o tecido suporte uma maior demanda funcional.

Figura 1: Concentração de hidroxiprolina (mg/g de tecido) das diferentes regiões de cada grupo. Observe a região de tensão dos animais alongados cinco vezes com maior concentração de hidroxiprolina. Já na região de compressão dos tendões alongados três e cinco vezes, ocorre maior concentração de hidroxiprolina em relação ao controle, mas não há diferença significativa entre os grupos alongados. * $p < 0.05$, entre as regiões de tensão alongadas; # $p < 0.05$ em relação ao controle.

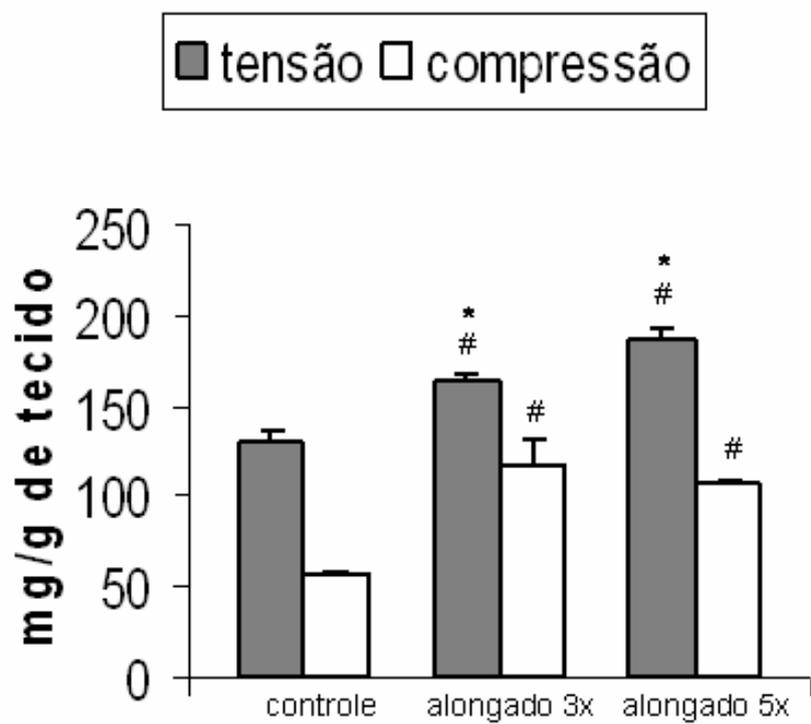


Figura 1

Figura 2: Gráficos sobre as propriedades mecânicas do tendão calcâneo de ratos alongados e não alongados. A secção transversa (fig. 2A) e o deslocamento sofrido (fig. 2B) durante o teste foram semelhantes nos tendões dos grupos controle e alongados. Observe que a força máxima (fig. 2C) e a tensão máxima (fig. 2D) foram maiores nos tendões dos animais submetidos ao alongamento três e cinco vezes. # $p < 0.05$ em relação ao controle

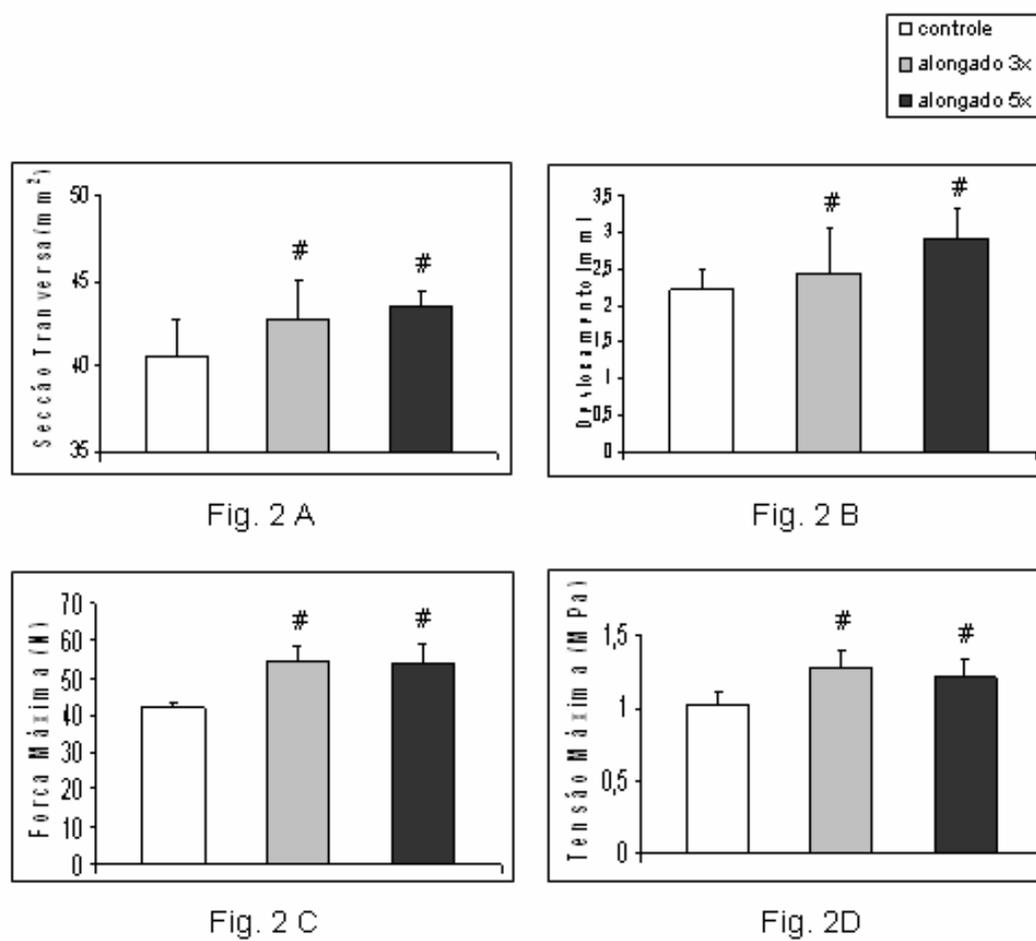
**Figura 2**

Figura 3: Curva de Tensão x Deformação do tendão calcâneo de ratos alongados e não alongados. Note que os tendões dos grupos alongados três e cinco vezes apresentaram valores de tensão máxima superiores em relação ao controle, com deformação semelhante. Os desvios padrões estão representados nos eixos x e y.

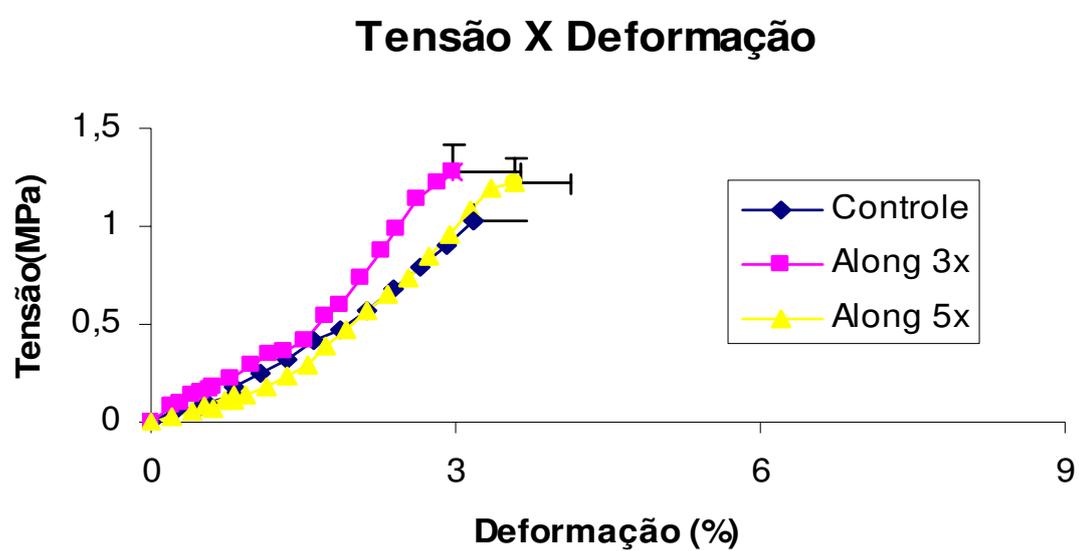


Figura 4: Gráfico ilustrando os valores do módulo elástico dos tendões calcaneares dos grupos controle e dos alongados três e cinco vezes. Note que estes últimos apresentaram valores superiores, em relação ao controle, não havendo diferença significativa entre os mesmos. # $p < 0.05$ em relação ao controle.

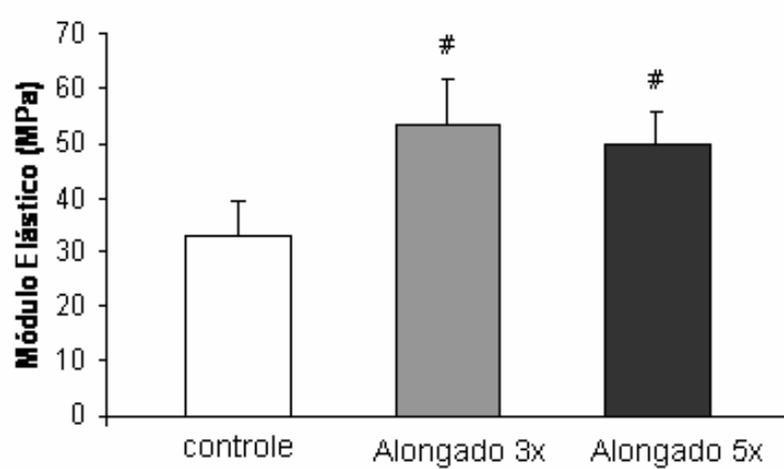


Figura 4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander R (1981). Mechanisms of skeleton and tendons. In: Brook B (Editor), *Handbook of Physiology, section A, The Nervous System*. vol 2. Am. Phys. Soc. Washington.
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangone S & Gomes L (2004). Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connective Tissue Research*, 45: 206-215.
- Birk DE, Zycband EI, Winkelmann DA & Trelstad RL (1989). Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments are intermediates in matrix assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 4549-4553.
- Butler DL, Goods ES, Noyes FR & Zernick RF (1978). Biomechanics of ligaments and tendons. *Exercise and Sports Science Reviews*, 6: 125-181.
- Carlson GD, Botte MJ, Josephs MS, Newton PO, Davis JL, & Woo, SL (1993). Morphological and biomechanical comparison of tendons used as free grafts. *Journal of Hand Surgery*, 18: 76-82.
- Cribb AM & Scott JE (1995). Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen and proteoglycan interactions in stressed tendon. *Journal of Anatomy*, 187: 423-428.
- Curwin SL, Vailas AC & Wood J (1988). Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *Journal of Applied Physiology*, 65: 2297-2301.
- Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I, & Birk D E (2000). Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *Journal of Cell Biology*, 151: 779-787.
- Gathercole LJ, & keller A (1991). Crimp Morphology in the Fibre-Forming Collagen. *Matrix*, 11: 214-234.
- Hayashi K(1996) Biomechanical studies of the remodeling of knee joint tendons and ligaments. *Journal of Biomechanics*, 29:707-716.
- Hukins DW & Aspden RM (1985). Composition and properties of connective tissues. *Trends in Biochemical Science*, 10: 260-264.
- Ikeda S, Yoshida A, Matayoshi S, Tanaka N (2003). Repetitive stretch induces *c-fos* and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. *Arch Phys Med Rehabil*. 84: 419-23.
- Johnson GA, Tramaglini DM, Levine RE, Choi NY, & Woo SL (1994) Tensile and viscoelastic properties of human patellar tendon. *Journal of Orthopaedic Research*, 12: 796-803.
- Kim W & Voloshin AS (1995). Role of plantar fascia in the load bearing capacity of the human foot. *Journal of Biomechanics*, 28: 1025-1033.

Louis-Ugbo J, Leeson B & Hutton W (2004). Tensile properties of fresh human calcaneal (Achilles) tendons. *Clinical Anatomy*, 17: 30-35.

Liu SH, Yang RS, Shaikh R, & Lane JM (1995). Collagen in tendon, ligament and bone healing. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 318: 265-278.

Magnaris CN & Paul JP (2002). Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon. *Journal of Biomechanics*, 35: 1639-1646.

Mcbride DJ, Trelstad RL, & Silver FH(1988). Structural and mechanical assessment of developing chicken tendon. *International Journal of Biological Macromolecules*, 10: 194-200.

Nimni ME & Harkness R(1988).D. Molecular structures and functions of collagen. In: Nimni ME (Editor) *Collagen*. Vol. 1. Biochemistry Boca Raton CRC Press.

Mosler E, Folkhard W, Knorz E, Nemetscek-Gansle H, Nemetscek, TH & Koch, MH(1985). Stress induced molecular arrangement in tendon collagen. *Journal of Molecular Biology*, 182, 589-596.

O'brien M (1997). Structure and metabolism of tendons. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 7: 55-61.

Shadwick RE (1990). Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *Journal of Applied Physiology*, 68: 1033-1040.

Slack C, Flint MH, & Thompson BM (1984). The effect of tensional load on isolated embryonic chick tendons in organ culture. *Connective Tissue Research*, 12: 229-247.

Silver FH (1987). Self-assembly of connective tissue macromolecules. In: *Biological Materials: Structure, mechanical properties and modeling of soft tissues*. New York .p. 91-95.

Silver FH, Kato YP, Ohno M & Wasserman AJ (1992). Analysis of mammalian connective tissue: relationship between hierarchical structures and mechanical properties. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 2:165-198.

Torp S, Baer E & Friedman B (1975). Effects of age and of mechanical deformation on the ultrastructure of tendon. *Colston Papers*, 26: 223-250.

Tohyama H & Yasuda K (2000). The Effects of stress enhancement on the extracellular matrix and fibroblasts in the patellar tendons. *Journal of Biomechanics*, 35, 558-565.

Vidal BC (1970) Dichroism on collagen bundles stained with Xylydine Ponceau 2R. *Annals of Histochemistry*, 115: 289-296.

Vidal BC & Mello, MLS (1984). Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cellular and Molecular Biology*, 30: 195-204.

Vidal BC & Carvalho HF(1990). Aggregational State and Molecular Order of Tendons as a Function of Age. *Matrix*. 10: 48-57.

Viidik, A (1978). On the correlation between structure and mechanical function of soft connective tissues. *Verhandlugen der Anatomischen Gesellschaft*, 72: 75-89.

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: 55-6.

Woo SL-Y, Ritter MA, Amiel D, Sanders TM, Gomez MA, Kuei SC, Garfin SR & Akeson WH (1980). The biomechanical and biochemical properties of swine tendons- long term effects of exercise on the digital extensors. *Connective Tissues Research*, 7: 177-183.

Zajac EF(1989). Muscle and tendon: properties, models, scaling and application to biomechanics and motor control. *CRC Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 17, 359-411.

CONCLUSÕES

- O alongamento ocasionou mudanças na morfologia, na quantidade, no alinhamento e no metabolismo das células, que passaram a sintetizar maiores quantidades dos componentes da matriz extracelular;
- Os tendões alongados exibiram maiores quantidades de glicosaminoglicanos, de proteínas não colagênicas e de colágeno;
- Os procedimentos de alongamento não interferiram no tipo de glicosaminoglicano das regiões de tensão e de compressão. A primeira apresentou dermatam sulfato, enquanto que nesta última constatou-se a presença de condroitim sulfato e de dermatam sulfato;
- Os tendões dos animais dos grupos alongados mostraram-se mais resistentes à ruptura, quando submetidos aos ensaios mecânicos sob tração.
- Analisando as alterações ocorridas nos tendões, ficou evidente que os procedimentos de alongamento realizados três vezes por semana têm o mesmo efeito do que os com a frequência de cinco vezes.