

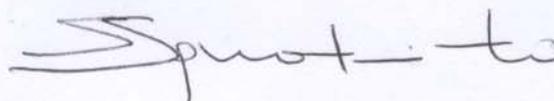
**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

---

**FACOLTÀ DI SCIENZE MOTORIE**

**Dottorato di Ricerca in Discipline delle Attività Motorie e Sportive  
Ciclo XXII**

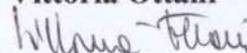
**Settore scientifico disciplinare: BIO/16 Anatomia Umana  
Coordinatore: Chiar.mo Prof. Salvatore Squatrito**



**Correlazioni morfo-funzionali nei tessuti  
connettivi sopra- e sottopatellari**

**Presentata da:  
Dott.ssa Maria Macciocca**

**Relatore:  
Chiar.ma Prof.ssa  
Vittoria Ottani**



**Correlatore:  
Dott. Marco Franchi**

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>Capitolo 1</b>	
<b>ANATOMIA MACROSCOPICA DEI TENDINI</b>	<b>4</b>
1.1 Annessi tendinei	4
1.2 Vascolarizzazione	8
1.3 Innervazione	10
<b>Capitolo 2</b>	
<b>ANATOMIA MICROSCOPICA DEI TENDINI</b>	<b>12</b>
2.1 Collagene: struttura molecolare e assemblaggio	13
2.2 Collagene: aggregazione extracellulare	16
2.3 Crimps tendinei	23
2.4 Fibre elastiche	26
2.5 Proteoglicani	27
2.6 Glicoproteine	32
2.7 Modificazioni della matrice tendinea con l'età	33
2.8 Cellule tendinee	34
<b>Capitolo 3</b>	
<b>FISIOLOGIA DEI TENDINI</b>	<b>37</b>
3.1 Proprietà meccaniche del tendine	37
3.2 Crimps e curva tensione-deformazione del tendine	39
3.3 Rapporti fra proprietà meccaniche e composizione biochimica del tendine	43
<b>Capitolo 4</b>	
<b>TENDINI DELL'APPARATO ESTENSORE DEL GINOCCHIO</b>	<b>45</b>
4.1 Tendine del quadricipite femorale	45
4.1.1 Lamina superficiale del tendine del quadricipite	46
4.1.2 Lamina intermedia del tendine del quadricipite	47
4.1.3 Lamina profonda del tendine del quadricipite	48
4.2 Tendine patellare	50

<b>SCOPO DELLA TESI</b>	52
<b>MATERIALI E METODI</b>	56
Procedura sperimentale e prelievo dei tendini	57
Microscopia ottica a luce polarizzata (PLM)	58
Microscopia elettronica a scansione (SEM)	59
Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	60
Analisi isto-morfometrica	63
Analisi statistica	64
<b>RISULTATI</b>	65
Microscopia ottica a luce polarizzata (PLM)	66
Microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)	67
Analisi isto-morfometrica	68
<b>DISCUSSIONE</b>	70
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	77
<b>ICONOGRAFIA</b>	90

# **INTRODUZIONE**

## **CAPITOLO 1**

### **ANATOMIA MACROSCOPICA DEI TENDINI**

I tendini sono formazioni anatomiche di colorito e lucentezza madreperlacea, mostrano consistenza fibroelastica e notevole resistenza alle sollecitazioni meccaniche ed ai processi autolitici. Sono interposti tra i muscoli e le ossa e provvedono a trasmettere la forza prodotta dalla contrazione muscolare alle leve scheletriche, consentendo così il movimento nonché il mantenimento della postura del corpo. I tendini fanno sì che il muscolo si trovi ad una distanza ottimale dall'articolazione sulla quale esso agisce senza richiedere una eccessiva lunghezza del muscolo stesso tra l'origine e l'inserzione. I tendini sono più rigidi dei muscoli, posseggono maggiore resistenza alla trazione e possono sopportare carichi molto grandi con deformazioni minime. Questa proprietà dei tendini rende i muscoli capaci di trasmettere forze alle ossa senza disperdere energia per stirare i tendini. Il punto in cui il muscolo trapassa nel tendine si definisce *giunzione muscolo-tendinea*, mentre il punto in cui il tendine si inserisce sull'osso si definisce *giunzione osteo-tendinea*.

#### **1.1 ANNESSI TENDINEI**

I tendini possiedono strutture satelliti che hanno come compito principale quello di facilitare lo scorrimento del tessuto tendineo sulle strutture

anatomiche circostanti e di evitare che il tendine stesso perda la sua linea d'azione durante la contrazione muscolare. Gli annessi tendinei sono rappresentati da: guaine fibrose, guaine sinoviali, foglietti peritendinei, pulegge di riflessione e borse tendinee [73].

Le **guaine fibrose** o retinacoli rappresentano i canali di scorrimento dei tendini, in particolare di quelli lunghi. Questi ultimi devono compiere lunghi tragitti per raggiungere la loro inserzione e il loro scorrimento sui tessuti vicini potrebbe essere notevolmente compromesso dall'attrito sviluppato soprattutto in corrispondenza di strutture ossee. In queste regioni sono presenti tunnel entro i quali i tendini scorrono avvolti da una guaina sinoviale. Le docce e le incisure ossee in particolare sono generalmente tappezzate da un pavimento fibrocartilagineo sul quale passa a ponte un tetto di tessuto fibroso. Questo rappresenta la guaina fibrosa o retinacolo, formazione che si riscontra elettivamente a livello delle estremità. Tipici esempi sono i retinacoli dei tendini flessori ed estensori della mano e del piede a livello del polso e del collo del piede. Le **guaine sinoviali** hanno il compito di agevolare lo scorrimento del tendine all'interno della guaina fibrosa. Esse sono costituite da due sottili foglietti sierosi: il foglietto parietale che tappezza le pareti della guaina fibrosa e il foglietto viscerale che riveste la superficie del tendine. I due foglietti si continuano a livello delle due estremità del condotto formando così due "cul di sacco". Lo spazio chiuso delimitato dai due foglietti contiene un sottile velo di liquido, il liquido peritendineo, che possiede all'incirca la stessa composizione del liquido sinoviale. Esso ha principalmente una funzione lubrificante in quanto il tessuto tendineo, a differenza della cartilagine articolare, possiede una vascolarizzazione propria. Peduncoli di tessuto

fibrillare lasso si distaccano dalle pareti dei canali osteo-fibrosi e terminano sul ventre tendineo recando al tendine vasi e nervi. Queste strutture costituiscono il *mesotenonio* e sono anch'esse rivestite dalla sinoviale e possono essere più o meno numerose a seconda della lunghezza del tendine stesso. Non tutti i tendini posseggono tuttavia delle vere e proprie guaine sinoviali; queste infatti si riscontrano solo nelle zone in cui un repentino cambiamento di direzione ed un aumento dell'attrito richiedono una lubrificazione molto efficiente. La maggior parte dei tendini sono invece circondati da **foglietti peritendinei** di tessuto fibrillare lasso che nel loro complesso costituiscono il *paratenonio*. I foglietti peritendinei hanno una funzione sovrapponibile a quella delle guaine sinoviali, pur presentando una struttura istologica differente. Il paratenonio risulta costituito da fibrille collagene di tipo I e III e da sottili fibre elastiche [81]; le fibrille collagene mostrano diametro variabile (35-220 nm) e risultano organizzate in i fasci orientati parallelamente all'asse maggiore del tendine [125]. Il paratenonio concorre a ridurre la frizione e funziona come una sorta di manicotto elastico che consente il libero movimento del tendine rispetto alle strutture circostanti [73]. Le **pulegge di riflessione** sono ispessimenti circoscritti di tessuto fibrillare denso situati lungo il decorso delle guaine fibrose. Esse hanno il compito di contenere il tendine all'interno del letto di scorrimento, soprattutto laddove vi siano delle curvature lungo il decorso del tendine. Si evitano così effetti "a corda d'arco" (dall'inglese bow string) che comprometterebbero notevolmente la funzionalità del tendine durante la contrazione muscolare. Le **borse tendinee** infine costituiscono il quinto tipo di strutture extratendinee e concorrono a minimizzare l'attrito tra il tendine e le strutture ossee adiacenti. Si tratta di piccole vescicole sierose, localizzate nei

siti ove una prominenza ossea può comprimere e quindi logorare il tendine; tipici esempi sono le borse subacromiale, infrapatellare e retrocalcaneale.

Al di sotto del paratenonio, l'intero tendine è circondato da una sottile guaina di tessuto connettivo denso denominata *epitenonio* [73, 85]. Insieme il paratenonio e l'epitenonio talvolta sono definiti peritenonio [110]. All'interno dell'epitenonio le fibrille collagene risultano diversamente orientate, essendo disposte trasversalmente come pure longitudinalmente e obliquamente [73]. Occasionalmente le fibrille dell'epitenonio appaiono fuse con le fibrille tendinee poste più superficialmente [69]. Sulla sua superficie esterna l'epitenonio è contiguo al paratenonio e sulla superficie interna è invece in continuità con l'*endotenonio*, una sottile membrana di tessuto connettivo lasso che provvede a rivestire le singole fibre del tendine e a raggrupparle in unità più grandi rappresentate da fasci di fibre di vario ordine. L'endotenonio risulta costituito da fibrille di diametro piccolo ed uniforme (50 nm) ed inoltre mostra una prevalenza delle cellule sulla componente fibrillare [125]; le cellule si dispongono a formare delle lamine monostratificate interposte tra i fasci di fibre del tendine ed appaiono collegate da giunzioni specializzate in corrispondenza dei loro processi citoplasmatici. La funzione dell'endotenonio è quella di circoscrivere, individualizzandoli, i vari ordini di fasci ma anche quella di permettere la penetrazione e la distribuzione capillare di strutture vascolonervose all'interno del tendine [38, 75, 89, 90]. Inoltre, tra l'endotenonio e la superficie dei fasci tendinei vi è una relativa abbondanza di proteoglicani altamente idrofili e quindi idratati che favoriscono lo scorrimento reciproco tra i vari gruppi di fibre [108].

## **1.2 VASCOLARIZZAZIONE**

L'irrorazione ematica del tendine è assicurata, in piccola parte, dai vasi provenienti dal ventre muscolare e dal periostio circostante la giunzione osteo-tendinea e, per il resto, dalla rete vascolare dei foglietti peritendinei e della guaina sinoviale, nelle sedi in cui questa è presente. La rete circolatoria dei foglietti peritendinei ha una struttura molto variabile, sia nei diversi tendini, sia in zone diverse dello stesso tendine. In alcuni casi, infatti, i tronchi primari sono disposti a formare una struttura reticolare a maglie piuttosto regolari; in altri casi essi formano delle arcate concentriche e sono disposti in modo del tutto irregolare [110]. La rete vascolare è costituita da arterie di piccolo e medio calibro, ciascuna delle quali è accompagnata da una o due vene satelliti ampiamente anastomizzate tra loro. Dalla rete arteriosa originano rami che penetrano nel contesto dei setti endotenonici, ed altri che si distribuiscono ai foglietti peritendinei. Nelle sedi in cui il tendine è fornito di guaina sinoviale, l'apporto ematico alla rete vascolare tendinea è assicurato da vasi che decorrono nel mesotenonio e, alle due estremità della guaina sinoviale, da vasi provenienti dal foglietto parietale della guaina [118]. I vasi che decorrono nel mesotenonio si distribuiscono oltre che al foglietto parietale anche al foglietto viscerale della guaina, andando così ad irrorare la superficie del tendine. Inoltre da questi vasi si dipartono rami che penetrano nei setti endotenonici ed anastomizzano la rete vascolare peritendinea con quella intratendinea. La rete vascolare intratendinea è situata esclusivamente nei setti endotenonici ed è costituita da vasi a decorso longitudinale anastomizzati tra loro da rami trasversali e obliqui [90]. Generalmente vi sono uno o più tronchi arteriosi situati superficialmente o profondamente nel contesto del tendine, da cui si

originano arteriole che decorrono nei setti interposti tra i fascicoli tendinei di primo ordine (Fig. 1). Queste arteriole e i capillari che da esse originano formano le unità microvascolari del tendine.

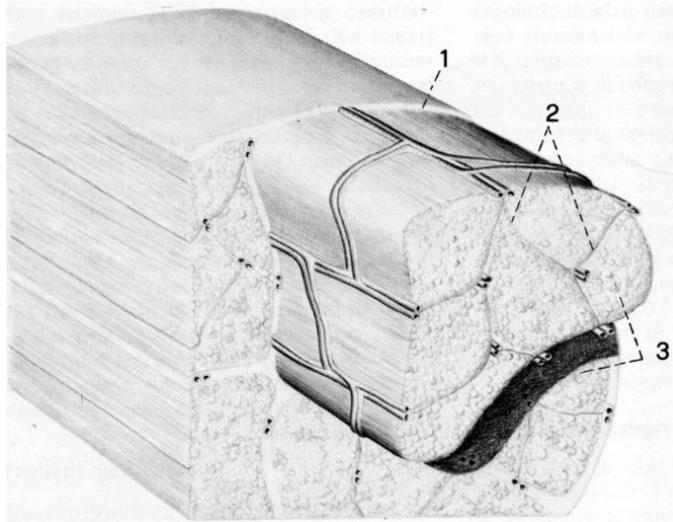


Figura 1. Rete vascolare intratendinea (1: foglietto peritendineo; 2: setti; 3: fascicoli tendinei).

In base alle caratteristiche dei capillari si possono distinguere tre tipi di unità microvascolari [111]. In un tipo, il capillare percorre una lunga distanza con direzione parallela all'asse longitudinale del tendine, quindi diviene ricorrente, descrive un'ansa e confluisce in una venula; generalmente una singola arteriola dà origine a più anse capillari che decorrono in diversi piani nel contesto del tendine. Un altro tipo di unità microvascolare, meno specializzato del precedente, presenta capillari con decorso irregolare. Un altro tipo ancora è caratterizzato da capillari molto brevi a decorso rettilineo che fungono probabilmente da “shunts” artero-venosi. La presenza di più unità microvascolari faciliterebbe la diffusione dei gas e dei metaboliti all'interno dei singoli fascicoli tendinei.

### **1.3 INNERVAZIONE**

I tendini sono innervati da rami nervosi provenienti sia dal ventre muscolare, sia dai rami sensitivi che si distribuiscono alla cute e ai connettivi profondi [123]. I primi attraversano la giunzione muscolo-tendinea e continuano il loro decorso nei setti endotenonici. I secondi decorrono nel paratenonio e nel peritenonio dove formano un ricco plesso, i cui rami penetrano successivamente nei setti endotenonici ove si anastomizzano con i rami di provenienza muscolare. Nel contesto del tendine i rami nervosi, che sono relativamente scarsi, formano tronchi con decorso parallelo all'asse maggiore del tendine stesso, anastomizzati da rami con decorso trasversale ed obliquo. Le terminazioni nervose di questi rami sono di vario tipo: alcuni terminano in organi muscolo-tendinei del Golgi, in corpuscoli di Pacini o di Ruffini; altri si risolvono in arborizzazioni libere [123]. Gli organi muscolo-tendinei del Golgi sono formazioni fusiformi, lunghe circa 200-300  $\mu\text{m}$ , il cui asse maggiore è parallelo all'asse longitudinale del muscolo. Situati in corrispondenza delle giunzioni muscolo-tendinee, si fissano con un'estremità alla fibre muscolare e con l'altra estremità al tendine. Gli organi muscolo-tendinei del Golgi sono costituiti da fasci di fibre collagene, rivestiti da una sottile capsula. Una o due fibre mieliniche penetrano all'interno di questi corpuscoli connettivali, perdono la guaina mielinica e si ramificano ripetutamente, insinuandosi nei setti connettivali disposti tra i singoli fascetti collageni. Quando il muscolo si contrae, i fascetti di fibre collagene, si distendono e si avvicinano gli uni agli altri, stimolando le terminazioni amieliniche interfascicolari, che agiscono pertanto da meccanocettori [21, 66].

I corpuscoli di Pacini e di Ruffini presenti nel tendine hanno le stesse caratteristiche strutturali di quelli presenti nel derma e nei connettivi profondi. Essi sono situati sia sulla superficie che nel contesto del tendine e la loro funzione è correlata alla sensibilità propriocettiva e ai riflessi miotatici. Le terminazioni nervose libere si trovano soprattutto nei foglietti peritendinei e reagiscono principalmente a stimoli dolorifici.

## **CAPITOLO 2**

### **ANATOMIA MICROSCOPICA DEI TENDINI**

I tendini sono costituiti da tessuto connettivo denso o compatto formato da un numero relativamente scarso di elementi cellulari circondati da un'abbondante matrice extracellulare.

La matrice extracellulare (ECM) risulta costituita da fibre collagene ed elastiche immerse in una sostanza amorfa idrofila formata da proteoglicani (PGs), glicosaminoglicani (GAGs) e glicoproteine. Le proteine fibrose sono responsabili della elasticità del tessuto e della resistenza che esso oppone alla tensione, mentre i PGs e i GAGs, avendo la capacità di trattenere notevoli quantità di acqua, rendono la sostanza fondamentale amorfa una soluzione colloidale molto vischiosa, un gel altamente idratato capace di resistere alla compressione e di ottimizzare le proprietà biomeccaniche (elasticità) del tendine. Queste molecole sono altresì importanti per la stabilizzazione dell'intero sistema collagenico, per il mantenimento dell'omeostasi ionica e per la regolazione della fibrillogenasi. Nel tendine adulto, i singoli componenti mantengono fra di loro rapporti ben precisi. Il collagene incide per la quota maggiore (circa il 65-80%) e l'elevato contenuto ha reso il tendine la fonte principale di estrazione della proteina [30, 59, 79, 91]. Il collagene prevalente nei tendini è quello di tipo I, accanto a proporzioni minori di collagene di tipo

III, presente nell'epitenonio e nell'endotenonio [37] e di tipo II, identificabile nelle aree fibrocartilaginee della giunzione osteo-tendinea [48, 140]. L'elastina, i proteoglicani e le glicoproteine costituiscono invece rispettivamente il 4%, 4% e il 2% circa della matrice.

## **2.1 COLLAGENE: STRUTTURA MOLECOLARE E ASSEMBLAGGIO**

La caratterizzazione chimica del collagene ha richiesto lunghi periodi di studio a causa dell'insolubilità delle sue fibre. Il problema fu risolto quando si scoprì che il collagene poteva essere estratto in forma solubile dai tessuti giovani poiché la molecola non conteneva ancora molti legami covalenti. La mancanza di legami trasversali nel collagene immaturo consente infatti di estrarre dai tessuti l'unità strutturale di base, chiamata *tropocollagene*. Questa ha una massa di circa 285 KD ed è costituito da tre catene polipeptidiche di uguale grandezza. Nel collagene di tipo I due catene hanno la stessa struttura primaria e vengono denominate  $\alpha_1$ ; la terza invece ha una diversa composizione in aminoacidi e viene denominata  $\alpha_2$ . Gli aminoacidi di cui la proteina è particolarmente ricca sono la glicina (circa il 30%) e la prolina (circa il 25%). In notevoli quantità sono anche presenti la lisina, l'idrossilina e l'idrossiprolina. Quest'ultima è contenuta quasi esclusivamente nel collagene e ne rappresenta l'aminoacido specifico. Scarsissimi sono invece la tiroxina, il triptofano ed i residui di aminoacidi solforati [14].

La sequenza del collagene è molto regolare: nelle singole catene polipeptidiche un residuo ogni tre è glicina, inoltre la sequenza glicina-prolina-idrossiprolina è ripetuta frequentemente. Poiché non esistono gli RNA di trasporto per gli aminoacidi idrossiprolina e idrossilisina, questi aminoacidi si formano nel corso

di modificazioni post-traduzionali per idrossilazione rispettivamente della prolina e della lisina, dopo essere state incorporate nelle catene polipeptidiche. Questi aminoacidi dirigono la conformazione ad elica in virtù dei loro limiti di rotazione, ed inoltre l'idrossiprolina contribuisce anche a stabilizzare la struttura a tripla elica formando legami a idrogeno fra una catena e l'altra [15, 17, 135]. Altri legami ad idrogeno si stabiliscono tra i gruppi NH peptidici dei residui di glicina e i gruppi CO peptidici di residui presenti sulle altre catene. Le singole catene si avvolgono ad elica in senso sinistrorso ed inoltre le tre le catene si avvolgono l'una sull'altra per formare un cavo superavvolto, ossia una superelica destrorsa (Fig. 2). Nell'insieme la molecola ha la forma di un bastoncino lungo circa 300 nm con un diametro di 1,5 nm.

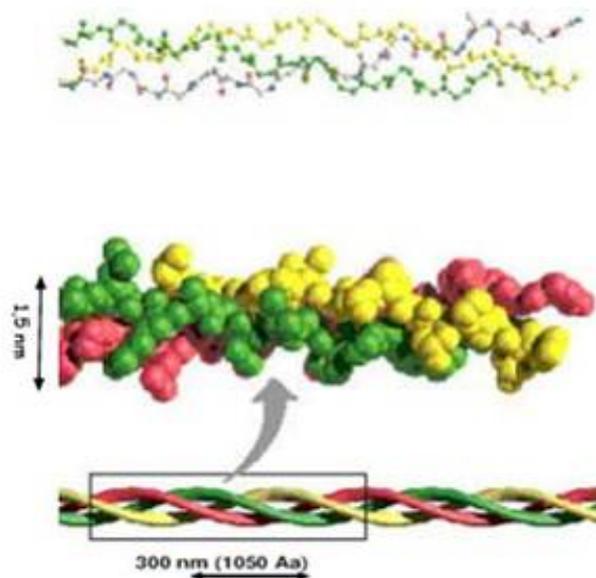


Figura 2. Modello della tripla elica del collagene

Il collagene viene sintetizzato a livello del reticolo endoplasmatico rugoso della cellula tendinea (tenoblasta). Le catene che costituiscono il tropocollagene vengono sintetizzate in forma di precursori più grandi detti rispettivamente pro- $\alpha$ 1(I) e pro- $\alpha$ 2(I). Questi precursori contengono dei peptidi addizionali, i

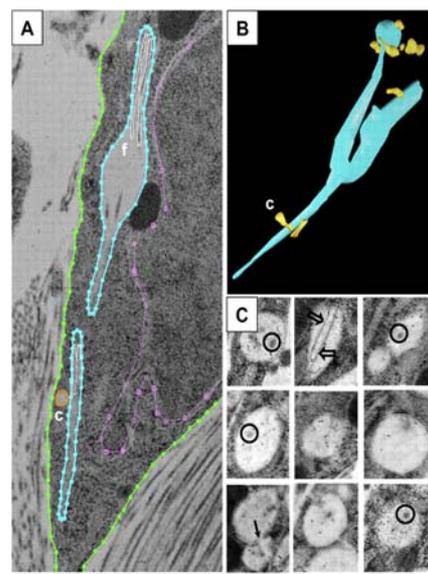
*propeptidi*, sia all'estremità aminoterminale che a quella carbossiterminale. I propeptidi hanno una composizione aminoacidica molto diversa dal resto della molecola e, per lo scarso contenuto in glicina e idrossiprolina, non presentano disposizione ad elica. I propeptidi carbossiterminali delle tre catene sono inoltre legati tra loro da ponti disolfuro intercatena, assenti nella molecola definitiva del collagene. Questa grossa molecola precursore del collagene è detta *procollagene* e la conversione in tropocollagene richiede quindi tagli proteolitici specifici, che avvengono nello spazio extracellulare.

Per poter attraversare la membrana cellulare, la molecola deve infatti essere provvista di polipeptidi non disposti ad elica, situati in posizione terminale. I tenoblasti secernono nello spazio extracellulare il procollagene e i propeptidi vengono quindi rimossi all'esterno della cellula ad opera di proteasi specifiche, le procollagene peptidasi. Il procollagene diventa così la forma biologicamente attiva in grado di formare le fibrille: il *tropocollagene* [127]. I propeptidi prevengono pertanto la prematura formazione delle fibrille mantenendo in soluzione le molecole di procollagene; favoriscono la corretta aggregazione delle tre catene e contribuiscono alla stabilizzazione delle tripla elica del procollagene [39]. I due peptidi vengono rimossi in fasi successive della fibrillogenesi; in particolare la rimozione del propeptide N-terminale precede quella del peptide C-terminale e il suo distacco si accompagna ad un aumento del diametro fibrillare che si realizza attraverso la fusione di segmenti fibrillari molto sottili [142]. Il propeptide C-terminale sembra quindi regolare fasi successive dell'assemblaggio del procollagene e la sua rimozione favorirebbe l'ulteriore crescita laterale delle fibrille.

## 2.2 COLLAGENE: AGGREGAZIONE EXTRACELLULARE

Un problema non ancora risolto è come sia regolata l'ordinata polimerizzazione delle molecole di tropocollagene all'esterno della cellula. Una teoria suggestiva attribuisce alla superficie cellulare dei tenoblasti la funzione di controllare la formazione e l'orientamento delle fibrille in seno alla matrice extracellulare. Recenti studi [24, 25] condotti su tendini embrionali di pollo suggeriscono che la conversione del procollagene in tropocollagene, mediante clivaggio proteolitico dei propeptidi N- e C-terminali, abbia luogo nel citoplasma cellulare. In particolare la formazione delle fibrille inizierebbe all'interno del compartimento secretorio post-golgiano in quanto piccole fibrille collagene con un diametro costante di 28 nm e con un regolare periodo di 67 nm sono state osservate all'interno di carriers rivestiti da membrana noti come GPCs (Golgi to plasma membrane carriers) (Fig. 3). Questi carriers, di forma tubulo-sacciforme si staccano dal compartimento trans del Golgi (TGN) e provvedono a trasportare il loro contenuto verso la membrana plasmatica [83, 126].

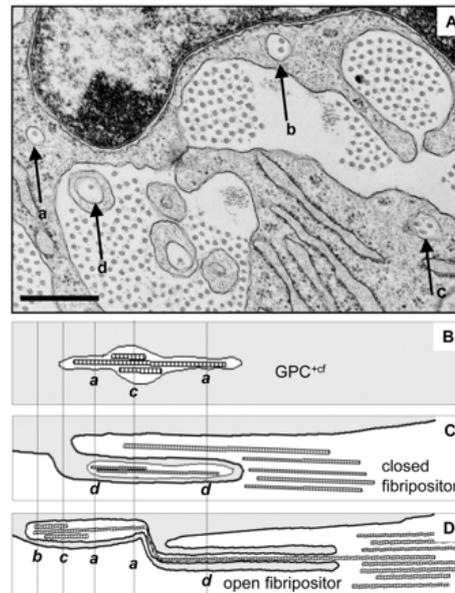
Figura 3. Tenoblasta di embrione di pollo: vescicole secretorie del Golgi contenenti fibrille collagene. (A) Sezione longitudinale di tendine metatarsale di embrione di pollo. In verde, la membrana plasmatica; in blu, la membrana di una vescicola di secrezione del Golgi contenente due fibrille collagene; f (e sottolineate in bianco), due fibrille collagene; in viola, la membrana nucleare; c (e sottolineato in arancione) un piccolo compartimento posizionato in prossimità della vescicola secretoria. (B) Ricostruzione di sezioni seriali longitudinali della vescicola di secrezione mostrata in A. (C) Immunolocalizzazione del collagene di tipo I. Barra, 100 nm [Canty EG et al., 2004].



Secondo il modello proposto da Screen [114] la conversione del procollagene in tropocollagene avrebbe luogo proprio entro i GPCs probabilmente in seguito a fusione con vescicole contenenti le proteinasi richieste. All'interno dei GPCs inizierebbe quindi l'aggregazione del tropocollagene in segmenti fibrillari che agiscono da intermedi nella formazione delle fibrille definitive e gli stessi carriers provvederebbero a trasferire le fibrille neoformate o comunque in fase di assemblaggio a ridosso di peculiari protrusioni del plasmalemma che sono state indicate con il termine di "*fibripositors*" (fibril depositors). I *fibripositors* sono evaginazioni digitiformi della membrana orientate parallelamente al maggior asse tendineo aventi la funzione di depositare le fibrille neoformate nella ECM [24, 25] (Fig. 4). Queste particolari specializzazioni della membrana posseggono un lume che si approfonda per parecchi microns all'interno del corpo cellulare; al centro del lume sono state osservate fibrille di diametro omogeneo che si estendono in modo continuo fin dentro un fascio di fibrille della ECM. Le estremità distali dei *fibripositors* si aprono entro peculiari canalicoli intercellulari di secrezione, ciascuno dei quali è costituito dall'affrontarsi di due docce scavate nelle membrane contigue di due cellule adiacenti [24, 25]. L'asse longitudinale di questi canali, così come quello dei *fibripositors*, è sempre parallelo all'asse maggiore del tendine.

Questi canali agiscono presumibilmente come guide per consentire il corretto ed ordinato allineamento e parallelismo delle fibrille neoformate rispetto all'asse tendineo.

Figura 4. (A) TEM: fasci di fibrille collagene tra cellule adiacenti; nel citoplasma cellulare si notano inoltre fibrille contenute in vescicole rivestite da membrana corrispondenti ai GPCs (a, b, c); (B): rappresentazione schematica di un carrier (GPC) contenente alcune fibrille; (C-D): rappresentazione schematica di un fibripositor (d) rispettivamente chiuso (C) e aperto (D) contenente una fibrilla in fase di deposizione nella ECM.



Nello spazio extracellulare quindi questi segmenti fibrillari agiscono come strutture di nucleazione/propagazione e si accrescono sia in lunghezza che in diametro per fusione laterale e/o terminale [53, 117], oppure attraverso l'aggiunta di singole molecole collagene alle loro estremità [63, 64] dando origine alle prime sottili fibrille collagene. Quando le fibrille collagene sono sottoposte a colorazione con ioni di metalli pesanti e vengono esaminate al microscopio elettronico appaiono striate trasversalmente, presentano cioè lungo il loro decorso bande trasversali che si ripetono ogni 64 nm. Nella terminologia corrente si dice che le fibrille collagene mostrano una periodicità assiale, con un periodo di 64 nm. Le ricerche sulla composizione macromolecolare delle fibrille collagene e sulla loro ricostituzione in vitro hanno posto un problema fondamentale, cioè come molecole di tropocollagene lunghe 300 nm si associno tra loro in modo da formare fibrille con una periodicità di 64 nm. Poiché il periodo della fibrilla è minore della lunghezza del tropocollagene, le molecole disposte in file adiacenti non possono essere allineate. La prima interpretazione formulata era che durante la formazione delle fibrille le molecole di tropocollagene si allineassero longitudinalmente testa-coda e si

associassero parallelamente sovrapponendosi per un quarto della loro lunghezza; questa disposizione sfalsata delle molecole darebbe origine alle striature trasversali che si ripetono regolarmente ad intervalli di 64 nm. Tuttavia tale ipotesi non risolveva interamente il problema, in quanto la disposizione latero-laterale di molecole lunghe circa 300 nm con una sfasatura di un quarto della loro lunghezza dovrebbe generare un periodo di circa 70 nm. Una modificazione di questa ipotesi, proposta da Hodge e Petruska [61], postula che le molecole di tropocollagene disposte linearmente lungo la fibrilla non siano collegate direttamente per le loro estremità ma vi sia interposto uno spazio corrispondente a circa mezzo periodo. Questa disposizione rende ragione dell'aspetto delle fibrille dopo colorazione negativa: le regioni della fibrilla che sono fortemente addensate per la sovrapposizione testa-coda delle molecole di tropocollagene sono relativamente impermeabili al colorante ed appaiono chiare; le regioni della fibrilla che corrispondono agli intervalli tra le molecole disposte linearmente sono più permeabili al colorante ed appaiono più scure (Fig. 5).

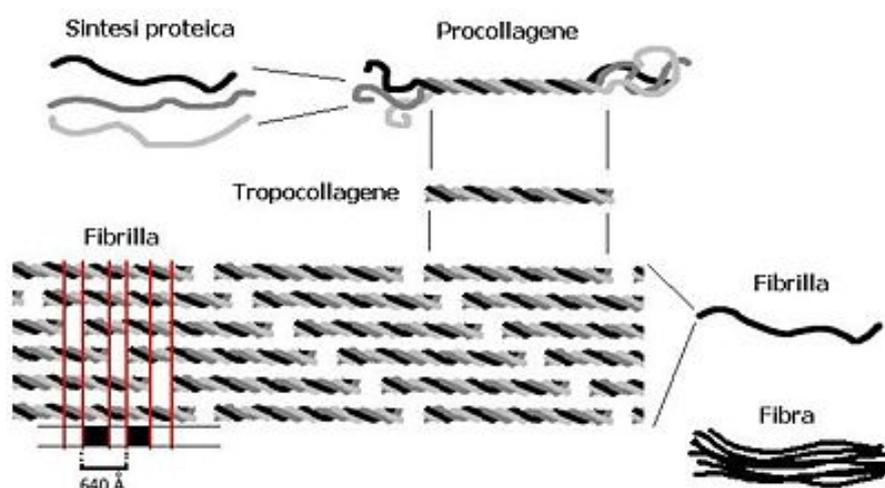


Figura 5. La periodicità delle fibrille collagene è dipendente dall'allineamento sfasato delle molecole di tropocollagene.

Secondo questo modello, quindi, le molecole adiacenti di tropocollagene sono sfasate nel senso della lunghezza di una distanza D e danno luogo a fibrille con periodo ripetitivo costituito da una zona chiara di sovrapposizione e da una zona scura di discontinuità.

Inizialmente interazioni non covalenti (polari e idrofobiche) fra le molecole collagene sono responsabili dell'aggregazione della fibrilla, ma una volta che questa si è formata viene stabilizzata da legami trasversali (chiamati anche crociati o cross-links) covalenti tra le molecole [9, 10, 41].

Il numero di questi legami stabili aumenta con l'avanzare dell'età, dando luogo ad un incremento della resistenza meccanica del tendine [41, 80]. Il numero e il tipo di legami crociati varia inoltre con le richieste funzionali del tessuto: infatti il collagene del tendine di Achille, che deve avere una notevole resistenza alla trazione, contiene molti più legami crociati rispetto al tendine della coda, che invece deve possedere maggiore flessibilità [9, 41].

La formazione di legami crociati è quindi indispensabile per la stabilizzazione tra le molecole di tropocollagene e per interconnetterle all'interno della fibrilla.

Le fibrille collagene presentano nel tendine un diametro compreso tra 0,2 e 0,5  $\mu\text{m}$  e un andamento rettilineo e parallelo all'asse maggiore del tendine. Il microscopio elettronico ha dimostrato che le fibrille sono a loro volta costituite da filamenti più sottili, le *microfibrille*, le quali, come le fibrille, presentano una bandeggiatura regolare che si ripropone ogni 64-70 nm, a seconda del grado di idratazione della microfibrilla [122]. All'interno delle singole fibrille, le microfibrille possono mostrare uno spessore variabile tra 20 e 150 nm e un andamento rettilineo o elicoidale [20]. Pertanto, a seconda dell'architettura microfibrillare, le fibrille possono essere suddivise in due classi (Fig. 6):

- **fibrille di tipo T**, di diametro elevato (150-200 nm), costituite da subfibrille con andamento leggermente spiraliforme che si avvolgono a costituire un'elica destrorsa con un angolo di avvitamento che non eccede mai i 5 gradi [92, 93, 104, 109];
- **fibrille di tipo C**, di spessore minore (50-100 nm) caratterizzate da un andamento elicoidale e/o ondulato con un angolo di avvitamento costante di 17 gradi rispetto all'asse fibrillare [86].

È stato inoltre osservato che, mentre le fibrille di tipo T presentano un periodo di 67 nm, le fibrille di tipo C presentano una bandeggiatura che si ripete ogni 64 nm. Questo aspetto è altamente indicativo della struttura elicoidale delle fibrille di tipo C, in cui l'apparente periodo è la proiezione del reale periodo lungo l'asse fibrillare, essendo  $64 \approx 67 \cos \alpha$ , dove  $\alpha$  è 17 gradi.

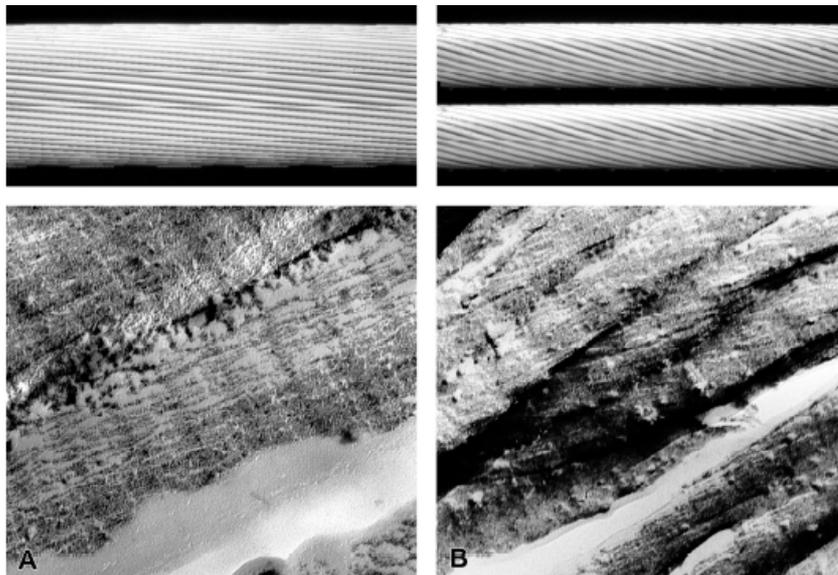


Figura 6. In alto sono riportati modelli molecolari dell'arrangiamento delle fibrille di tipo T(sx) e di tipo C (dx). In basso immagini di crio-frattura: A, tendine della coda di ratto; B, cornea di bovino [Ottani et al., 2002].

Il polimorfismo fibrillare sembra essere strettamente collegato al ruolo funzionale che le fibrille rivestono nel tessuto connettivo: le fibrille di grosso diametro e con andamento pressoché rettilineo sono tipicamente presenti nei

tessuti sottoposti ad elevate forze tensili unidirezionali (tendini, legamenti, aponeurosi); le fibrille di piccolo diametro, invece, si riscontrano soprattutto in tessuti sottoposti a forze pluridirezionali o a reversibili cambiamenti di forma e dimensione (cute, cornea, guaine tendinee, guaine di nervi, parete dei vasi), assicurando, in virtù del maggior rapporto superficie/volume, un numero più alto di legami interfibrillari.

Più fibrille collagene si associano tra loro a formare una *fibra*, il cui spessore varia tra 1 e 12  $\mu\text{m}$  in rapporto al numero di fibrille che la costituiscono. La fibra collagene è la più piccola unità del tendine visibile al microscopio ottico .

Le fibre a loro volta si aggregano a costituire fascicoli (o fasci di I ordine), ognuno dei quali è circondato dall'endotenonio e dai vasi in esso contenuti. I fasci primari rappresentano pertanto le unità morfo-funzionali del tessuto tendineo [128]. Più fasci di I ordine, circondati dai setti endotenonici formano i fasci di II ordine e questi, a loro volta, fasci di fibre di ordine superiore. Il tendine, nella sua unità macroscopica, è costituito da più fasci di II ordine ed è circondato dal peritenonio (Fig. 7).

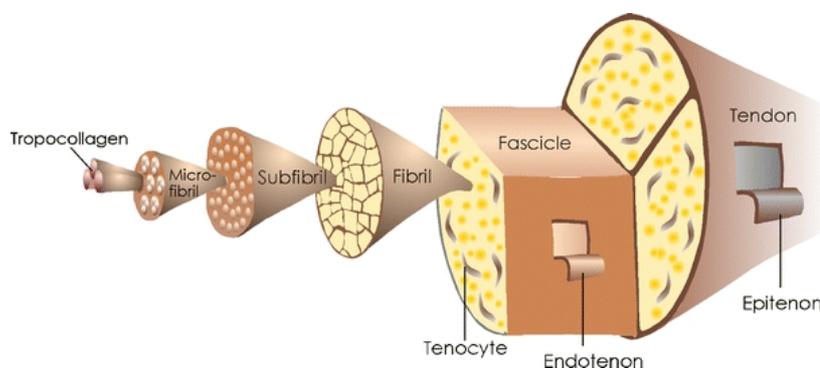


Figura 7. Organizzazione gerarchica del tendine [Hoffmann et al., 2007].

### 2.3 CRIMPS TENDINEI

Nel tendine le fibre collagene sono costituite da un numero variabile di fibrille disposte parallelamente le une alle altre e riunite in fasci di fibre anch'essi paralleli tra loro e all'asse tendineo. I fasci di fibre collagene presentano un andamento ondulato, con periodici cambiamenti di direzione, noti in letteratura con il nome di *crimps* [33, 34, 36, 52, 55, 70, 75, 107, 124, 134]. Essendo le fibre collagene strutture anisotrope (o birifrangenti), in grado di modificare lo stato di polarizzazione della luce che le attraversa, la periodica variazione di orientamento rispetto all'asse longitudinale del tendine, risulta ben evidente al microscopio ottico a luce polarizzata (PLM) come un'alternanza di bande chiare e scure di estinzione (Fig. 8).

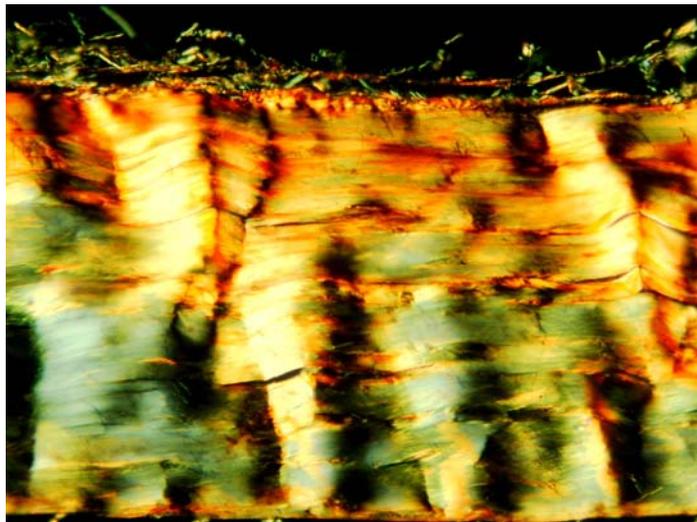


Figura 8. PLM: andamento ondulato dei fasci di fibre collagene nel tendine di Achille di ratto.

In uno stesso tendine i crimps differiscono in dimensione e geometria, apparendo come triangoli isosceli o scaleni di grandezza variabile.

Il singolo crimp, osservato al microscopio elettronico a scansione, appare costituito da segmenti fibrillari rettilinei strettamente impacchettati tra loro uniti da nodi o cerniere, in corrispondenza dei quali tutte le fibrille di ciascun

fascicolo cambiano contemporaneamente direzione (Fig. 9). Nel cambiare la loro rotta, le fibrille non descrivono un'ansa ma si deformano come farebbe una struttura cilindrica cava. Tale comportamento può essere spiegato assumendo che i legami crociati intermolecolari si formino preferenzialmente alla superficie delle fibrille, costituendo come un guscio rigido, mentre nella porzione centrale della fibrilla le molecole di collagene non sono così vincolate e consentirebbero alla fibrilla stessa di schiacciarsi quando va incontro a piegamento [55]. Nel punto in cui si deformano, le fibrille assumono diversi pattern di ripiegamento: alcune appaiono schiacciate, altre ritorte, altre ancora, per una combinazione di schiacciamento e torsione, assumono una caratteristica conformazione a baionetta. Sebbene mostrino una certa eterogeneità morfologica, tutte sono caratterizzate, in corrispondenza del punto in cui piegano, da un disordine strutturale accompagnato a volte anche dalla perdita della tipica bandeggiatura periodica. Tali alterazioni strutturali a livello delle singole fibrille collagene sono stati chiamati dal mio gruppo di ricerca *crimps fibrillari* [44]. Un crimp tendineo include pertanto più crimp fibrillari (Fig 9).

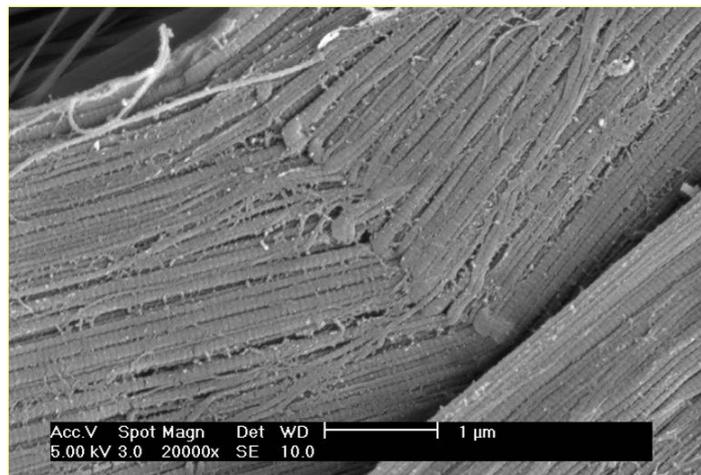


Figura 9. SEM: un singolo crimp tendineo è costituito da segmenti fibrillari rettilinei uniti da nodi (crimps fibrillari).

L'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) ha evidenziato che le fibrille collagene, in corrispondenza del crimp fibrillare, dapprima si attorcigliano piegando a sinistra e modificando il piano del loro andamento, e poi curvano nuovamente ricambiando la loro direzione. I differenti piani di decorso della fibrilla sono paralleli tra loro sicché l'arrangiamento dei crimps rispetto all'asse della struttura tendinea risulta planare. La fibrilla collagene riuscirebbe a compiere questi improvvisi cambiamenti di direzione in virtù del disordine microfibrillare presente a livello del crimp fibrillare. Le strutture sottoposte a forze unidirezionali, come il tendine, presentano fibrille che si avvolgono con un'angolo di torsione di circa  $180^\circ$  e descrivono eliche schiacciate con crimps planari (Fig. 10). Nei tessuti sottoposti a stress multiassiali (legamenti, guaine tendinee, pareti dei vasi), le fibrille si avvolgono ripetutamente lungo il loro decorso con differenti angoli di rotazione ( $< 180^\circ$ ) modificando di volta in volta il piano del crimping, ovvero formando crimps non planari [45, 46], come riportato in figura 10.

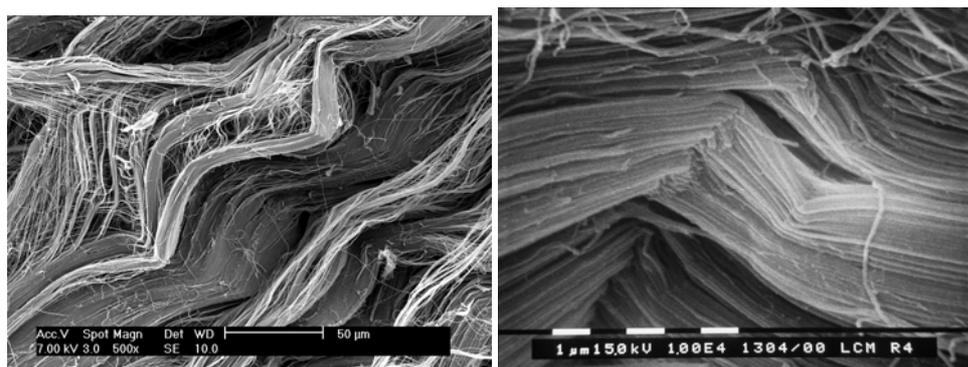


Figura 10. SEM: a sx, tendine di Achille di ratto; a dx legamento collaterale mediale di ratto I fasci di fibre seguono un evidente andamento ondulato con crimps planari nel tendine e crimps non planari nel legamento.

Numerosi studi sono stati realizzati allo scopo di stabilire quando e in che modo il crimping venga introdotto nelle fibre collagene durante lo sviluppo del

tendine. Diversi autori [52, 116, 117] ipotizzano un coinvolgimento diretto dei tenoblasti nella formazione dei crimps: nei tendini embrionali di pollo durante la fibrillogenesi le cellule tendinee appaiono inizialmente disposte ad entrambe le estremità delle fibrille in via di assemblaggio; successivamente, mano a mano che le fibrille vanno incontro a condensazione laterale, i tenoblasti si allineano e si dispongono in file longitudinali parallele strettamente ravvicinate, tra le quali si vengono a trovare interposte le fibrille in formazione. E' stato ipotizzato che il crimp venga introdotto nei fascetti di fibrille o in seguito ad attiva contrazione delle cellule poste alle estremità delle fibrille o attraverso stress di taglio introdotti dalle cellule tra gli strati di fibrille [116, 117]. Tuttavia il crimping delle fibre collagene potrebbe altresì essere il risultato di una contrazione volumetrica della matrice: una riduzione del contenuto in proteoglicani e quindi in acqua potrebbe provocare una coartazione della matrice con conseguente piegamento delle fibre [31].

#### **2.4 FIBRE ELASTICHE**

Le fibre elastiche sono presenti nel tendine in quantità modesta [79]. Le fibre elastiche sono costituite da una parte periferica formata da microfibrille prive di periodo e del diametro di circa 11 nm e da una parte centrale amorfa. Gli studi biochimici hanno confermato la diversità morfologica delle due componenti. Dall'analisi degli estratti delle microfibrille isolate, sono state purificate frazioni glicoproteiche contenenti quantità rilevanti di aminoacidi polari, quali la glicina, la valina, l'alanina e la prolina. La componente glucidica è costituita invece da un 4-7% di esosì e da uno 0,7% di esosamine. La porzione centrale amorfa delle fibre elastiche contiene invece elastina pura, proteina molto stabile

ed insolubile con i normali procedimenti biochimici. A differenza del collagene, la sintesi e l'organizzazione dell'elastina non sono perfettamente note. Le molecole di elastina secrete dalle cellule si organizzano in filamenti e foglietti legati tra loro da legami covalenti, venendo a costituire in tal modo un esteso reticolo. Poiché lo scheletro polipeptidico dell'elastina conserva la struttura ad avvolgimento con numerosi legami crociati, la rete è in condizione di deformarsi e di riprendere la forma primitiva proprio come un elastico. Quindi, da un punto di vista meccanico, le fibre elastiche presentano caratteristiche esattamente contrarie a quelle delle fibre collagene, possedendo la prerogativa di essere fortemente estensibili. Il ruolo delle fibre elastiche nei tendini non è completamente chiaro; è stato suggerito che esse possano contribuire a ripristinare la struttura ondolata a zig-zag dei fasci di fibre in seguito allo stiramento che il tendine subisce durante la contrazione muscolare [22].

## **2.5 PROTEOGLICANI**

I proteoglicani (PGs) rappresentano una delle componenti fondamentali delle matrici connettivali. Si tratta di macromolecole composte da un asse proteico principale (core) su cui sono inserite una serie di catene polisaccaridiche complesse dette glicosaminoglicani (GAG), a loro volta costituite da sequenze disaccaridiche formate da una molecola di acido uronico e da una esosamina, oppure da uno zucchero neutro e un esosamina. Appartengono al primo gruppo l'acido ialuronico, il condroitinsolfato A, il condroitinsolfato B o dermatansolfato ed il condroitinsolfato C. Appartiene invece al secondo gruppo il cheratansolfato. La presenza di numerosi gruppi anionici crea una situazione

in cui le catene polisaccaridiche tendono a distendersi e a distanziarsi il più possibile nel solvente per effetto della repulsione tra le cariche negative. In queste condizioni le molecole polari dell'acqua assumono un preciso orientamento nei confronti dei gruppi carichi delle catene glucidiche, di conseguenza il volume di solvente controllato dal proteoglicano è molto grande e può risultare anche 1000 volte superiore a quello proprio della molecola. Si determina così il caratteristico stato di gel acqua-proteoglicani che conferisce alla matrice extracellulare la resistenza alle forze di compressione. Il gel regola altresì il trasporto di sali, delle sostanze nutritive e del solvente, esercitando nel contempo un'azione di filtro che impedisce la diffusione di molecole a peso molecolare elevato o fortemente cariche. Nel tendine è stata dimostrata la presenza di due gruppi fondamentali di PGs (Fig. 11):

- i **piccoli proteoglicani ricchi in leucina** (small leucine-rich proteoglycans o SLRPs);
- i **grandi proteoglicani**, talora noti anche come PGs modulari o ialectani.

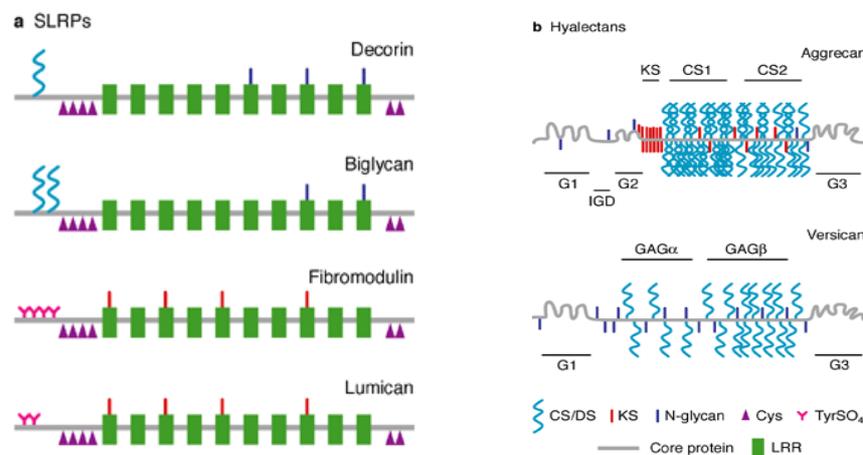


Figura 11. Rappresentazione schematica dei principali proteoglicani presenti nel tendine (Export Reviews in Molecular Medicine – Cambridge University Press 2005).

La famiglia dei proteoglicani a catena corta ricchi di leucina (SLRPs) è caratterizzata dalla presenza di un dominio centrale ricco di leucina, al quale sono legate una o due catene di condroitinsolfato (CS) o dermatansolfato (DS) oppure più catene di cheratansolfato (KS). Gli SLRPs sono importanti regolatori dell'assemblaggio delle fibrille collagene [32, 42]. Numerose sono le evidenze in questo senso: topi knockout per i geni che codificano SLRPs mostrano fibrille collagene disorganizzate e conseguentemente perdita di gran parte delle funzioni dei tessuti connettivi [137, 138]. Esperimenti *in vitro* hanno inoltre mostrato che gli SLRPs interagiscono con il collagene attraverso specifici siti di legame, ritardando la formazione delle fibrille collagene in sede extracellulare [136]. Tra i PG a piccola catena i meglio conosciuti sono la decorina il biglicano, la fibromodulina e il lumicano. La decorina è il proteoglicano predominante nel tendine e nei tessuti connettivi ricchi in collagene di tipo I; contiene un core proteico ricco di leucina cui sono legate una o due catene di DS e si localizza sulla superficie delle fibrille collagene, come a decorarle (dove il nome). Più precisamente secondo Scott [112], la decorina si lega in modo non covalente alle fibrille collagene attraverso il core proteico, mentre la catena di DS si estende in direzione di una fibrilla adiacente e si associa testa-coda con la catena di DS (avente orientamento antiparallelo) di una molecola di decorina legata a tale fibrilla; in questo modo si costituiscono dei ponti interfibrillari che contribuiscono a mantenere a registro le fibrille e ad impartire a quest'ultime un ordinato allineamento parallelo. La decorina svolge un ruolo di primo piano nell'assemblaggio della matrice. La presenza della decorina sembra infatti promuovere la fusione coda-coda tra fibrille e viceversa inibire la fusione laterale, regolando così sia il diametro che

la lunghezza delle fibrille [53] e quindi il rimodellamento tendineo in risposta al carico tensile [87].

Diametralmente opposta è la funzione svolta dal biglicano. Questo PG, infatti, favorisce l'assemblaggio di grandi molecole di collagene. Le fibrille collagene dei tendini di topi knock-out per il gene del biglicano mostrano diametri più piccoli e una morfologia alterata. Questi topi knock-out sviluppano tendini ectopici e mostrano ossificazione delle articolazioni accompagnata da osteoartrite entro i primi tre mesi di vita. Queste alterazioni appaiono più pronunciate nei topi knock-out sia per il biglicano che per la fibromodulina [149]. Esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* hanno evidenziato che la fibromodulina, pur presentando una composizione biochimica simile alla decorina, promuove (analogamente al biglicano) la maturazione delle fibrille collagene. Topi knockout per il gene della fibromodulina presentano, infatti, fibrille immature di piccolo diametro e conseguentemente una ridotta resistenza del tessuto tendineo [68]. L'alterazione nell'espressione della fibromodulina è inoltre accompagnata da un incremento compensatorio dei livelli di lumicano, il quale si lega al collagene di tipo I nella stessa regione della fibromodulina, sostituendola funzionalmente [100]. Tuttavia topi privi di lumicano producono fibrille collagene di grosso calibro che formano una matrice disorganizzata nella cornea e nel derma; l'assenza del lumicano comunque non sembra determinare alcuna modificazione delle proprietà meccaniche del tendine e pertanto si può concludere che la fibromodulina sia più importante del lumicano nell'influenzare le prestazioni meccaniche del tendine [68].

Gli ialectani sono i proteoglicani maggiormente coinvolti nell'interazione con acido ialuronico e lectine. A tutt'oggi la famiglia degli ialectani comprende

quattro molecole: versicano, aggregano, neurocano e brevicano. Studi strutturali hanno messo in luce la notevole somiglianza delle 4 molecole sia a livello genomico che proteico; tutti presentano tre domini: un dominio N-terminale che lega l'acido ialuronico, un dominio centrale ricco di catene laterali di GAG e una regione C-terminale legante la lectina.

Tra gli ialectani i più noti sono il versicano e l'aggrecano. Il versicano è il maggiore degli ialectani per dimensioni; è caratterizzato dalla presenza, a livello del dominio N-terminale, di due moduli consecutivi, denominati "link-protein", coinvolti nella regolazione del legame tra acido ialuronico e proteine. E' stato ipotizzato un possibile ruolo del versicano quale "ponte molecolare" tra proteine contenenti lectine, acido ialuronico e membrana cellulare. Il versicano è presente nella cute, nel connettivo lasso di diversi organi, a livello del tessuto muscolare, nella cartilagine elastica e fibrosa, oltreché nei vasi sanguigni, sia venosi che arteriosi [143, 144]. L'aggrecano rappresenta il principale proteoglicano della matrice cartilaginea. La presenza di numerose catene laterali di condroitinsolfato suggeriscono un importante ruolo dell'aggrecano nel conferire ai tessuti resistenza alle forze di compressione [129].

La composizione e il contenuto in PGs si modifica nelle diverse parti del tendine in funzione delle differenti richieste funzionali; così nella porzione tensile (soggetta cioè prevalentemente a tensione) i SLRPs prevalgono sui grandi PGs costituendo rispettivamente il 90% e il 10%, mentre nelle zone sottoposte a compressione vi è una maggior quantità assoluta di PGs; tuttavia le quantità relative dei PGs piccoli e di quelli macromolecolari sono all'incirca equivalenti [136, 137]. E' stato anche provato che i proteoglicani possono

determinare in rapporto al contenuto, al tipo e alle loro proporzioni reciproche, la fibrillogenesi, le dimensioni finali e l'orientamento delle fibre collagene, per mezzo di un'interazione tra le catene polianioniche e le zone basiche delle molecole di tropocollagene [32, 42]. Studi recenti suggeriscono inoltre un ruolo non secondario dei proteoglicani nella crescita e nel differenziamento tissutale, attraverso un'azione specifica sulle cellule. Si è scoperto infatti che molti proteoglicani possano legare fattori di crescita, modulandone l'attività. Il TGF-beta, per esempio, viene legato alla decorina che ne blocca l'attività.

## **2.6 GLICOPROTEINE**

Le glicoproteine sono macromolecole costituite da una grossa frazione proteica e da una scarsa componente glucidica. Rispetto ai proteoglicani, le glicoproteine presentano differenze sia di carattere quantitativo nel rapporto proteine-carboidrati, sia di carattere qualitativo nella composizione dei radicali glucidici. Infatti in essi sono presenti, oltre alle esosamine, esosi (glucosio, mannosio, etc.), un pentoso (fucosio) e l'acido sialico. Le catene glucidiche sono poi molto brevi, al contrario dei proteoglicani. La parte proteica delle glicoproteine tendinee è ricca di acido aspartico, acido glutammico e leucina. È stato dimostrato che esiste nel tendine una stretta associazione fra collagene e glicoproteine [6]. Anderson e Coll [7], hanno studiato gli effetti di una glicoproteina estratta dal tendine di bue sulla formazione *in vitro* delle fibre collagene da soluzioni di tropocollagene. La glicoproteina, aggiunta in quantità crescenti alle soluzioni di tropocollagene, diminuisce il diametro delle fibre collagene formatesi e ritarda l'aggregazione delle molecole di tropocollagene. Le cellule tendinee potrebbero così regolare lo spessore delle fibre collagene,

sintetizzando una molecola capace di interagire con le molecole di tropocollagene, limitandone l'ulteriore aggregazione.

## **2.7 MODIFICAZIONI DELLA MATRICE TENDINEA CON L'ETA'**

Tutte le matrici connettivali subiscono con l'età dei cambiamenti di carattere qualitativo e quantitativo che interessano in varia misura le macromolecole che le costituiscono. Così, nel tendine umano, alla nascita il collagene rappresenta circa il 35% del peso secco del tessuto, mentre i complessi proteina-polisaccaridi e le glicoproteine rappresentano rispettivamente circa il 5% ed il 6%. A sviluppo corporeo ultimato, il quantitativo di collagene raggiunge circa l'80%, mentre quello dei proteoglicani e delle glicoproteine passa rispettivamente al 2% e al 3%. Nel vecchio il contenuto di collagene rimane praticamente inalterato, mentre si ha un'ulteriore riduzione della quota proteoglicanica e glicoproteica [27] In riferimento ai proteoglicani, Carrino et al. [26] descrivono un decremento dei proteoglicani macromolecolari e un aumento di piccoli proteoglicani modificati nelle pelle di soggetti anziani. In particolare, nei tessuti adulti ma non in quelli embrionali, si riscontra la presenza di un catabolita della decorina, il "decorano", il quale presenta ridotte capacità di legare il collagene di tipo I e sarebbe pertanto responsabile dei cambiamenti nell'elasticità delle pelle nei soggetti anziani. Modificazioni analoghe sono state riscontrate anche in altri tessuti, tra cui i tendini. Anche le fibre elastiche subiscono importanti modificazioni sia strutturali sia numeriche. Esse infatti nel tessuto giovane mostrano il massimo sviluppo, consistente in un notevole aumento sia di numero sia della parte centrale amorfa. Nel vecchio invece esse si riducono di quantità e vanno incontro a processi involutivi con

una progressiva trasformazione della componente amorfa. Questa da radiotrasparente con le normali colorazioni usate in microscopia elettronica, diventa sempre più radiopaca. Di pari passo si riduce notevolmente anche il contenuto idrico passando dall'80% alla nascita, al circa 30% nel vecchio. Il significato funzionale di tali variazioni può essere così spiegato: il progressivo aumento di collagene dalla nascita fino al termine dell'accrescimento è una conseguenza delle aumentate necessità biomeccaniche del tendine in rapporto allo sviluppo muscolare. Analogamente il maggior numero di fibre elastiche riscontrato nel tessuto tendineo giovane è richiesto dalle particolari esigenze funzionali che l'apparato muscolo tendineo di un individuo giovane presenta [98]. La diminuzione dei proteoglicani e delle glicoproteine, considerata la funzione che essi hanno nella fase di aggregazione e nella stabilizzazione delle fibrille collagene, si può spiegare con la diminuita sintesi di tropocollagene da parte dei tenociti e con la definitiva strutturazione e stabilizzazione che il collagene presenta in questa fase di sviluppo. I cambiamenti di carattere qualitativo riguardano invece le modificazioni dello stato di aggregazione delle componenti della matrice, in primo luogo del collagene. Nella matrice del tessuto tendineo vecchio si osservano inoltre aree calcificate e fasci di fibrille collagene sottili.

## **2.8 CELLULE TENDINEE**

Il 90-95% degli elementi cellulari nel tendine è rappresentato dai tenoblasti e dai tenociti. Il restante 5-10% comprende condrociti, in corrispondenza dei siti di inserzione e nelle zone fibrocartilaginee sottoposte a compressione, cellule endoteliali dei capillari, cellule muscolari lisce delle arteriole nell'endotenonio

e nell'epitenonio, e sinoviociti delle guaine sinoviali [73]. I tenoblasti hanno forma e dimensioni varie: alcuni sono allungati, altri rotondeggianti ed altri poligonali e il loro diametro longitudinale varia da 20 a 60  $\mu\text{m}$ . Tutti presentano però una caratteristica comune: numerosi prolungamenti citoplasmatici che si estendono nella matrice in tutte le direzioni e provvedono a stabilire i contatti intercellulari. In corrispondenza di questi prolungamenti si osservano, infatti, gap junctions, tight junctions o giunzioni di tipo desmosomiale [71]. I tenoblasti elaborano tutte le componenti della matrice tendinea precedentemente descritte. Il collagene, l'elastina e la componente proteica dei proteoglicani e delle glicoproteine sono sintetizzati a livello del reticolo endoplasmatico rugoso; mentre la sintesi della parte glucidica di questi si svolge nell'apparato del Golgi. A livello del Golgi avviene anche la glicosilazione del collagene. L'attività sintetica delle cellule tendinee è elevata nelle prime fasi dell'accrescimento del tendine e va diminuendo man mano che il tendine raggiunge il suo sviluppo definitivo. Nel tendine di neonato infatti il rapporto fra cellule e matrice è elevato e il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi sono notevolmente sviluppati. Nel citoplasma corticale sono anche presenti numerose vescicole pinocitotiche associate a fasci di filamenti, alcuni spessi misuranti circa 120 Å di diametro, altri sottili di circa 70 Å che all'immunofluorescenza sono risultati essere costituiti da actina e miosina. Questo rilievo morfologico è molto importante ai fini della fisiologia del tendine. Questo infatti non deve essere considerato un trasmettitore passivo della contrazione muscolare all'osso, ma elemento attivo nell'ambito della catena cinetica muscolo-tendine-osso [65]. Con l'età la morfologia cellulare cambia: le cellule ora chiamate tenociti diventano fusiformi ed estremamente

allungate raggiungendo anche i 300  $\mu\text{m}$  di lunghezza. In sezione trasversale i tenociti mostrano un notevole sviluppo dei prolungamenti citoplasmatici, che diventano lunghissimi, ed assumono una forma stellata. Probabilmente la rete formata da questi prolungamenti è importante per assicurare gli scambi metabolici fra cellule e matrice in aree lontane dai corpi cellulari e provvede a compensare la riduzione numerica delle cellule a fronte dell'aumento di matrice che si determina con l'età.

L'invecchiamento del tessuto tendineo comporta oltre ad una graduale diminuzione del rapporto cellule/matrice anche una riduzione dell'attività sintetica delle cellule tendinee [73]. I tenociti conservano la capacità di sintetizzare tutti i componenti della matrice extracellulare tendinea ma la loro attività è comunque inferiore a quella dei tenoblasti. Come detto precedentemente le cellule tendinee non si limitano a sintetizzare i componenti della matrice ma provvedono altresì a controllare le fasi iniziali della fibrillogenesi e ad influenzare l'orientamento e la deposizione delle fibrille neoformate in seno alla ECM.

## **CAPITOLO 3**

### **FISIOLOGIA DEI TENDINI**

#### **3.1 PROPRIETA' BIOMECCANICHE DEI TENDINI**

La funzione dei tendini è quella di trasmettere gli impulsi meccanici derivanti dalla contrazione muscolare alle leve scheletriche. E' facilmente intuibile che per svolgere questa funzione deve esistere un rapporto costante tra forza di contrazione muscolare e resistenza alla tensione del tendine. Tale rapporto deve mantenersi invariato per tutta la vita e l'unità muscolo-tendinea deve di conseguenza adattarsi di volta in volta alle richieste funzionali dell'apparato locomotore. Il tendine quindi deve possedere in ogni momento una forza tensoria tale da poter resistere alla massima potenza sviluppata da una contrazione muscolare.

Il comportamento biomeccanico di un tendine è correlato non soltanto all'entità della sollecitazione tensoria, ma anche alla forma del tendine stesso [1, 35, 145]; così muscoli deputati a compiere movimenti delicati e di precisione, come i flessori delle dita, possiedono tendini lunghi e sottili, mentre quelli che svolgono azioni di potenza e resistenza, come il quadricipite femorale e il tricipite surale, hanno tendini più brevi e robusti. Un tendine corto infatti possiede una maggior resistenza alla trazione di un tendine lungo, perché il

carico richiesto per produrre la rottura è molto più grande nel tendine corto a parità di diametro. Tuttavia un tendine lungo è in grado di subire una deformazione maggiore di quella di un tendine corto prima di andare incontro a rottura. Quindi, sebbene siano leggermente più deboli dei tendini corti per unità di lunghezza, i tendini lunghi possono assorbire una quantità di energia maggiore e risultare nel complesso più resistenti alla rottura dei tendini corti di uguale diametro. Forza e resistenza di un tendine sono dunque due entità diverse e dipendono dal diametro e dalla lunghezza del tendine stesso. Più precisamente le proprietà biomeccaniche del tendine sono collegate al diametro e all'arrangiamento delle fibrille collagene che lo costituiscono. Infatti, tendini sottoposti ad alti carichi tensili sono costituiti da fibrille di diametro elevato, meno flessibili di quelle di piccolo calibro presenti in altri tessuti connettivi, come la cute o le pareti dei vasi.

La capacità dei tendini di ammortizzare e di trasmettere la forza della contrazione muscolare è inoltre strettamente correlata al crimp tendineo. È stato osservato che maggiore è il carico cui un tendine è sottoposto, tanto maggiore è l'angolo alla base dei crimps [85, 96, 106, 147]. Questo tende quindi ad essere maggiore nei tendini che lavorano contro la forza di gravità e che sono quindi sottoposti ad elevate deformazioni tensili, come il tendine di Achille e il tendine del quadricipite femorale. I tendini che svolgono funzioni di elevata specificità e precisione, come l'estensore lungo del pollice, e che quindi sono soggetti a carichi meccanici più lievi, sono costituiti da fibre che formano crimps con un angolo alla base minore, ovvero più piatti [67]. L'importanza del crimp per il comportamento funzionale del tendine risulta evidente anche da altre osservazioni: quando il tendine viene stirato i crimps tendono

progressivamente ad appiattirsi; al microscopio ottico a luce polarizzata non si osserva più l'alternanza di bande chiare e scure che contraddistinguono il tendine a riposo, ma una struttura che riflette uniformemente la luce [133]. Osservando il tendine al microscopio elettronico a trasmissione, si nota che lungo le fibrille completamente distese per effetto dello stiramento, sono ancora riconoscibili quelle peculiari e localizzate deformazioni corrispondenti ai crimps fibrillari [44, 132]. Pertanto, anche laddove i crimps tendinei non sono più istologicamente identificabili, i crimps fibrillari permangono e la loro persistenza dopo stiramento suggerisce che essi siano le reali strutture che agiscono come shock absorber nel tendine durante le prime fasi dello stiramento e che consentano al tendine di recuperare la struttura istologica a fasci a zig-zag al cessare della forza tensile applicata [44]. Un'ulteriore conferma dell'importante ruolo dei crimps fibrillari per la funzionalità del tendine risiede nell'osservazione dei crimps fibrillari unicamente nelle fibrille di tipo T rappresentando pertanto una caratteristica peculiare dei tessuti sottoposti a carichi tensili elevati [103].

### **3.2 CRIMPS E CURVA TENSIONE-DEFORMAZIONE**

Il comportamento meccanico del tendine può essere visto come la sovrapposizione di tre distinti comportamenti fondamentali:

- **elasticità**: la tendenza di un materiale a deformarsi in maniera proporzionale ai carichi applicati e ad assumere le medesime condizioni iniziali una volta cessata la forza deformante;
- **plasticità**: un materiale si dice plastico quando, sottoposto ad una sollecitazione meccanica, non subisce alcuna deformazione finchè la

sollecitazione meccanica non raggiunge un determinato valore che prende il nome di carico limite. Al di là di esso la deformazione prosegue indefinitivamente finché la sollecitazione non viene rimossa;

- **viscosità**, un materiale ha comportamento viscoso quando esiste proporzionalità tra la velocità di deformazione del materiale e la forza applicata. Mentre nel comportamento elastico la deformazione è proporzionale alla forza, nel comportamento viscoso la deformazione risulta proporzionale non solo alla forza, ma anche al tempo in cui essa viene applicata.

Durante la contrazione muscolare il tendine è sottoposto prevalentemente a sollecitazioni tensorie, unidirezionali, minime sono le sollecitazioni flessorie, pressorie o di torsione. Quando è assoggettato ad una forza traente, esso subisce un allungamento pari al 4% circa della sua lunghezza originaria. Successivamente il tessuto tendineo dimostra una notevole rigidità per aumenti anche notevoli della forza traente. Per carichi ancora più elevati si ha un maggiore incremento dell'entità della deformazione che porta infine alla rottura del tendine. Il comportamento biomeccanico del tendine è bene illustrato dalla curva tensione-deformazione (Fig. 12). Il tendine, dopo essere stato prelevato dalla sua sede anatomica e prima di essere sollecitato meccanicamente, è formato da fasci di fibre collagene a decorso ondulato. Applicando al tendine una graduale sollecitazione tensoria, l'ondulazione tende a scomparire, i crimps tendinei si appiattiscono, e di conseguenza, il tendine si estende.

La contrazione del muscolo determinerebbe quindi un appiattimento dell'ondulazione con successiva trasmissione della forza traente all'osso per

mezzo dei fasci di fibre divenuti rettilinei. Fino a deformazioni del 4% circa della lunghezza originale, il comportamento del tendine è elastico.

Se infatti viene sottratta la forza deformante, il tendine riassume la lunghezza originale e i crimps si ricostituiscono.

## Tendon stress/strain curve

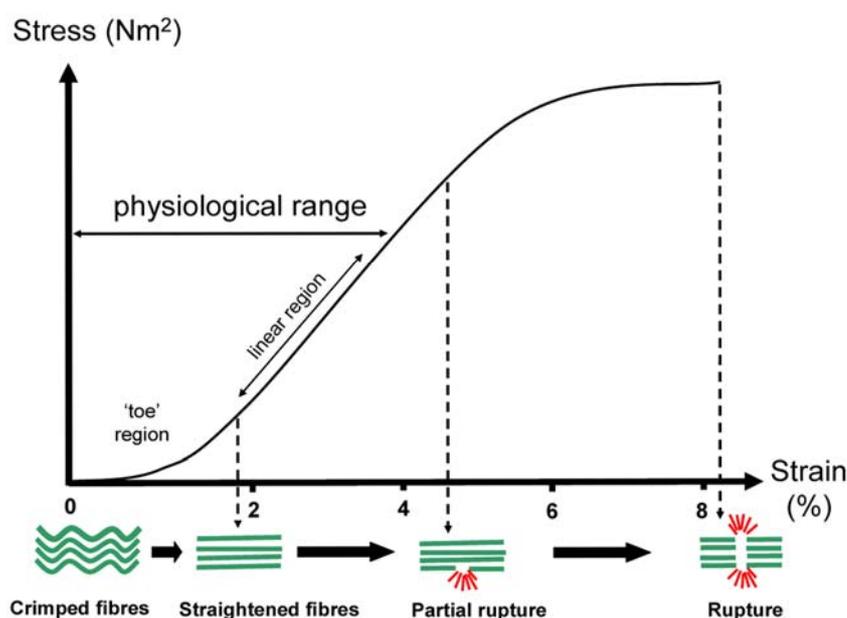


Figura 12. Curva tensione-deformazione del tendine.

La prima parte della curva (toe region) con decorso non lineare presenta appunto le caratteristiche di un comportamento elastico, in cui tensione e deformazione sono proporzionali. È proprio in questa prima parte della curva che cadono i carichi fisiologici dei tendini. Pertanto la sola distensione dei crimps è sufficiente a produrre un allungamento dell'1-4% rispetto alla lunghezza originale del tendine, permettendo piccole deformazioni longitudinali senza danneggiamento del tessuto e fungendo da shock absorber in grado di assorbire la forza iniziale applicata al tendine all'inizio dello

stiramento e di trasmetterla alla leva scheletrica. L'ampiezza della toe region sembra quindi dipendere dalla struttura e dalle caratteristiche morfologiche dei crimps, che a loro volta sono correlate alla specifica funzione del tendine. Ad esempio, il tendine della coda di ratto, non sottoposto a sollecitazioni, presenta una toe region più stretta (1-2%) [55, 70]. Alla regione iniziale non-lineare segue una regione pressoché lineare più rigida, caratterizzata da un improvviso aumento della pendenza della curva: al crescere del carico, infatti, la rigidità del tessuto aumenta, in quanto la forza deformante viene applicata su fibre collagene ormai distese che oppongono quindi una resistenza crescente alla trazione [76, 77] e pertanto è richiesta una forza progressivamente maggiore per produrre un allungamento specifico d'egual valore. In questa fase non è possibile apprezzare ulteriori modificazioni strutturali a livello microscopico, pertanto l'ulteriore deformazione del tendine si produce attraverso modificazioni che interessano i livelli submicroscopici della gerarchia strutturale tendinea, ossia le fibrille e le singole molecole collagene [47, 113, 114]. Per grandi allungamenti, la curva carico-deformazione può interrompersi bruscamente o puntare verso il basso come risultato di cambiamenti irreversibili nella struttura del tessuto. Si dice allora che il tessuto ha raggiunto il punto di plasticizzazione. Il carico di rottura è stato variamente calcolato. Esso oscilla per tendini freschi da 3 a 4,5 Kg/mm<sup>2</sup> con una percentuale di allungamento del 14-18% in campioni prelevati da animali o da esseri umani molto giovani. Per tendini prelevati da soggetti adulti, invece, il carico di rottura oscilla fra i 4,3 e gli 11,5 Kg/mm<sup>2</sup> con una percentuale di allungamento del 10-12,5%. I tendini degli individui giovani sono quindi più deboli ma più elastici di quelli degli adulti [65]. Ciò può essere dovuto alla diversa struttura

fisico-chimica dell'impalcatura collagena, alle variazioni quantitative e qualitative che subiscono le fibre elastiche con l'età, alla diminuzione dei proteoglicani e del contenuto idrico [94]. Anche i crimps si appiattiscono con l'età determinando un accorciamento della toe region e quindi una riduzione della forza richiesta per indurre la scomparsa dei crimps [36].

### **3.3 RAPPORTI FRA COMPOSIZIONE BIOCHIMICA E PROPRIETÀ BIOMECCANICHE DEL TENDINE**

Il ruolo svolto dalle componenti macromolecolari del tessuto tendineo sulla elasticità, plasticità e viscosità del tendine non è ancora completamente chiaro. Le diverse componenti della matrice extracellulare tendinea formano un'unità funzionale in cui, però, ciascuna di esse gioca un ruolo preminente sulla elasticità, plasticità e viscosità, quindi nel determinismo di un aspetto particolare del comportamento biomeccanico complessivo del tessuto. Le interazioni tra fibrille e PGs e quelle tra le catene dei GAGs sono entrambe non covalenti e perciò potenzialmente reversibili [112]. E' perciò plausibile che le fibrille possano slittare le una sulle altre attraverso un meccanismo che prevede la rottura e la successiva ricostituzione dei suddetti legami; in questo modo perciò anche i PGs favorirebbero la trasmissione delle forze tensili e contribuirebbero alla deformazione tendinea [119]. Partington e Wood [95], digerendo il tendine con ialuronidasi (enzima che degrada la componente glicosaminoglicanica dei proteoglicani), hanno osservato che, dopo il trattamento enzimatico, il tessuto tendineo mostrava un comportamento più elastico. Se i tendini venivano trattati con  $\alpha$ -amilasi ed EDTA, che attaccano la matrice tendinea interfibrillare di natura glicoproteica, il tessuto tendineo

mostrava una diminuzione dell'entità di carico in grado di provocare una deformazione del 2% ed un abbassamento della curva tensione-deformazione. Da questi dati si può dedurre che i proteoglicani e le glicoproteine esercitano particolare influenza sulla viscosità del tendinee e la loro degradazione con metodiche enzimatiche provoca una diminuzione della viscosità del tessuto. D'altra parte, l'abbassamento della curva tensione-deformazione osservato dopo trattamento con  $\alpha$ -amilasi e l'aumento dell'elasticità del tendine osservato dopo trattamento con ialuronidasi, farebbero pensare che i proteoglicani influenzano anche la plasticità del tendine. Probabilmente l'estrazione del materiale glicoproteico determina una riduzione del numero dei legami chimici presenti tra le fibre collagene facendo diminuire la plasticità del tessuto. La plasticità del tendine è tuttavia regolata principalmente dal collagene [57]. Abbiamo infatti precedentemente visto come la rigidità del tessuto tendineo sia direttamente proporzionale al contenuto assoluto di collagene, e alla quantità di legami intra e intermolecolari della proteina fibrosa. I tendini di soggetti molto giovani in cui il contenuto di collagene e lo stato di aggregazione della proteina sono più bassi hanno infatti un comportamento meno plastico di quello dei tendini di soggetti adulti. L'elasticità è invece controllata principalmente dalle fibre elastiche. Lo scarso contenuto di fibre elastiche del tendine, spiega perché il decorso della curva tensione-deformazione è così ripido se paragonato a quello di tessuti più ricchi di elastina, come ad esempio i legamenti.

## **CAPITOLO 4**

# **TENDINI DELL'APPARATO ESTENSORE DEL GINOCCHIO**

### **4.1 TENDINE DEL QUADRICIPITE**

Il tendine del quadricipite umano è una spessa formazione connettivale derivante dalla confluenza dei tendini dei quattro ventri del muscolo quadricipite femorale. I tendini terminali del retto del femore e dei vasti (mediale, laterale e intermedio), convergendo in basso verso la faccia anteriore del ginocchio, vengono fra loro a combaciare e in parte si uniscono, sebbene si possa sempre distinguerli l'uno dall'altro. Essi si sovrappongono infatti dall'avanti all'indietro senza che tra loro si effettui una vera e propria fusione, ma piuttosto un accollamento con interposizione di tessuto connettivo aureolare; da qui ne deriva la possibilità che negli intervalli si sviluppino borse mucose [105]. Pertanto a livello della patella il muscolo quadricipite, formato apparentemente da un tendine unico, si compone in realtà di più lamine sovrapposte. Il tendine di un capo muscolare può fondersi, totalmente o parzialmente, con quelli degli altri capi, o raggiungere la rotula individualmente. Il tendine del quadricipite potrebbe così avere struttura bi-, tri- o tetralaminare (Fig. 13: B; C, D).

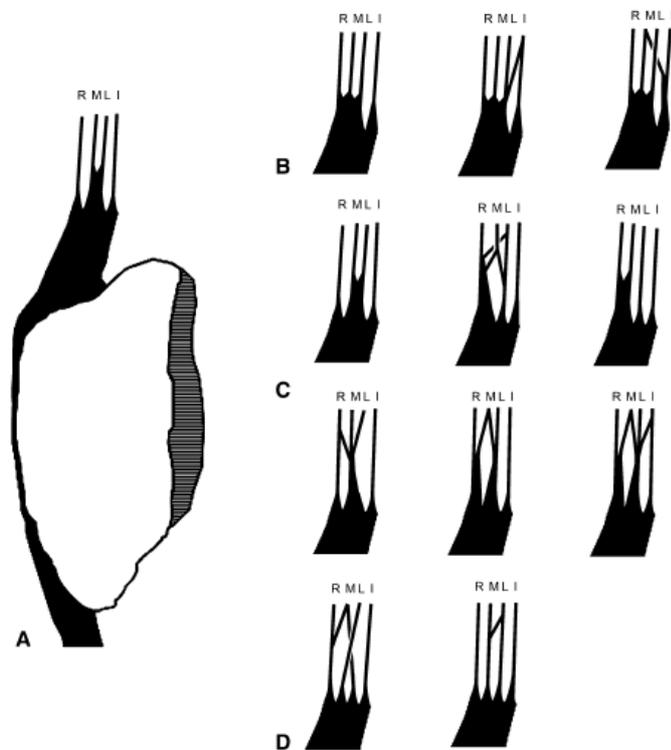


Figura 13. Possibili modalità di inserzione del tendine del quadricipite sulla patella. A, unilaminare; B, bilaminare; C, trilaminare; D, quadrilaminare (R= retto del femore; M= vasto mediale; L= vasto laterale; I= vasto intermedio) [Waligora et al., 2009].

E' ormai oggi consuetudine [141, 8] ritenere che il tendine del quadricipite sia formato da tre lamine sovrapposte:

- una **superficiale**, formata dal del tendine del retto femorale;
- una **intermedia**, dovuta alla fusione dei tendini dei vasti mediale e laterale;
- una **profonda**, costituita dal tendine del vasto intermedio.

#### 4.1.1 Lamina superficiale del tendine del quadricipite

La lamina superficiale del tendine del quadricipite è la prosecuzione del tendine del retto femorale. Il muscolo origina dalla spina iliaca antero-inferiore e dal contorno superiore acetabolare dell'osso dell'anca; si porta in basso con

andamento verticale e, ad una distanza di circa 8 cm dalla rotula, si continua in un tendine che, con le sue fibre profonde, termina sul bordo anteriore della base della patella [8, 49], mentre con le sue fibre superficiali si estende sulla faccia anteriore della stessa e si continua in basso con il tendine patellare [43, 88, 120, 121].

#### **4.1.2 Lamina intermedia del tendine del quadricipite**

La lamina intermedia del tendine del quadricipite è formata dai contributi fibrosi del vasto mediale e del vasto laterale. I due muscoli, convergendo verso la regione del ginocchio, uniscono le loro inserzioni per formare un'aponevrosi molto resistente, le cui fibre prossimali si fissano sulla base della patella subito dietro il tendine del retto femorale, mentre le fibre distali e più esterne rispetto all'asse dell'arto si attaccano sul bordo della patella [49]. Alcune fibre muscolari del vasto mediale mostrano un decorso obliquo rispetto all'asse longitudinale del tendine del quadricipite, formando con questo un angolo di 55°-70° (Fig. 14) [19]. Le fibre trapassano nel tendine solo pochi millimetri prima di inserirsi sul margine mediale della patella e contribuiscono alla formazione del legamento patello-femorale mediale, che stabilizza medialmente l'articolazione del ginocchio [5]. Un'altra parte delle fibre tendinee del vasto mediale continuano distalmente e partecipano alla formazione del retinacolo mediale della rotula [88].

Il muscolo vasto laterale termina più prossimalmente rispetto al muscolo vasto mediale e trapassa in un tendine ad una distanza di circa 2,8 cm dal margine laterale superiore della patella. Le fibre tendinee del vasto laterale, inoltre, arrivano alla rotula formando con l'asse del tendine quadricipitale un angolo di

circa 31°, che risulta quindi più acuto di quello descritto dai fasci del vasto mediale. Le fibre mediali del tendine si inseriscono in prossimità del margine laterale della patella; quelle più laterali si portano esternamente partecipando alla costituzione del retinacolo laterale della rotula [49]. Infine lunghe fibre aponevrotiche dei due vasti, le cosiddette espansioni quadricipitali, si incrociano al davanti della parte superiore della patella e vanno a fissarsi sulla tibia; in particolare quelle del vasto laterale sulla porzione mediale del margine infraglenoideo, mentre quelle del vasto mediale sulla porzione laterale del margine dello stesso osso [105].

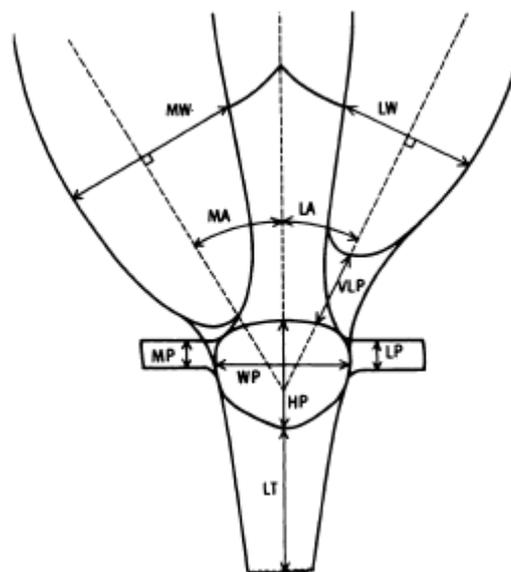


Figura 14. Diagramma schematico dell'apparato estensore del ginocchio. Vengono riportati: spessore dei legamenti patello-femorale mediale (MP) e laterale (LP); angolo compreso tra il tendine del retto femorale e le fibre del vasto mediale (MA) e del vasto laterale (LA); grandezza del muscolo vasto mediale (MW) e del vasto laterale (LW) a livello del margine superiore del tendine del retto femorale; lunghezza del tendine infrapatellare (LT); distanza tra le fibre muscolari più distali del vasto laterale e il margine latero-superiore della patella (VLP); lunghezza (HP) e ampiezza (WP) della faccia anteriore della patella [Reider B et al, 1981].

### 4.1.3 Lamina profonda del tendine del quadricipite

Lo strato più profondo del tendine del quadricipite femorale è dato dal contributo unico del vasto intermedio. La maggior parte delle fibre del tendine

prende inserzione direttamente sul margine superiore della rotula, senza continuare sulla faccia anteriore dell'osso; le restanti possono unirsi con le fibre connettivali dei due vasti formando un'unica lamina subito al di sotto del tendine del retto femorale [105].

In molti mammiferi, ad eccezione dell'uomo, si sviluppa nello spessore del tendine del vasto intermedio al di sopra della patella ossea una fibrocartilagine sesamoide chiamata *soprapatella* (Fig. 15). In questi animali infatti l'articolazione del ginocchio è in posizione posturale di flessione; di conseguenza la parte profonda del tendine del quadricipite è soggetta costantemente a compressione da parte dei condili femorali [101, 139]. La soprapatella provvederebbe ad assorbire le sollecitazioni meccaniche esercitate dal femore sul tendine del vasto intermedio. Oltre ad avere una funzione protettiva, la soprapatella è parte integrante dell'articolazione del ginocchio: durante l'estensione è la patella ossea che si appone alla faccia rotulea del femore, mentre durante la flessione è la patella fibrocartilaginea che si articola con i condili femorali [60].

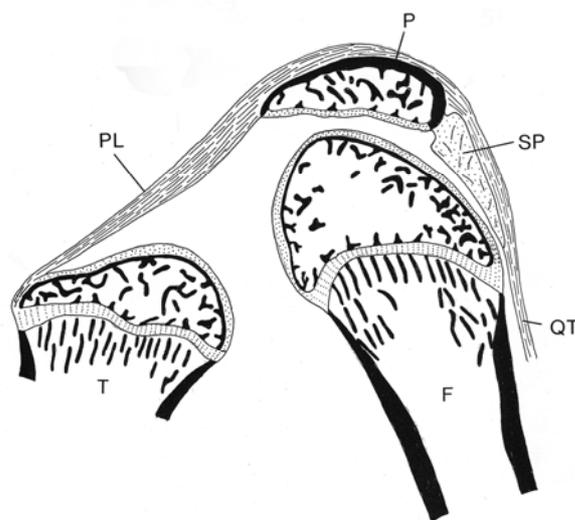


Figura 15. Articolazione del ginocchio di ratto. F, femore; T, tibia; QT, tendine del quadricipite; SP, soprapatella; P, patella; PL, legamento patellare [Ralphs J et al., 1991].

## **4.2 TENDINE PATELLARE**

Il tendine patellare nell'uomo è uno spesso nastro connettivale lungo 5 o 6 centimetri, che si estende, in senso medio-laterale dall'apice e dalla parte distale (non articolare) della faccia posteriore della rotula alla metà inferiore della tuberosità della tibia. Esso rappresenta una struttura dinamica in quanto riceve attraverso la rotula la potente azione del muscolo quadricipite e la trasmette alla tibia; ma allo stesso tempo costituisce a riposo una solida struttura di rinforzo per la parte anteriore della capsula articolare. Essendo interposto tra la patella e la tibia, in osteologia è sempre stato descritto come *legamento patellare* [29, 40, 50, 59, 102, 130, 131].

Tuttavia indagini biochimiche hanno rilevato che la composizione della matrice extracellulare del tessuto sottopatellare nell'uomo e in altri mammiferi è molto simile a quella dei tendini e differisce da quella degli altri legamenti del ginocchio [4]. In particolare, la quantità totale di collagene nel tendine patellare è sovrapponibile a quella del tendine d'Achille e significativamente maggiore di quella presente nei legamenti crociati e collaterale mediale, i quali peraltro mostrano valori tra loro simili. A seguito di queste osservazioni e sulla base della continuità tra le strutture connettivali sopra-e sotto-patellari, altri autori [11, 12, 22, 23, 55, 56, 97, 148] considerano il tendine del quadricipite e il legamento patellare una formazione unica e la patella l'osso sesamoide che in essa si è sviluppato. Sebbene siano in continuità tra loro e presentino una simile organizzazione gerarchica del collagene, sono state osservate importanti differenze tra i due tessuti: il tendine del quadricipite presenta una densità di fibroblasti e un rapporto fibrille/spazi interfibrillari significativamente più alti

del tendine patellare [54] e meccanicamente mostra anche una resistenza tre volte superiore [130, 131].

In virtù di tali differenze il tendine patellare e il tendine del quadricipite andrebbero considerati come due strutture distinte.

## **SCOPO DELLA TESI**

La letteratura mostra pareri discordanti sulla denominazione della struttura sottopatellare. Gli autori di estrazione anatomica [29, 40, 50, 60, 102, 130, 131], facendo riferimento alla definizione classica di legamento, descrivono la parte del tendine estensore compreso tra la patella e la tibia quale legamento patellare. Altri autori [11, 12, 22, 23, 55, 56, 97, 148] evidenziano però che il tessuto sottopatellare presenta caratteristiche biochimiche diverse dagli altri legamenti del ginocchio e simili invece a quelle dei tendini; lo si potrebbe pertanto considerare come la prosecuzione del tendine del quadricipite dal quale è rimasto separato per interposizione del voluminoso osso sesamoide che è la rotula. Analisi biomeccaniche tra le due strutture portano tuttavia ad escludere questa ipotesi [130, 58].

Rimane ancora da dimostrare dal punto di vista morfologico se il tessuto connettivale sottopatellare sia un tendine o un legamento.

Una differenza strutturale importante tra tendini e legamenti risiede nella diversa organizzazione delle fibre e dei fasci di fibre collagene [4, 62, 99]. Nei tendini queste sono strettamente impacchettate le une alle altre e allineate parallelamente sia tra loro che all'asse tendineo. Nei legamenti, invece, le fibre e i fasci di fibre non sono così uniformemente orientati. Queste differenze possono essere spiegate sulla base delle diverse richieste funzionali delle due strutture. La funzione del tendine è quella di trasmettere all'osso la forza della contrazione muscolare, durante la quale esso è assoggettato prevalentemente a sollecitazioni tensorie unidirezionali [78, 36, 38, 47, 99]. Un legamento, invece, può essere sottoposto oltre che a tensione anche a rotazione e compressione, ed il diverso orientamento delle fibre collagene gli consente di limitare l'ampiezza dei movimenti articolari e quindi di stabilizzare l'articolazione alla quale è

collegato [16, 62, 82, 99, 146]. Pertanto, l'assetto strutturale dei tendini e dei legamenti determina e controlla le loro proprietà meccaniche.

Ad oggi non è presente in letteratura uno studio sull'arrangiamento delle fibrille e delle fibre collagene nel tessuto sopra- e sottopattellare; allo stesso modo non è stata ancora condotta un'analisi morfo-funzionale approfondita sui diversi componenti del tendine del quadricipite e sulle forze che essi trasmettono in relazione ai muscoli dai quali dipendono. Una particolarità del muscolo quadricipite è infatti rappresentata dalla diversa composizione in fibre dei suoi ventri muscolari, resa indispensabile da differenti necessità funzionali. Si riscontrano infatti fibre bianche e spesse che producono contrazioni muscolari rapide, potenti ed intense, e fibre rosse, sottili e lente, che vengono sollecitate in un lavoro muscolare di scarsa entità ma di lunga durata. Uno studio *in vivo* [150] ha evidenziato che durante un'estensione volontaria isometrica del ginocchio, il primo estensore coinvolto è il vasto intermedio, che contribuisce da solo al 50% circa dell'estensione totale del ginocchio. Il retto femorale e il vasto laterale contribuiscono all'estensione del ginocchio con una percentuale del 20-25% e del 18-24.% rispettivamente; il contributo minore proviene dal vasto mediale (9-12%). Questi risultati sono anche confermati dagli studi di Lieb e Perry [84] in cui il vasto intermedio è risultato il più efficiente tra i ventri muscolari del quadricipite femorale.

Prendendo spunto da queste osservazioni, la mia ricerca si propone di fornire una visione morfologica ed ultrastrutturale più approfondita delle strutture connettivali dell'apparato estensore del ginocchio e del loro contributo alla

dinamica articolare complessiva. In particolare saranno esaminati il tendine del retto femorale, il tendine del vasto intermedio e il tendine patellare.

Come visto precedentemente, quando si analizza il comportamento meccanico delle strutture tendinee non si può prescindere dal considerare l'importante ruolo svolto dal crimp che all'interno del tendine agirebbe come shock-absorber durante le prime fasi dello stiramento e consentirebbe il successivo ritorno elastico del tessuto al cessare della forza tensoria

Poiché "la forma segue la funzione" [145], verrà analizzata l'architettura istologica ed ultrastrutturale del crimp nei tessuti in esame e verrà correlata allo specifico ruolo funzionale che gli stessi giocano nell'apparato estensore del ginocchio.

# **MATERIALI E METODI**

## **PROCEDURA SPERIMENTALE E PRELIEVO DEI TENDINI**

Lo studio è stato condotto su 9 ratti femmine di ceppo Sprague-Dawley dell'età di 80 giorni. Gli animali, stabulati secondo la normativa vigente sono stati anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di 87 mg/Kg di ketamina (Ketavet, Farmaceutici Gellini Spa, Italia) e 13mg/Kg di xylazina (Rompun, Bayer Italia Spa, Italia).

Successivamente nella regione del ginocchio è stata praticata una preliminare fissazione in situ mediante microiniezioni multiple sottocutanee di fissativo Karnovsky al 4% (paraformaldeide al 4% più glutaraldeide al 2,5% in tampone cacodilato 0.1M a ph 7.4) al fine di preservare la tensione fisiologica delle strutture connettivali presente in vivo. Dopo esposizione ed isolamento chirurgico si è proceduto al prelievo del complesso: tendine del muscolo quadricipite, soprapatella (SP), patella ossea (PO) e tendine patellare (TP). In particolare, sono stati isolati due componenti del tendine del quadricipite: il tendine del retto femorale (TRF) e il tendine del vasto intermedio (TVI). I campioni così prelevati sono stati quindi processati per la microscopia ottica a luce polarizzata (PLM) e per l'analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico a scansione (SEM) ed a trasmissione (TEM).

I ratti sono stati quindi sottoposti ad eutanasia farmacologica mediante iniezione intracardiaca di Tanax (Hoechst, Frankfurt am Main, Germany).

Lo studio è stato condotto in accordo con la legislazione europea e italiana sulla sperimentazione animale e secondo i principi riportati nella "Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio".

## **MICROSCOPIA OTTICA A LUCE POLARIZZATA (PLM)**

Alcuni dei campioni prelevati sono stati ulteriormente fissati per immersione in formalina tamponata al 10% per 24 ore e successivamente decalcificati in acido nitrico al 5% per una settimana. In seguito, i campioni sono stati disidratati utilizzando la serie ascendente degli alcoli: alcool etilico 80° per circa 3 giorni, alcool etilico 90° per 1 giorno, alcool etilico 95° per 3 ore, alcool etilico 100° per 2 ore.

Una volta disidratati, i preparati sono stati posti in xilolo e ivi mantenuti fino alla loro completa diafanizzazione. I campioni sono stato quindi trasferiti in paraffina fusa e posti in stufa, in modo che la paraffina non solidificasse. Nella paraffina fusa il tessuto deve avere il tempo di cedere del tutto lo xilolo di cui è impregnato; il soggiorno deve quindi essere di durata sufficiente ed è conveniente sostituire una o due volte la paraffina, in modo che essa possa sostituirsi completamente allo xilolo. Per tale motivo i campioni sono stati mantenuti una notte in paraffina I (la quale fonde ad una temperatura di 46°-48° C) e in seguito posti per 30-45 minuti in paraffina II (la quale fonde a 58°-60° C). Completata l'infiltrazione i campioni sono stati inclusi ponendoli in formelle metalliche precedentemente riempite di paraffina fusa; durante questa fase i preparati sono stati orientati in modo tale da consentire il successivo sezionamento longitudinale. Le formelle sono state lasciate a temperatura ambiente fino a completa solidificazione che normalmente richiede 2-3 giorni. I blocchetti di paraffina, una volta estratti dalle formelle, sono stati tagliati al microtomo in sezioni longitudinali di 10 µm di spessore, le quali sono state asciugate in stufa a 37° C per un giorno e di seguito colorate.

Per la colorazione è stato utilizzato il Picrosirius (Sirius Red 0,5% in soluzione acquosa satura di acido picrico), un colorante azoico anionico che colora selettivamente il collagene, reagendo attraverso i suoi gruppi solforici acidi con i gruppi basici ionizzabili presenti nelle molecole del collagene [72]. Le molecole del colorante si dispongono parallelamente alle fibre collagene e questo allineamento concorre ad incrementare la naturale birifrangenza del tessuto tendineo. Dopo la colorazione i vetrini sono stati coperti con balsamo e vetrino copri-oggetto, posti ad essiccare in stufa a 37° C per 2 giorni e quindi osservati al microscopio ottico a luce polarizzata (Leitz Ortholux 2, Wetzlar, Germany) per analizzare l'orientamento spaziale dei fasci di fibre collagene.

### **MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)**

I campioni per il SEM sono stati dapprima ridotti in piccole dimensioni così da poter essere successivamente montati sugli appositi supporti (stubs) e quindi fissati in soluzione Karnovsky al 4% (paraformaldeide 4% più glutaraldeide 2,5% in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7.4) per 1 giorno. Dopo due lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M (ciascuno della durata di 15 minuti), i campioni sono stati post-fissati in tetrossido di osmio all'1% per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito i campioni sono stati sottoposti a due lavaggi di 15 minuti in tampone cacodilato 0,1 M e quindi disidratati nella serie ascendente degli alcoli: due passaggi in alcool etilico 70° ciascuno della durata di 10 minuti, due passaggi di 10 minuti in alcool etilico 80°, due passaggi di 10 minuti in alcool etilico 95° ed infine due passaggi di 20 minuti in alcool etilico 100°.

I campioni sono stati quindi essiccati mediante due passaggi (ciascuno della durata di 15 minuti) in esametildisilazano (HDMS), il quale è stato poi

allontanato per completa evaporazione. Successivamente i preparati sono stati montati sugli stubs metallici mediante scotch biadesivo al carbone e quindi rivestiti con uno strato di 20 nm di oro/palladio mediante tecnica di sputtering (Balzers Union SCD 004 Sputter Coater, Liechtenstein). La ricopertura del campione mediante metallizzazione viene condotta allo scopo di creare un film conduttivo che aumenti la conducibilità superficiale del tessuto durante l'interazione con il fascio elettronico. I campioni così allestiti sono stati osservati al SEM (Philips 515 and Philips XL30-FEG, Eindhoven, The Netherlands) utilizzando una sonda per elettroni secondari con una tensione di 15 kv.

### **MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)**

Per l'analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico a trasmissione il tendine del retto femorale, il tendine del vasto intermedio e il tendine patellare sono stati isolati dal complesso muscolo-tendineo del ginocchio. I campioni destinati all'analisi ultrastrutturale al TEM sono stati anzitutto ridotti in blocchetti di piccole dimensioni, quindi ulteriormente fissati per immersione in soluzione Karnovsky al 4% (paraformaldeide 4% più glutaraldeide 2,5% in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7.4) per 1 giorno. Dopo la fissazione i campioni sono stati sottoposti a tre lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M per eliminare il fissativo in eccesso che non era penetrato nel tessuto e non si era legato ai suoi componenti..

I campioni sono stati quindi postfissati in tetrossido di osmio all'1% per 1 ora a temperatura ambiente. Il tetrossido di osmio viene utilizzato come fissativo secondario per la sua capacità di stabilizzare le membrane biologiche; è infatti

solubile nei grassi e si combina con i lipidi insaturi rendendoli insolubili negli alcoli. In seguito i campioni sono stati sottoposti a tre lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M, quindi disidratati utilizzando la serie ascendente degli alcoli: alcool etilico 80° per 30 minuti, alcool etilico 90° per 30 minuti, alcool etilico 95° per 30 minuti e poi un secondo passaggio nello stesso alcool overnight, quindi alcool 100° per 1 ora. La disidratazione è stata condotta mantenendo tessuti e soluzioni in frigorifero alla temperatura di 4 C° in modo da rallentare ulteriormente i processi chimici degenerativi della morfologia e della chimica del tessuto in preparazione.

Dopo la disidratazione i campioni sono stati trattati per 1 ora con ossido di propilene, sostanza molto volatile e penetrante, che è miscibile con l'alcool e con la resina utilizzata per l'inclusione. I preparati sono stati successivamente trasferiti in una miscela composta da tre parti di ossido di propilene e una di resina epossidica Araldite (3:1) per 45 minuti a temperatura ambiente; quindi un passaggio in una miscela composta da una parte di ossido di propilene e tre di resina (1:3) per 45 minuti a temperatura ambiente ed infine un ultimo passaggio in resina pura per 45 minuti in stufa a 60°C. I campioni sono stati quindi inclusi immergendo i frammenti di tessuto in appositi contenitori plastici riempiti di resina fluida; durante questa fase, attraverso l'ausilio di aghi sottili, i blocchetti di tessuto precedentemente adagiati nella resina, sono stati ruotati ed orientati in modo che poi si presentino al taglio in maniera adatta.

Le formelle contenenti il materiale incluso sono state poste in stufa a 60°C per 2-3 giorni allo scopo di consentire e accelerare la polimerizzazione della resina. Le sezioni fini (700 Å) ottenute con ultramicrotomo Reichert OMV3 sono state raccolte su appositi supporti; si tratta di retini molto sottili di materiale

conduttore (in genere rame/rodio) sulle cui maglie vengono appoggiate le sezioni. I retini vengono preventivamente rivestiti con un film trasparente (Formvar) con funzione di supporto per le sezioni stesse.

La formazione dell'immagine nel microscopio elettronico a trasmissione è legata alle differenti capacità di assorbire e deviare gli elettroni delle diverse strutture del tessuto. L'immagine che si forma mostra solo una gradazione di grigi di densità direttamente proporzionale alla quantità di elettroni in grado di raggiungere lo schermo. La colorazione, in microscopia elettronica, è quindi una tecnica che cerca di amplificare le differenti capacità di assorbire gli elettroni delle diverse strutture biologiche attraversate dal fascio. Questo obiettivo viene raggiunto con un meccanismo simile a quello impiegato per la colorazione delle sezioni su vetrino: il tessuto viene trattato con una sostanza che si lega preferenzialmente ad alcune strutture, rendendole meglio visibili, ma non ad altre: al posto del cromogeno, però, si utilizzano degli atomi di metalli pesanti, capaci di interferire con gli elettroni che vanno ad urtarli. I metalli più utilizzati sono l'uranio ed il piombo.

I retini con le sezioni adese sono stati poi contrastati utilizzando, in sequenza, acetato di uranile al 3% in alcool etilico 50° e citrato di piombo nella formulazione di Reynolds. Terminata ciascuna fase di colorazione, i retini, maneggiati con cura con delle pinzette a punte fini, sono stati lavati in acqua distillata, fatti asciugare e osservati al TEM (Philips CM-10, Eindhoven, The Netherland) con una tensione di 80 kv.

## ANALISI ISTO-MORFOMETRICA

L'analisi morfometrica è stata condotta su sezioni istologiche di 10  $\mu\text{m}$  di spessore precedentemente colorate con Sirius Red ed osservate al microscopio ottico a luce polarizzata. Per l'analisi morfometrica è stato utilizzato un sistema computerizzato di analisi di immagine costituito da un microscopio a luce polarizzata e da una camera digitale ad alta risoluzione (DC200, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) che trasmette le immagini ad un computer dotato di un software per l'analisi e l'acquisizione delle immagini (QWin, Leica Microsystems Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK). Per ciascuna struttura sono stati analizzati tre campi scelti casualmente al microscopio ad un ingrandimento originale di 25x; in ciascuna immagine è stato misurato il numero dei crimps, ovvero il numero di piegamenti dei fasci di fibre collagene; quindi sono stati scelti a caso tre crimps e per ognuno sono state misurate l'ampiezza dell'angolo al vertice e la lunghezza della corrispondente base, come mostrato in figura 16.

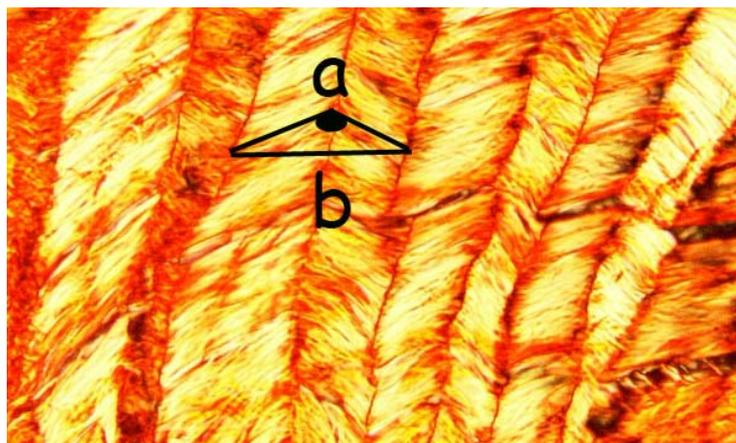


Figura 16. PLM: crimp tendineo; **a**= ampiezza dell'angolo al vertice; **b**= lunghezza della base.

I risultati sono stati espressi come media e relativa deviazione standard.

## **ANALISI STATISTICA**

Le valutazioni statistiche sono state effettuate mediante l'uso del software di elaborazione dati Graphpad Prism 5.0 per sistema operativo Windows (GraphPad Software Inc. San Diego CA) accettando un livello minimo di significatività pari al 5% ( $p < 0.05$ ).

Il confronto statistico tra i gruppi per le variabili in esame è stato effettuato mediante l'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute. In caso di significatività statistica rilevata dall'ANOVA, le successive valutazioni per confronti multipli sono state condotte utilizzando il test di Bonferroni.

# **RISULTATI**

## **MICROSCOPIA OTTICA A LUCE POLARIZZATA (PLM)**

L'osservazione al microscopio ottico a luce polarizzata di sezioni sagittali di ginocchio di ratto ha consentito di apprezzare i rapporti delle strutture in esame con le altre componenti articolari (Fig. 1). Due distinte patelle erano interposte tra il tendine del quadricipite femorale e il tendine patellare: una patella prossimale, nota come soprapatella (SP), dalla struttura fibrocartilaginea, e una patella ossea (PO) distale, costituita da tessuto osseo lamellare di tipo spugnoso (Figg. 1, 2). Al di sopra della patella ossea si osservavano due lamine connettivali, una superficiale e una più profonda. La prima, dello spessore di 100  $\mu\text{m}$ , corrispondente al tendine del retto femorale (TRF), si inseriva direttamente sulla patella ossea; la seconda, più spessa e corrispondente al tendine del vasto intermedio (TVI), prendeva rapporti prossimalmente con la soprapatella fibrocartilaginea e distalmente con la patella ossea. Tra i due tendini era interposto uno spazio ricco di vasi sanguiferi e tessuto adiposo (Figg. 1, 2). I fasci di fibre collagene più superficiali del TRF sopravanzavano la patella, rivestendola anteriormente, e si continuavano al di sotto di essa (Fig. 1) con i fasci di fibre collagene del tendine patellare (TP), spesso circa 300-350  $\mu\text{m}$ , il quale si inseriva sulla tuberosità tibiale. Il TRF e il TVI, entrambi avvolti da una sottile guaina peritendinea, apparivano costituiti da fasci di fibre collagene paralleli tra loro, il cui andamento rettilineo era interrotto da periodici cambiamenti di direzione (Fig. 2). A maggiore ingrandimento (Fig. 3) si poteva apprezzare ancora meglio l'alternanza di bande chiare e scure di estinzione che conferiva ai due tendini un aspetto morfologico a zig-zag corrispondente ai crimps tendinei. Nei due tendini i crimps sembravano differire per numero e dimensioni: il TRF mostrava crimps appiattiti e meno numerosi di quelli

presenti nel TVI (Fig. 3). Anche il TP, avvolto da una guaina perilegamentosa, risultava organizzato in fasci di fibre con decorso parallelo che individuano ampi crimps planari paragonabili per morfologia a quelli osservati nel TRF (Fig. 4).

### **MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM) E A TRASMISSIONE (TEM)**

La microscopia elettronica a scansione ha evidenziato che tutte e tre le strutture analizzate risultavano costituite da numerosi fascicoli di fibrille collagene paralleli tra loro. Nel TRF questi apparivano come una sequenza di segmenti fibrillari, strettamente impacchettati e con decorso rettilineo e ordinato, connessi da brusche discontinuità in corrispondenza delle quali tutte le fibrille di un fascio cambiavano simultaneamente direzione descrivendo crimps periodici ampi ed appiattiti (Figg. 5, 6).

Nel TVI le fibre collagene, riunite in fasci compatti, mostravano un chiaro andamento planare a zig-zag riconoscibile già a piccolo ingrandimento con crimps più piccoli e più numerosi rispetto a quelli del TRF (Fig. 7). Inoltre, lungo una singola fibrilla del TVI si potevano osservare più crimps fibrillari, nella forma di due o più nodi consecutivi (Fig. 8).

La microscopia elettronica a scansione ha confermato le osservazioni istologiche anche per il TP, mostrando ancora una volta un arrangiamento del collagene simile a quello del TRF. Il tendine patellare infatti, come il tendine del retto femorale, appariva costituito da fibre e da fasci di fibre collagene ordinatamente organizzati, il cui andamento rettilineo era interrotto da crimps

larghi e meno accentuati (Figg. 9, 10); in corrispondenza di questi era possibile individuare crimps fibrillari in fase (Fig. 10).

L'analisi dei tre tessuti al TEM ha evidenziato che all'apice di ogni crimp tendineo le singole fibrille collagene mostravano nodi, corrispondenti ai crimps fibrillari, regolarmente allineati. A livello dei crimps fibrillari le singole fibrille perdevano la loro forma cilindrica e mostravano una sorta di deformazione localizzata che si estendeva limitatamente a pochi (2-3) D-period, in quanto a monte e a valle del nodo le fibrille presentavano forma e aspetto normale (Figg. 11, 12, 13). Il TVI, a conferma di quanto osservato al SEM, mostrava più crimps fibrillari lungo una stessa fibrilla collagene (Fig. 12).

### **ANALISI ISTO-MORFOMETRICA**

L'analisi morfometrica condotta sulle sezioni istologiche osservate mediante l'ausilio della luce polarizzata ha fornito risultati in accordo con i dati istologici ed ultrastrutturali, evidenziando differenze tra i tessuti sia nel numero che nelle dimensioni dei crimps.

Il numero totale dei crimps in TRF, TVI e TP è risultato rispettivamente di  $5.4 \pm 1.4$ ,  $14.5 \pm 4.7$  e  $6.1 \pm 2.8$ . Il tendine del vasto intermedio presentava crimps quasi tre volte più numerosi di quelli presenti nelle altre due strutture che, peraltro, presentavano valori pressoché confrontabili. L'ANOVA test, eseguito per valutare le differenze tra i tessuti esaminati, ha indicato che i tre gruppi non appartenevano alla stessa popolazione ( $p < 0.05$ ). In particolare il test di Bonferroni per confronti multipli ha rivelato che il numero dei crimps nel TVI differiva significativamente da quello del TRF e del TP (Tabella I). Differenze

statisticamente significative non erano invece presenti tra il tendine del retto femorale e il tendine patellare.

Si è proceduto quindi alla misurazione dell'ampiezza dell'angolo al vertice dei crimps. La media dei valori ottenuti è risultata nel TRF di  $141.5^{\circ} \pm 15.0$ , nel TVI di  $122.3^{\circ} \pm 14.8$  e nel TP di  $146.2^{\circ} \pm 12.2$ . Anche per questa variabile l'ANOVA test ha indicato una differenza significativa tra le medie ( $P < 0.0001$ ) e il test di Bonferroni ha mostrato che l'ampiezza dell'angolo al vertice dei crimps nel TVI era significativamente più piccola ( $p < 0.05$ ) di quella nel TRF e nel TP, che mostravano ancora una volta valori simili (Tabella I).

È stata, infine, misurata la lunghezza della base dei crimps: TRF ( $75.5 \pm 22.6 \mu\text{m}$ ), TVI ( $36.0 \pm 14.1 \mu\text{m}$ ) e TP ( $72.3 \pm 28.9 \mu\text{m}$ ). Ancora una volta, l'ANOVA test e il test di Bonferroni hanno rilevato che i tre gruppi sperimentali non appartenevano alla stessa popolazione e che la lunghezza della base dei crimps in TVI differiva in modo significativo da quella dei crimps del TRF e del TP (Tabella I).

# **DISCUSSIONE**

Il tendine è una struttura chiave nella dinamica dell'apparato locomotore; in ogni atto motorio esso interviene come trasmettitore e modulatore dell'attività muscolare alle leve scheletriche. I tendini impegnati unicamente nella trasmissione della forza generata dalla contrazione del muscolo all'osso sono anche chiamati *tendini di posizione* e risultano relativamente inestensibili sotto i normali carichi fisiologici. Altri tendini sono in grado anche di immagazzinare l'energia sviluppata dalla contrazione muscolare in modo da accentuare contrazioni sottolimali al fine di incrementare l'efficienza del movimento. Diversamente dai tendini di posizione, questi *tendini che accumulano energia* devono essere in grado di estendersi sotto carichi fisiologici e altresì di subire un ritorno elastico in seguito allo stiramento. Questi tendini sono soggetti quindi a deformazioni maggiori rispetto ai tendini di posizione [18, 74, 115]. L'entità della deformazione che un tendine può raggiungere dipende, oltre che dal carico applicato, anche dalla sua particolare architettura ultrastrutturale. Nella sua morfologia d'insieme il tessuto tendineo è costituito da fibre e fasci di fibre collagene orientati parallelamente e allineati lungo il maggiore asse del tendine, ovvero nella direzione di applicazione del carico. In realtà, quando il tendine viene osservato al microscopio ottico, le fibre ed i fasci di fibre non appaiono completamente rettilinei, ma mostrano un caratteristico andamento ondulato caratterizzato da un'alternanza di bande chiare e scure di estinzione, note in letteratura con i termini di *wave-like structures* o *crimps* [33, 34, 36, 52, 55, 70, 75, 107, 124, 134]. Precedenti osservazioni hanno evidenziato che un singolo crimp tendineo è costituito da segmenti fibrillari rettilinei uniti da nodi o cerniere in corrispondenza dei quali le fibrille collagene sono caratterizzate da schiacciamento, torsione e perdita della tipica bandeggiatura periodica. Tali modificazioni strutturali sono state denominate *crimps fibrillari* [44, 46] e sono esclusivamente presenti nelle

fibrille di tipo T, caratterizzate da diametro elevato e costituite da microfibrille quasi parallele all'asse fibrillare [103]. Tali fibrille sono tipiche di quei tessuti sottoposti ad elevate forze tensili di tipo uniassiale come i tendini, i legamenti e le aponeurosi [92]. Al contrario, i crimps fibrillari non sono mai stati descritti in quei tessuti sottoposti a forze multidirezionali o a repentini cambiamenti di forma e dimensioni come il derma, le guaine tendinee e dei nervi, la parete dei vasi sanguiferi e lo stroma connettivale di organi parenchimatosi.

La contrazione del muscolo determina un appiattimento dell'ondulazione del tendine e successiva trasmissione della forza all'osso. L'allungamento che il tendine subisce durante i normali carichi fisiologici si realizza in gran parte attraverso la distensione dei crimps [55, 67, 71, 73]. Questi si comporterebbero come valvole di sicurezza nella toe-region della curva tensione-deformazione consentendo un allineamento longitudinale delle singole fibre senza danneggiamento o modificazioni plastiche del tessuto [22, 36, 52, 55, 91, 113, 114]. L'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione ha messo in luce che quando il tendine è sottoposto a stiramento, laddove i crimps tendinei risultano completamente distesi, i crimps fibrillari persistono immutati [44]. La loro permanenza dopo stiramento suggerisce che essi siano le reali strutture coinvolte nell'assorbimento della forza applicata al tendine all'inizio della sollecitazione.

Ad oggi non sono presenti studi morfologici finalizzati ad analizzare la relazione tra pattern del crimping e proprietà biomeccaniche dei tessuti connettivi dell'apparato estensore del ginocchio. È bene sottolineare che i movimenti di flessione-estensione dipendono oltre che dall'azione del muscolo quadricipite anche dalle strutture che trasmettono tale contrazione alla tibia:

- il tendine terminale del muscolo (tendine del quadricipite), che si inserisce sulla patella;
- il tendine/legamento patellare che dalla patella si porta alla tuberosità tibiale.

Il tendine del quadripite, apparentemente unico, si compone in realtà di tre lamine sovrapposte: una lamina superficiale, formata dal tendine del retto femorale; una lamina intermedia, formata dai fasci fibrosi del vasto mediale e del vasto laterale; e infine una lamina profonda, costituita dal tendine del vasto intermedio [8, 141]. I fasci più superficiali del tendine del retto femorale si inseriscono anche sulla faccia anteriore della patella ed in parte proseguono inferiormente partecipando alla formazione del tessuto sottopatellare, la cui definizione rimane tutt'oggi una questione aperta. Vi sono infatti al riguardo due correnti di pensiero: gli autori di estrazione anatomica [29, 40, 50, 60, 102, 130, 131] considerano il tessuto sottopatellare un legamento, poichè è interposto tra la patella e la tibia; gli autori di estrazione clinica [11, 12, 22, 23, 55, 56, 97, 148] lo ritengono invece la prosecuzione del tendine del quadricipite al di sotto della patella. Tuttavia indagini biochimiche e funzionali rivelano che il tessuto sottopatellare presenta caratteristiche biochimiche e meccaniche differenti sia dagli altri legamenti del ginocchio sia dallo stesso tendine del quadricipite [4, 54, 130, 131, 58].

Il tessuto sottopatellare è strutturalmente un tendine o un legamento?

Nel mio studio ho cercato di dare una risposta a questo interrogativo attraverso un'analisi morfologica dei tessuti sopra- e sottopatellari e, precisamente, del tendine del retto femorale (TRF), del tendine del vasto intermedio (TVI) e del tendine/legamento patellare (TP). Sulla base delle caratteristiche istologiche ed ultrastrutturali dei crimps è stato ipotizzato uno specifico ruolo funzionale dei tre tessuti.

Le osservazioni al microscopio ottico a luce polarizzata (PLM) hanno evidenziato che le strutture in esame sono costituite da fibre collagene con decorso ondulato. La periodica variazione nell'orientamento dei fasci di fibre produce la caratteristica alternanza di bande chiare e scure di estinzione corrispondenti ai crimps. Questi presentano una notevole variabilità in dimensioni e numero nei tre tessuti. In particolare, i crimps nel TVI appaiono più numerosi ed accentuati di quelli del TRF e del TP.

La microscopia elettronica a scansione (SEM) ha evidenziato che i crimps non mostrano un aspetto semplicemente sinuoso, così come riportato in letteratura [33, 51, 134], ma appaiono piuttosto come una successione di segmenti fibrillari rettilinei collegati da discontinuità angolari in corrispondenza delle quali tutte le fibrille di un fascio cambiano repentinamente direzione. L'analisi al SEM conferma le osservazioni al PLM mostrando ancora una volta crimps planari che differiscono nei tre tessuti per la lunghezza dei segmenti fibrillari e per l'ampiezza dell'angolo al vertice. L'analisi al TEM ha rivelato inoltre che, in corrispondenza di ogni crimp tendineo, le singole fibrille collagene mostrano un alterato arrangiamento microfibrillare, perdono la loro forma cilindrica ed appaiono strozzate o ritorte attorno al proprio asse. Questi peculiari aspetti delle singole fibrille corrispondono ai crimps fibrillari. In particolare nel TVI le fibrille collagene mostrano lungo la loro estensione crimps fibrillari multipli.

L'analisi morfometrica condotta sulle sezioni istologiche osservate mediante l'ausilio della luce polarizzata ha fornito risultati in accordo con i dati istologici ed ultrastrutturali evidenziando una differenza significativa nel numero dei crimps tra il tendine del vasto intermedio e le altre due strutture, le quali mostravano un valore pressochè sovrapponibile (Tabella I).

Analogamente l'ampiezza dell'angolo al vertice dei crimps del TRF e del TP è risultata simile e significativamente più alta di quella del TVI (Tabella I).

Il TRF e il TP hanno mostrato anche una base dei crimps lunga più del doppio di quella misurata nel TVI (Tabella I).

Le differenze osservate nel pattern del crimping nelle tre strutture suggerisce un loro diverso ruolo funzionale nell'articolazione del ginocchio. Il TVI, presentando crimps più numerosi ed accentuati rispetto al TRF e al TP risulterebbe una struttura più elastica. È bene ricordare che l'elasticità di un tendine costituisce un importante meccanismo per conservare quantità elevate di energia durante il movimento [2, 3, 28]; ad esempio, quando il piede tocca terra, l'energia cinetica e potenziale viene accumulata sottoforma di energia di deformazione nei muscoli e nei tendini. Il ritorno elastico, primariamente dei tendini, converte l'energia così immagazzinata nuovamente in energia cinetica e potenziale nel momento in cui il piede si solleva da terra. Il TVI possiederebbe capacità di deformazione e di ritorno elastico in seguito allo stiramento maggiori del TRF e del TP e sarebbe quindi in grado di assorbire meglio le sollecitazioni tensorie. Alla luce di queste osservazioni, il TVI apparterebbe alla categoria dei tendini che accumulano energia e sarebbe coinvolto in prima linea nell'assorbimento della contrazione muscolare. Il TVI rappresenterebbe pertanto il principale estensore agonista del muscolo quadricipite. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni funzionali in cui il vasto intermedio è risultato il componente più efficiente del quadricipite [84, 150].

Il TRF, i cui fasci fibrosi individuano crimps meno numerosi ed appiattiti, risulterebbe una struttura più rigida, in grado di rispondere a carichi tensili minori rispetto al TVI. Nel ginocchio di ratto, normalmente flesso in condizione di riposo, il TRF agirebbe non tanto come un tendine che accumula energia, quanto piuttosto

come un tendine d'arresto che va a limitare l'eccessiva flessione. Il TRF potrebbe svolgere un ruolo simile anche nell'uomo controllando la flessione attiva della gamba.

Per quanto riguarda il tessuto sottopatellare, le osservazioni al PLM, al SEM e al TEM hanno mostrato che esso possiede un'organizzazione collagenica del tutto sovrapponibile a quella dei tendini, con fibrille strettamente impacchettate tra loro e disposte parallelamente all'asse della struttura. Il tessuto sottopatellare da un punto di vista strutturale potrebbe essere pertanto considerato un tendine. L'analogia riscontrata nel numero e nelle dimensioni dei crimps tra il TP e il TRF suggerisce simili proprietà biomeccaniche dei due tessuti ed induce ad ipotizzare che essi agiscano nel ratto come un unico tendine di posizione che conferisce stabilità all'articolazione del ginocchio nella posizione di riposo.

# **BIBLIOGRAFIA**

- [1] **Abrahams M.** Mechanical behaviour of tendon in vitro. A preliminary report. *Med Biol Eng* **1967**; 5: 433-443.
- [2] **Alexander RM.** Elastic energy stores in running vertebrates *Am Zool* **1984**; 24: 85-94.
- [3] **Alexander RM, Dimery NJ.** Elastic properties of the forefoot of the donkey, equus asinus. *J Zool Lond* **1985**; 205: 511-524.
- [4] **Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W.** Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* **1984**; 1: 257-265.
- [5] **Amis AA.** Current concepts on anatomy and biomechanics of patellar stability. *Sports Med Arthrosc* **2007**; 15: 48-56.
- [6] **Anderson JC.** Glycoproteins of the connective tissue matrix. *Int Rev Conn Tiss Res* **1976**; 7: 251.
- [7] **Anderson JC, Labeledz RI, Kewley MA.** The effect of bovine tendon glycoprotein on the formation of fibrils from collagen solutions. *Biochem J* **1977**; 168: 354.
- [8] **Andrikoula S, Tokis A, Vasiliadis HS, Georgoulis A.** The extensor mechanism of the knee joint: an anatomical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **2006**; 14: 214-220.
- [9] **Bailey AJ, Paul RG, Knott L.** Mechanism of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev* **1998**; 106: 1-56.
- [10] **Bailey AJ.** Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* **2001**; 122: 735-755.
- [11] **Basso O, Johnson DP, Amis AA.** The anatomy of the patellar tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **2001**; 9: 2-5.
- [12] **Beall DP, Ponder CE, Kirby A, Fish JR.** Intramedullary insertion of the patellar tendon. *Skeletal Radiol* **2006**; 35: 122-125.
- [13] **Becker W, Krahl H.** Die Tendopathien. Stuttgart: G. Thieme, **1978**.
- [14] **Bella J, Eaton M, Brodsky B, Berman HM.** Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **1994**; 266: 75-81.
- [15] **Bella J, Brodsky B, Berman HM.** Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* **1995**; 3: 893-906.

- [16] **Benjamin M, Hillen B.** Mechanical influences on cells, tissues and organs - 'Mechanical Morphogenesis'. *Eur J Morphol* **2003**; 41: 3-7.
- [17] **Berisio R, Granata V, Vitagliano L, Zagari A.** Characterization of collagen-like heterotrimers: implications for triple-helix stability. *Biopolymers* **2004**; 73: 682-688.
- [18] **Birch HL.** Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *Int J Exp Path* **2007**; 88: 241-248.
- [19] **Bose K, Kanagasuntheram r, Osman MBH.** Vastus medialis oblique: an anatomic and physiologic study. *Orthopaedics* **1980**; 3: 880-883.
- [20] **Bouteille M, Pease DC.** The tridimensional structure of native collagenous fibrils, their proteinaceous filaments. *J Ultrastruct Res* **1971**; 35: 314-338.
- [21] **Bridgam GF.** The structure of tendon organs in the cat. A proposed mechanism for responding to muscle tension. *Anat Rec* **1968**; 162: 209.
- [22] **Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF.** Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc Sport Sci Rev* **1978**; 6: 125-181.
- [23] **Butler D, Kay MD, Stouffer DC.** Comparison of material properties in fascicle-bone units from human patellar tendon and knee ligaments. *J Biomech* **1986**; 19: 425-432.
- [24] **Canty EG, Lu Y, Meadows RS, Shaw MK, Holmes DF, Kadler KE.** Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *J Cell Biol* **2004**; 165: 553-563.
- [25] **Canty EG, Kadler KE.** Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* **2005**; 118: 1341-1353.
- [26] **Carrino DA, Sorrell Jm, Caplan AI.** Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Bioch Bioph* **2000**; 91-101.
- [27] **Carrino DA, Omnerfjord P, Sandy JD, Cs-Szabo G, Scott PG, Sorrell JM, Heinegard D, Caplan AI.** Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Proc Nat Acad Sci* **2003**; 278: 17566-17572.
- [28] **Cavagna GA, Heglund NC, Taylor CR.** Mechanical work in terrestrial locomotion: two basic mechanisms for minimizing energy expenditure. *Am J Physiol* **1977**; 233; R243-261.

- [29] **Clark J, Stechshulte Jr DJ.** The interface between bone and tendon at an insertion site: a study of the quadriceps tendon insertion. *J Anat* **1998**; 193: 605-616.
- [30] **Curwin S.** Biomechanics of tendon and the effects of immobilization. *Foot Ankle Clin* **1997**; 2: 371-389.
- [31] **Dale WC, Baer E.** Fibre-buckling in composite systems: a model for the ultrastructure of uncalcified collagen tissues. *J Mater Sci* **1974**; 9: 369-382.
- [32] **Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV.** Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* **1997**; 136: 729-743.
- [33] **De Campos Vidal B.** Crimp as a part of a helical structure. *CR Acad Sci III* **1995**; 318: 173-178.
- [34] **De Campos Vidal B.** Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron* **2003**; 34: 423-432.
- [35] **Del Torto U.** Anatomia e fisiopatologia del tendine. Rel. XLXVI Congr. SIOT Roma, **1961**.
- [36] **Diamant J, Keller A, Baer E, Litt M, Arridge RG.** Collagen: ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc R Soc B* **1972**; 180: 293-315.
- [37] **Duance VC, Restall DJ, Beard H, Bourne FJ, Bailey AJ.** The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* **1977**; 79: 248-252.
- [38] **Elliott DH.** Structure and function of mammalian tendon. *Biol Rev Camb Philos Soc* **1965**; 40: 392-421.
- [39] **Engel J, Prockop DJ.** The zipper-like folding of collagen triple-helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **1991**; 20: 137-152.
- [40] **Evans EJ, Benjamin M, Pemberton DJ.** Fibrocartilage in the attachment zones of quadriceps tendon and the patellar ligament of man. *J Anat* **1990**; 171: 155-162.
- [41] **Eyre DR, Paz MA, Gallop PM.** Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* **1984**; 53: 717-748.
- [42] **Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I, Birk DE.** Differential expression of lumican and fibromodulin regulate

- collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* **2000**; 151: 779-787.
- [43] **Farahmand F, Senavongse W, Amis AA.** Quantitative study of the quadriceps muscles and trochlear groove geometry related to instability of the patellofemoral joint. *J Orthop Res* **1998**; 16:136-143.
- [44] **Franchi M, Fini M, Quaranta M, De Pasquale V, Raspanti M, Giavaresi G, Ottani V, Ruggeri A.** Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon. *J Anat* **2007**; 210: 1-7.
- [45] **Franchi M, Raspanti M, Dell' Orbo C, Quaranta M, De Pasquale V, Ottani V, Ruggeri A.** Different crimp patterns in collagen fibrils related to the subfibrillar arrangement. *Connect Tissue Res* **2008**; 49: 85-91.
- [46] **Franchi M, Ottani V, Stagni R, Ruggeri A.** Tendon and ligament fibrillar crimps give rise to left-handed helices of collagen fibrils in both planar and helical crimps. *J Anat* **2010**; 1-9.
- [47] **Fratzl P, Misof K, Zizak I.** Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J Struct Biol* **1997**; 122: 119-122.
- [48] **Fukuta S, Oyama M, Kavalovich K, Fu FH, Niyibizi C.** Identification of types II, IX and X collagens at the insertion of the bovine Achilles tendon. *Matrix Biol* **1998**; 17: 65-73.
- [49] **Fulkerson JP, Gossling HR.** Anatomy of the knee joint lateral retinaculum. *Clin Orthop Relat Res* **1986**; 153: 183-188.
- [50] **Gao J, Rasanen T, Persliden J, Messner K.** The morphology of ligaments after failure at low strain velocity: an evaluation of ligament entheses in the rabbit knee. *J Anat* **1996**; 189: 127-133.
- [51] **Gathercole LJ, Keller A, Shah JA.** The periodic wave pattern in native tendon collagen: correlation of polarizing with scanning electron microscopy. *J Microsc* **1974**; 102: 95-106.
- [52] **Gathercole LJ, Keller A.** Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix* **1991**; 11: 214-234.
- [53] **Graham HK, Holmes DF, Watson RB, Kadler KE.** Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction. *J Mol Biol* **2000**; 295: 891-902.

- [54] **Hadjicostas PT, Soucacos PN, Berger I, Koleganova N, Paessler H.** Comparative analysis of the morphological structure of quadriceps and patellar tendon: a descriptive laboratory study. *Arthroscopy* **2007**; 23: 744-750.
- [55] **Hansen KA, Weiss JA, Barton JK.** Recruitment of tendon crimp with applied tensile strain. *J Biomech Eng* **2002**; 124: 72-77.
- [56] **Haraldsson BT, Aagaard P, Krogsgaard M, Alkjaer T, Kjaer M, Magnusson P.** Region-specific mechanical properties of the human patellar tendon. *J Appl Physiol* **2005**; 98: 1006-1012.
- [57] **Harkness RD.** Biological function of collagen. *Biol Rev* **1961**; 36: 399.
- [58] **Harris NL, Smith DA, Lamoreaux L, Purnell M.** Central quadriceps tendon for anterior cruciate ligament reconstruction. Part I: morphometric and biomechanical evaluation. *Am J Sports Med* **1977**; 25: 23-28.
- [59] **Hess GP, Cappiello WL, Poole RM, Hunter SC.** Prevention and treatment of overuse tendon injuries. *Sports Med* **1989**; 8: 371-384.
- [60] **Hildebrand C, Oqvist G, Brax L, Tuisku F.** Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat Rec* **1991**; 229: 545-555.
- [61] **Hodge AJ, Petruska JA.** Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. In: Ramachandran , G.N. (Ed), *Aspects of Protein Structure*, Academic Press, New York **1963**; 289-300.
- [62] **Hoffmann A, Gross G.** Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approach. *Int Orthop* **2007**; 31: 791-797.
- [63] **Holmes DF, Chapman JA, Prockop DJ, Kadler, KE.** Growing tips of type I collagen fibrils formed in vitro are near-paraboloidal in shape, implying a reciprocal relationship between accretion and diameter. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 89: 9855-9859.
- [64] **Holmes, D. F., Graham, H. K. and Kadler, K. E.** Collagen fibrils forming in developing tendon show an early and abrupt limitation in diameter at the growing tips. *J Mol Biol* **1998**; 283: 1049-1058.
- [65] **Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accinni L, Demartino C.** Morphological, immunochemical and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg (Am)* **1980**; 62:

583-592.

- [66] **Jami L.** Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol Rev* **1992**; 72: 623-666.
- [67] **Järvinen TA, Järvinen TL, Kannus P, Jozsa L, Järvinen M.** Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *J Orthop Res* **2004**; 22: 1303-1309.
- [68] **Jepsen KJ, Wu F, Peragallo JH, Paul J, Roberts L, Ezura Y, Oldberg A, Birk DE, Chakravarti S.** A syndrome of joint laxity and impaired joint integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J Biol Chem* **2002**; 277: 35532-35540.
- [69] **Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A.** Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat* **1991**; 142: 306-312.
- [70] **Jozsa L, Kannus P.** Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports* **1997**; 7: 113-118.
- [71] **Jozsa L, Kannus P.** Structure and metabolism of normal tendons. In: Jozsa L, Kannus P, eds. *Human tendons: anatomy, physiology and pathology*. Champaign: Human Kinetics **1997**; 46-95.
- [72] **Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR.** Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* **1979**; 11: 447-455.
- [73] **Kannus P.** Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* **2000**; 10: 312-320.
- [74] **Kasashima Y, Takahashi T, Birch HL, Smith RKW, Goodship AE.** Can exercise modulate the maturation of functionally different immature tendons in the horse? *J Appl Physiol* **2008**; 104: 416-422.
- [75] **Kastelic J, Galeski A, Baer E.** The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* **1978**; 6: 11-23.
- [76] **Kastelic J, Baer E.** Deformation in tendon collagen. *Symp Soc Exp Biol* **1980**; 34: 397-435.
- [77] **Kastelic J, Palley I, Baer E.** A structural mechanical model for tendon crimping. *J Biomech* **1980**; 13: 887-893.
- [78] **Ker RF.** The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Physiol, A Mol Integr Physiol* **2002**; 133: 987-1000.

- [79] **Kirkendall DT, Garrett WE.** Function and biomechanics of tendons. *Scand J Med Sci Sports* **1997**; 7: 62-66.
- [80] **Knott L, Bailey AJ.** Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function and clinical relevance. *Bone* **1998**; 22: 181-187.
- [81] **Kvist M, Jozsa L, Jarvinen M, Kvist H.** Fine structural alterations in chronic Achilles paratenonitis in athletes. *Pathol Res Pract* **1985**; 180: 416-423.
- [82] **LaPrade R, Tso A, Wentorf MS.** Force Measurements on the Fibular Collateral Ligament, Popliteofibular Ligament, and Popliteus Tendon to Applied Loads. *Am J Sports Med* **2004**; 32: 1695-1701.
- [83] **Leblond CP.** Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone and dentine. *Anat Rec* **1989**; 224: 123-138.
- [84] **Lieb Fj , Perry J.** **Quadriceps function.** An anatomical and mechanical study using amputated limbs. *J Bone Joint Surg* **1968**; **50a**: 1535-1548.
- [85] **Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M.** Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* **2003a**; 13: 211-223.
- [86] **Marchini M, Morocutti M, Ruggeri A, Koch MHJ, Bigi A, Roveri N.** Differences in the fibril structure of corneal and tendon collagen. An electron microscopy and X-ray diffraction investigation. *Connect Tissue Res* **1986**; 15: 269-281.
- [87] **McCormick RJ.** Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poultry Sci* **1999**; 8: 785-791.
- [88] **Motamedi K, Seeger LL, Hame SL.** Imaging of postoperative knee extensor mechanism. *Eur J Radiol* **2005**; 54: 199-205.
- [89] **Niven H, Baer E, Hiltner A.** Organization of collagen fibers in rat tail tendon at the optical microscope level. *Coll Relat Res* **1982**; 2: 131-142.
- [90] **Ochiai N, Matsui T, Miyaji N, Merklin RJ, Hunter JM.** Vascular anatomy of flexor tendons. I. Vincular system and blood supply of the profundus tendon in the digital sheath. *J Hand Surg Am* **1979**; 4: 321-330.
- [91] **O' Brien M.** Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* **1997**; 7: 55-61.

- [92] **Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A.** Collagen structure and functional implications. *Micron* **2001**; 32: 251-260.
- [93] **Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M.** Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* **2002**; 33: 587-596.
- [94] **Parry DA, Barnes GRG, Craig AS.** A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **1978**; 203: 305-321.
- [95] **Partington FR, Wood GC.** The role of non-collagen components in the mechanical behaviour of tendon fibres. *Biochim Biophys Acta* **1963**; 69: 485-495.
- [96] **Patterson-Kane JC, Parry DA, Birch HL, Goodship AE, Firth EC.** An age-related study of morphology and cross-link composition of collagen fibrils in the digital flexor tendons of young thoroughbred horses. *Connect Tissue Res* **1997**; 36: 253-260.
- [97] **Peace KA, Lee JC, Healy J.** Imaging of infrapatellar tendon in the elite athlete. *Clin Rad* **2006**; 61: 570-578.
- [98] **Perugia L, Postacchini F, Ippolito E.** I tendini, biologia-patologia-clinica. Masson Italia Editori, Milano **1981**.
- [99] **Provenzano PP, Vanderby RJ.** Collagen fibril morphology and organization: implications for transmission in ligaments and tendons. *Matrix Biol* **2005**; 25: 71-84.
- [100] **Rada JA, Cornuet OK, Hassell JR.** Regulation of corneal fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp eye Res* **1993**; 56: 635-648.
- [101] **Ralphs JR, 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* **1991**; 231: 166-167.
- [102] **Ralphs JR, Tyers RN, Benjamin M.** Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat: the suprapatella and the attachment to the patella. *Anat Embryol* **1992**; 185: 181-187.
- [103] **Raspanti M, Manelli A, Franchi M, Ruggeri A.** The 3D structure of crimps in the rat Achilles tendon. *Matrix Biol* **2005**; 24: 503-507.

- [104] **Reale E, Benazzo F, Ruggeri A.** Differences in the microfibrillar arrangement of collagen fibrils. Distribution and possible significance. *J Submicrosc Cytol* **1981**; 13: 135-143.
- [105] **Reider B, Marshall JL, Koslin B, Ring B, Girgis FG.** The anterior aspect of the knee joint. *J Bone Joint Surg Am* **1981**; 63: 351-356.
- [106] **Rosager S, Aagaard P, Dyhre-Poulsen P, Neergaard K, Kjaer M, Magnusson SP.** Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand J Med Sci Sports* **2002**; 12: 90-98.
- [107] **Rowe RW.** The structure of rat tail tendon. *Connect Tissue Res* **1985a**; 14: 9-20.
- [108] **Rowe RW.** The structure of rat tail tendon fascicles. *Connect Tissue Res* **1985b**; 14: 21-30.
- [109] **Ruggeri A, Benazzo F, Reale E.** Collagen fibrils with straight and helicoidal microfibrils: a freeze-fracture and thin-section study. *J Ultrastruct Res* **1979**; 68: 101-108.
- [110] **Rumian AP, Wallace AL, Birch HL.** Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features – a comparative study in ovine model. *J Orthop Res* **2006**; 25: 458-464.
- [111] **Schatzker J, Branemark PI.** Intravital observations on the microvascular anatomy and microcirculation of the tendon. *Acta Orthop Scand Suppl* **1969**; 126: 1-23.
- [112] **Scott JE, Parry AD.** Control of collagen fibril diameters in tissues. *Int J Biol Macromol* **1992**; 14: 292-293.
- [113] **Screen HR, Bader DL, Lee DA, Shelton JC.** Local strain measurement within tendon. *Strain* **2004a**; 40: 157-163.
- [114] **Screen HR, Lee DA, Bader DL, Shelton JC.** An investigation into the effects of the hierarchical structure of tendon fascicles on micromechanical properties. *Proc Inst Mech Eng [H]* **2004**; 218: 109-119.
- [115] **Shadwick RE.** Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J Appl Physiol* **1990**; 68: 1033-1040.
- [116] **Shah JS, Palacios E, Palacios L.** Development of crimp morphology and cellular changes in chick tendons. *Dev Biol* **1982**; 94: 499-504.

- [117] **Silver FH, Freeman JW, Seehra GP.** Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech* **2003**; 36: 1529-1553.
- [118] **Smith JW.** The blood supply of tendons. *Am J Anat* **1964**; 100: 172.
- [119] **Smith BL, Schaffer TE, Viani M, Thompson JB, Frederick NA, Kindt J, Belcher A, Stucky GD, Morse DE, Hansma PK.** Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites. *Nature* **1999**; 399: 761-763.
- [120] **Sonin AH, Fitzgerald SW, Bresler ME, Kirsch MD, Hoff FL, Friedman H.** Mr imaging appearance of the extensor mechanism of the knee: functional anatomy and injury patterns. *Radiographics* **1995**; 15: 367-382.
- [121] **Staubli HU, Bollmann C, Kreutz R, Becker W, Rauschnig W.** Quantification of intact quadriceps tendon, quadriceps tendon insertion, and suprapatellar fat pad: MR arthrography, anatomy, and cryosections in the sagittal plane. *AJR Am J Roentgenol* **1999**; 173: 691-698.
- [122] **Stemplewski A, Hintze V, Fertala A.** Molecular basis of organization of collagen fibrils. *J Struct Biol* **2007**; 157: 297-307.
- [123] **Stilwell DL Jr.** The innervation of tendon and aponeuroses. *Am J Anat* **1957**; 100: 289-317.
- [124] **Stolinski C.** Disposition of collagen fibrils in human tendons. *J Anat* **1995**; 186: 577-83.
- [125] **Strocchi R, Leonardi L, Guizzardi S, Marchini M, Ruggeri A.** Ultrastructural aspects of rat tail tendon sheaths. *J Anat* **1985**; 140: 57-67.
- [126] **Trelstad RL, Hayashi K.** Tendon collagen fibrillogenesis: intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Dev Biol* **1979**; 71: 228-242.
- [127] **Tuderman L, Kivirikki KI, Prockop DJ.** Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves the N-terminal propeptides from procollagen. *Biochemistry* **1977**; 16: 3421-3429.
- [128] **Ushiki T.** Collagen fibers, reticular fibres and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol* **2002**; 65: 109-126.

- [129] **Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, Saed-Nejad F, Fischer SG, Mow VC, Ratcliffe A.** Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. *Arch Biochem Biophys* **1998**; 353: 29-36.
- [130] **Van Eijden TM, De Boer W, Weijs WA.** The orientation of the distal part of the quadriceps femoris muscle as a function of the knee flexion-extension angle. *J Biomech* **1985**; 18: 803-809.
- [131] **Van Eijden TM, Weijs WA, Kouwenhoven E, Verburg J.** Forces acting on the patella during maximal voluntary contraction of the quadriceps femoris muscle at different knee flexion/extension angles. *Acta Anat* **1987**; 129: 310-314.
- [132] **Viidik A, Ekholm R.** Light and electron microscopic studies of collagen fibers under strain. *Z Anat Entwicklungsgesch* **1968**; 121: 154-164.
- [133] **Viidik A.** Simultaneous mechanical and light microscopic studies of collagen fibers. *Z Anat Entwicklungsgesch* **1972**; 136: 204-212.
- [134] **Viidik A.** Tendons and ligaments. In: Comper, W.D. (Ed), *Extracellular Matrix. Tissue Function.* Harwood Academic Publishers, Amsterdam **1996**; 1: 303-327.
- [135] **Vitagliano L, Berisio R, Mazzarella L, Zagari A.** Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation. *Biopolymers* **2001**; 58: 459-464.
- [136] **Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D.** Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small Proteoglycan of tendon. *Biochem J* **1984**; 223: 587-597.
- [137] **Vogel KG, Heinegård D.** Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* **1985**; 260: 9298-9306.
- [138] **Vogel KG, Trotter JA.** The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll Relat Res* **1987**; 7: 105-114.
- [139] **Vogel KG, Koob TJ.** Structural specialization in tendons under compression. *Inter Rev Cytol* **1989**; 115: 267-293.
- [140] **Waggett AD, Ralphs JR, Kwan APL, Woodnutt D, Benjamin M.** Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* **1998**; 16: 457-470.

- [141] **Waligora AC, Johanson NA, Hirsch BE.** Clinical Anatomy of the quadriceps femoris and extensor apparatus of the knee. *Clin Orthop Relat Res* **2009**; 467: 3297-3306.
- [142] **Watson RB, Holmes DF, Graham HK, Nusgens BV, Kadler KE.** Surface located procollagen N-propeptides on dermatosparactic collagen fibrils are not cleaved by procollagen N-proteinase and do not inhibit binding of decorin to the fibril surface. *J Mol Biol* **1998**; 278: 195-204.
- [143] **Wight T.** Versican: a versatile extracellular proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* **1992**; 14: 617-623.
- [144] **Wight T.** Arterial remodeling in vascular disease: a key role for yaluronan and versican. *Front Biosci* **2008**; 13: 4933-4937.
- [145] **Wolff J.** Das Gesetz der Transformation der inneren Architektur der Knochen bei pathologischen Veränderungen der äußeren Knochenform. *Sitzungsber. Preuss. Akad. Wiss* **1884**; 22: 179.
- [146] **Woo SL, Weiss JA, Gomez MA, Hawkins DA.** Measurement of changes in ligament tension with knee motion and skeletal maturation. *J Biomech Eng* **1990**; 12: 46-51.
- [147] **Wood TO, Cooke PH, Goodship AE.** The effect of exercise and anabolic steroids on the mechanical properties and crimp morphology of the rat tendon. *Am J Sports Med* **1998**; 16: 153-158.
- [148] **Yamamoto E, Tokura S, Yamamoto N, Hayashi K.** Mechanical properties of collagen fascicles from in situ frozen and stress-shielded rabbit patellar tendons. *Clin Biomech* **2000**; 15: 284-291.
- [149] **Yoon JH, Halper J.** Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2005**; 5: 22-34.
- [150] **Zhang LQ, Wang G, Number GW, Press JM, Koh JL.** In vivo load sharing among the quadriceps components. *J Orthop Res* **2003**; 2: 565-571.

# **ICONOGRAFIA**

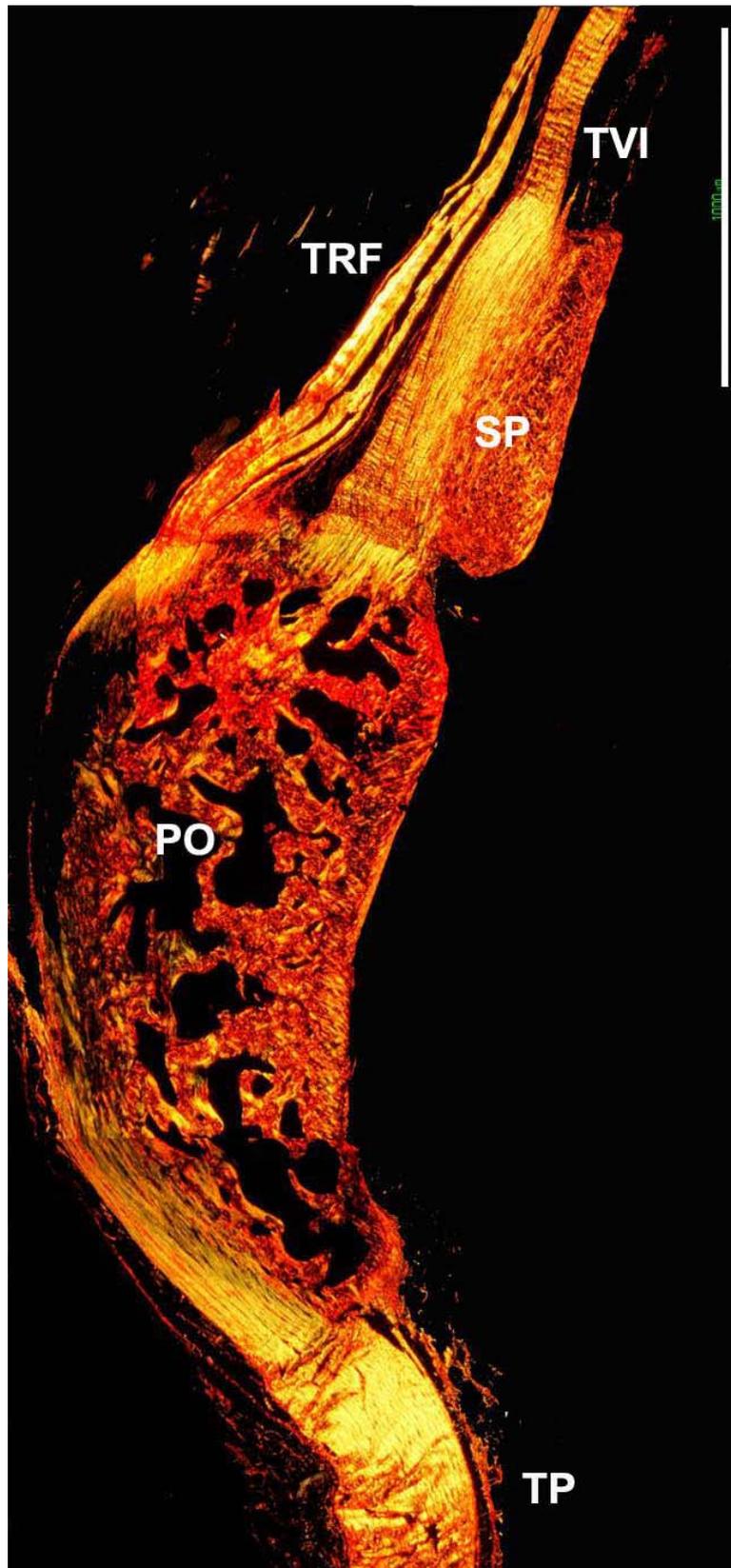


Figura 1. PLM: sezione sagittale dell'articolazione del ginocchio di ratto. Due distinte patelle sono interposte tra le strutture connettivali sopra- (TRF, TVI) e sottopatellari (TP): la soprapatella (SP) fibrocartilaginea e la patella ossea (PO). Barra = 1000  $\mu\text{m}$ .

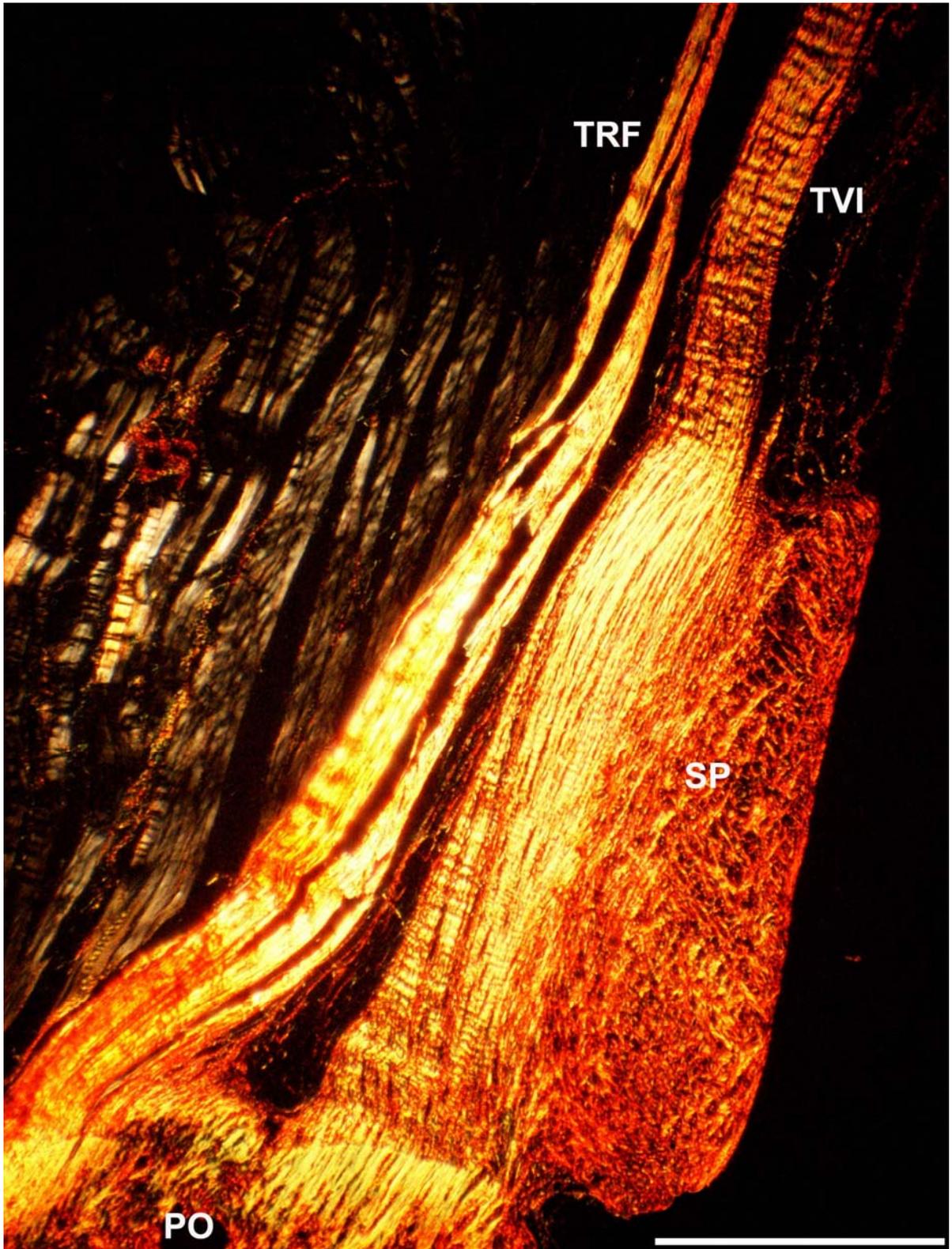


Figura 2. PLM: strutture connettivali soprapatellari. Il tendine distale del muscolo quadricipite è costituito anteriormente dal tendine del retto femorale (TRF) e posteriormente dal tendine del vasto intermedio (TVI). Le fibre profonde del TRF prendono inserzione sulla base della patella ossea (PO), mentre le fibre più superficiali si inseriscono sulla sua faccia anteriore; il TVI si porta sul margine superiore della PO. Notare la soprapatella (SP) contenuta nello spessore del TVI. Uno spazio triangolare contenente vasi e tessuto adiposo si interpone tra il TRF e il TVI. Barra = 500  $\mu$ m.

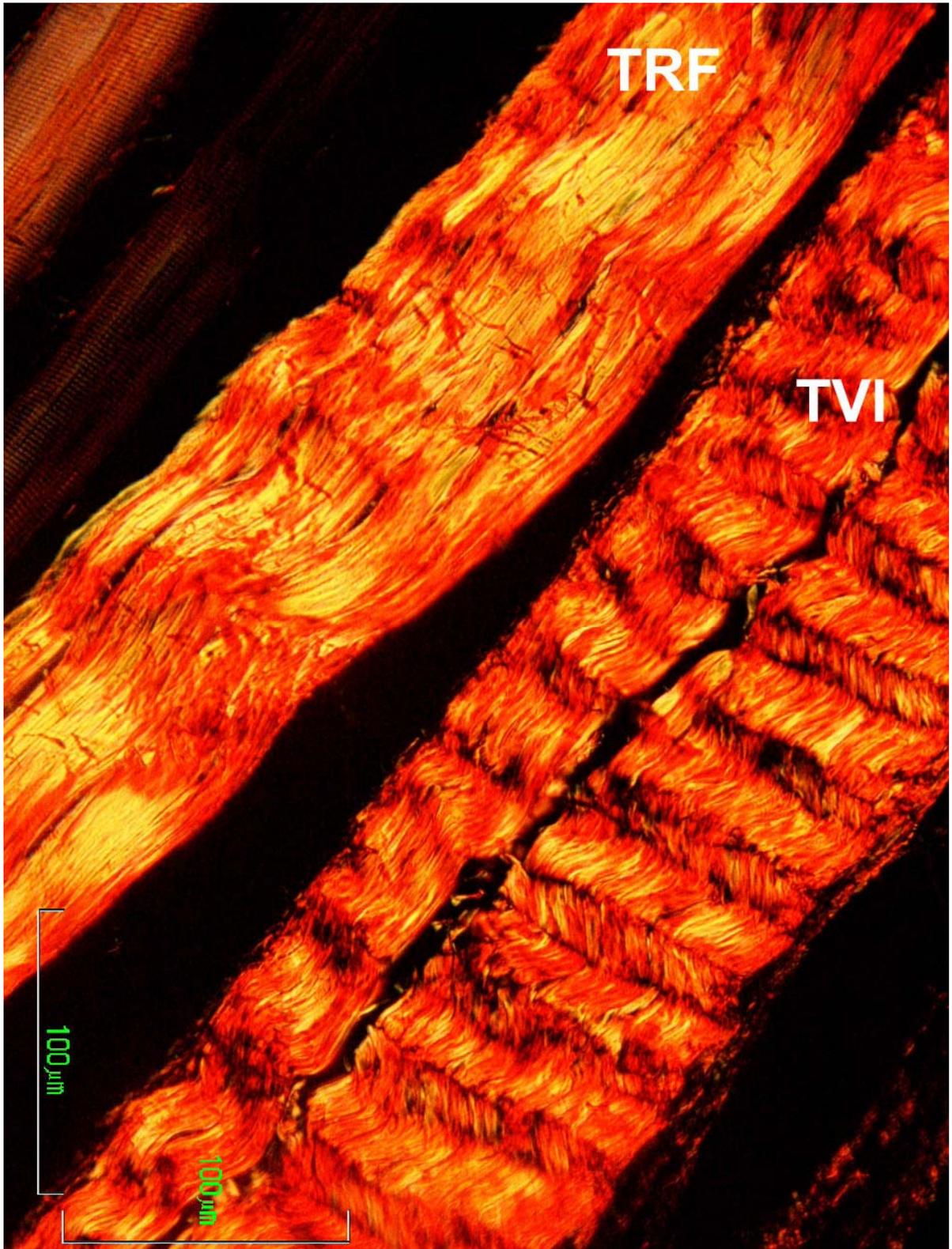


Figura 3. PLM: strutture connettivali soprapatellari: il TRF e il TVI mostrano una periodica alternanza di bande chiare e scure di estinzione corrispondente ai crimps tendinei, i quali differiscono sia per numero che per dimensioni nei due tendini. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .



Figura 4. PLM: struttura connettivale sottopatellare. Il tendine patellare (TP) dal margine inferiore di PO si porta in basso per inserirsi poi sulla tuberosità tibiale. Le fibre collagene mostrano un andamento rettilineo e parallelo, interrotto da periodici ed ampi crimps. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

## TENDINE DEL RETTO FEMORALE (TRF)

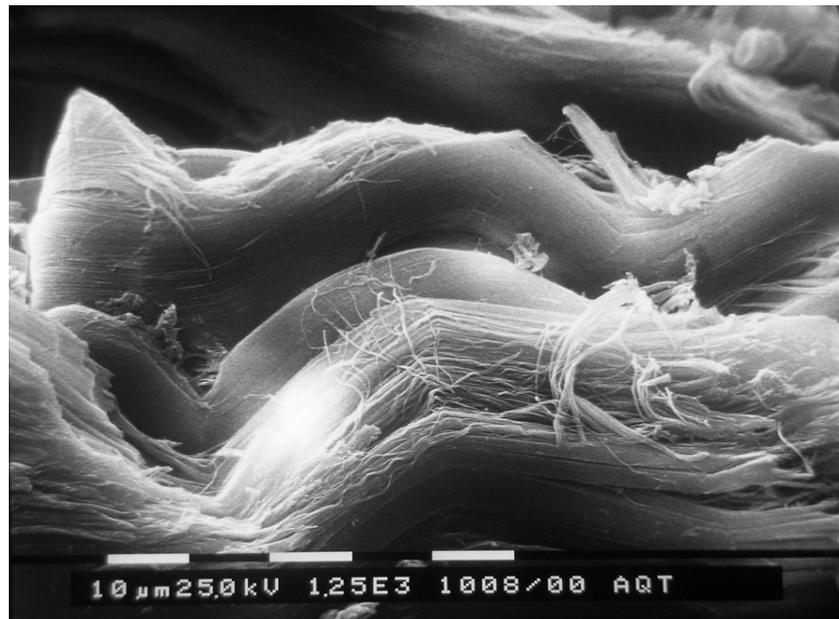


Figura 5. SEM: tendine del retto femorale (TRF). I fasci di fibre collagene presentano un andamento flessuoso ed individuano ampi crimps planari. Barra = 10 μm.

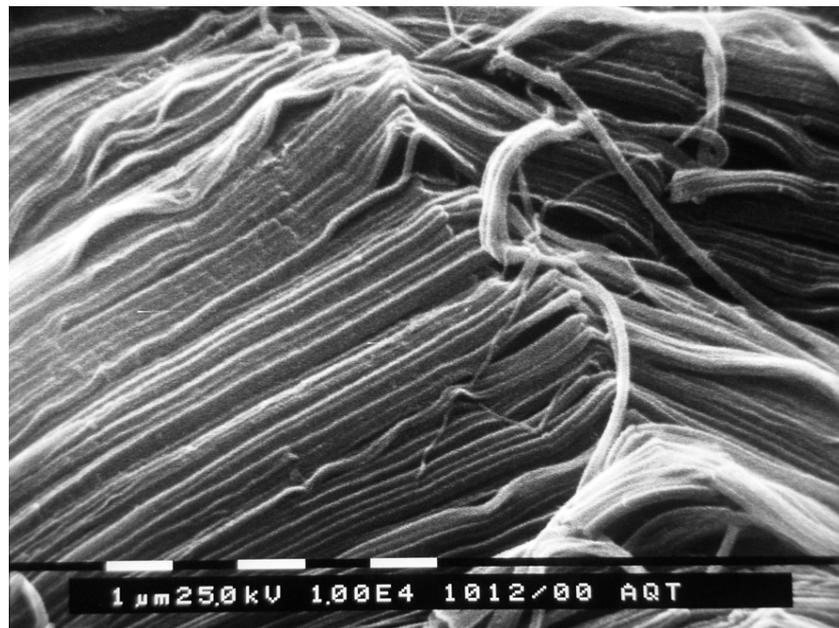


Figura 6. SEM: tendine del retto femorale (TRF). A maggiore ingrandimento si apprezza come le fibrille collagene siano perfettamente allineate e impacchettate tra di loro all'apice del crimp tendineo. Barra = 1 μm.

## TENDINE DEL VASTO INTERMEDIO (TVI)

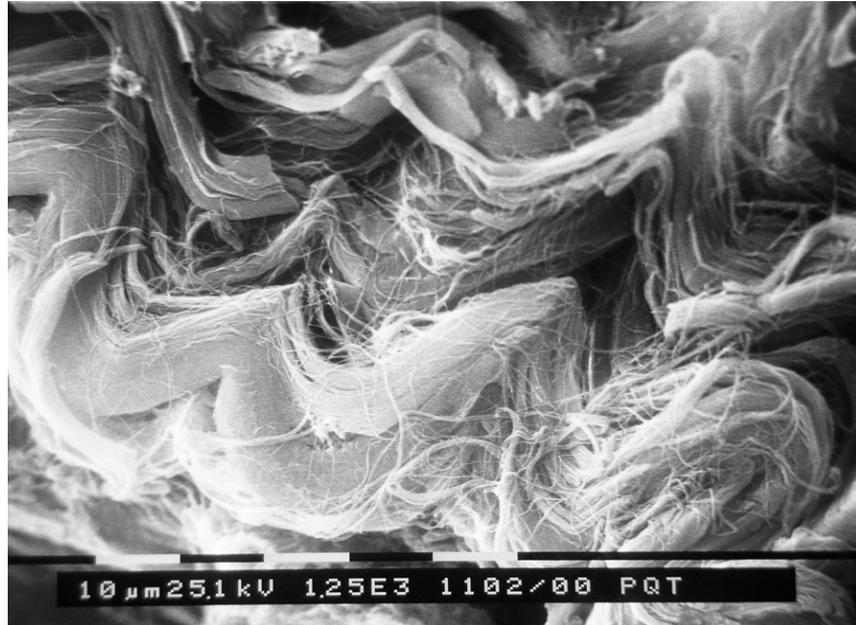


Figura 7. SEM: tendine del vasto intermedio (TVI). Le fibre collagene seguono un evidente andamento a zig-zag planare ed individuano crimps con angoli al vertice molto accentuati. Barra = 10 μm.

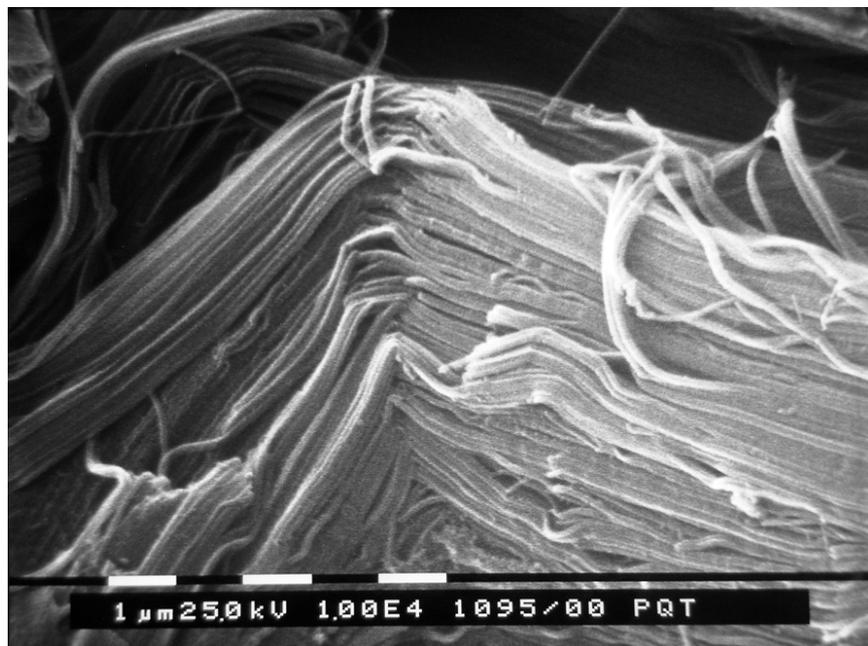


Figura 8. SEM: tendine del vasto intermedio (TVI). Nella maggior parte dei crimps le fibrille collagene mostrano un decorso parallelo e risultano riunite in fasci compatti. Lungo il decorso di alcune fibrille si notano più crimps fibrillari. Barra = 1 μm.

## TENDINE PATELLARE (TP)

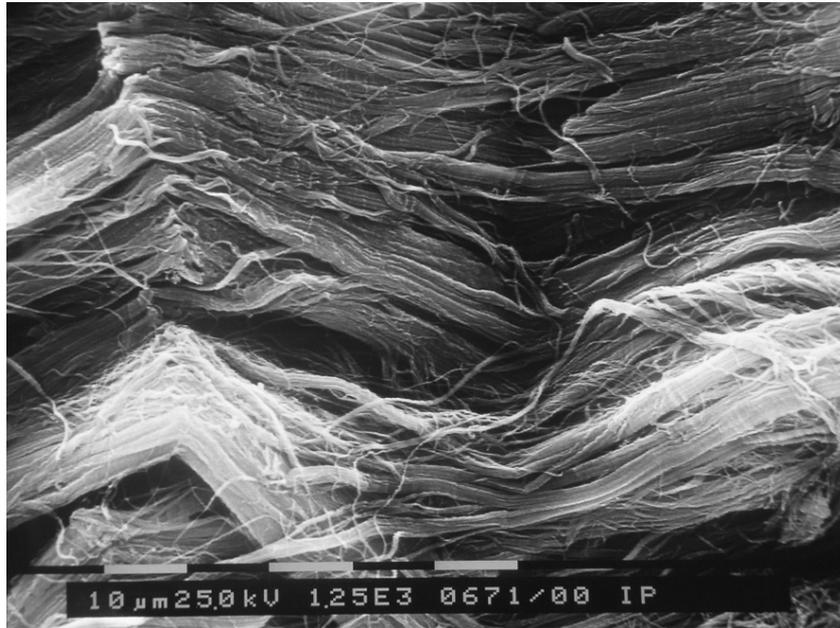


Figura 9. SEM: tendine patellare (TP). Ampii crimps planari simili per morfologia e dimensioni a quelli del TRF. Barra = 10  $\mu$ m.

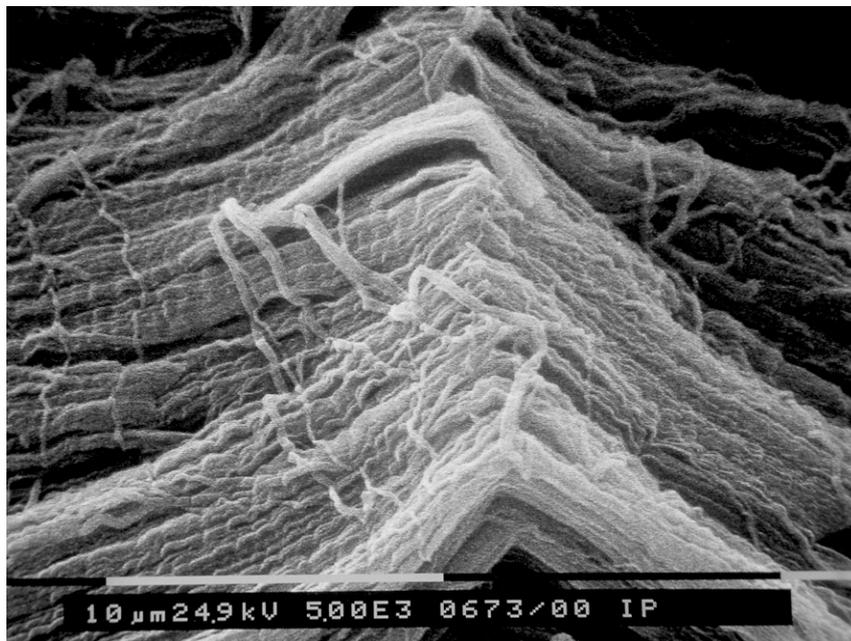


Figura 10. SEM: tendine patellare (TP). Ogni crimp tendineo risulta costituito da segmenti fibrillari rettilinei uniti da brusche discontinuità corrispondenti ai crimps fibrillari. Barra = 10  $\mu$ m.

## CRIMPS FIBRILLARI IN TRF, TVI E TP

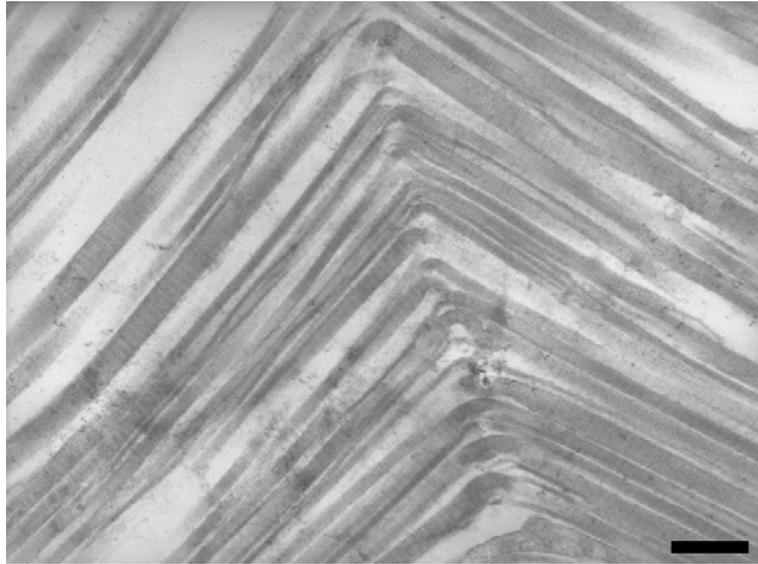


Figura 11. TEM: tendine del retto femorale (TRF). Il crimp tendineo è costituito da segmenti fibrillari rettilinei e paralleli tra loro interrotti dai crimps fibrillari, in corrispondenza dei quali le fibrille collagene perdono la loro forma cilindrica ed appaiono schiacciate o ritorte. Barra = 500 nm.

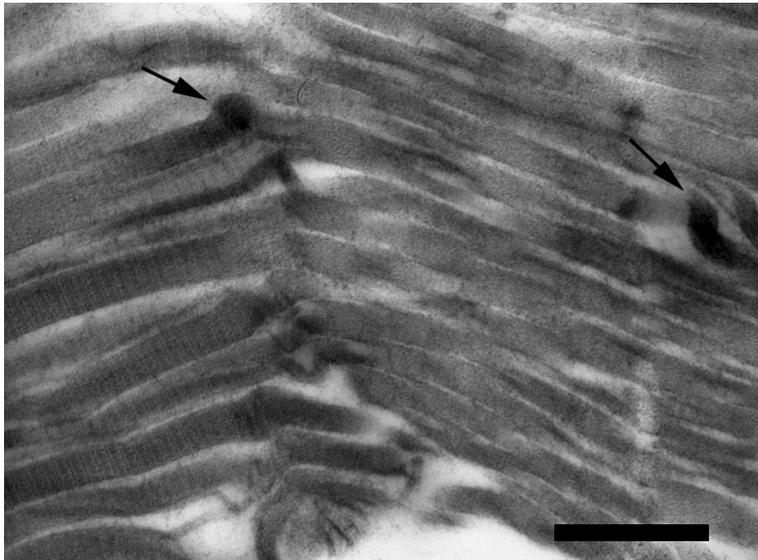


Figura 12. TEM: tendine del vasto intermedio (TVI). In corrispondenza di alcuni crimps fibrillari le fibrille appaiono nettamente ritorte; altre fibrille presentano crimps fibrillari multipli lungo la loro estensione (indicati dalle frecce). Barra = 500 nm.

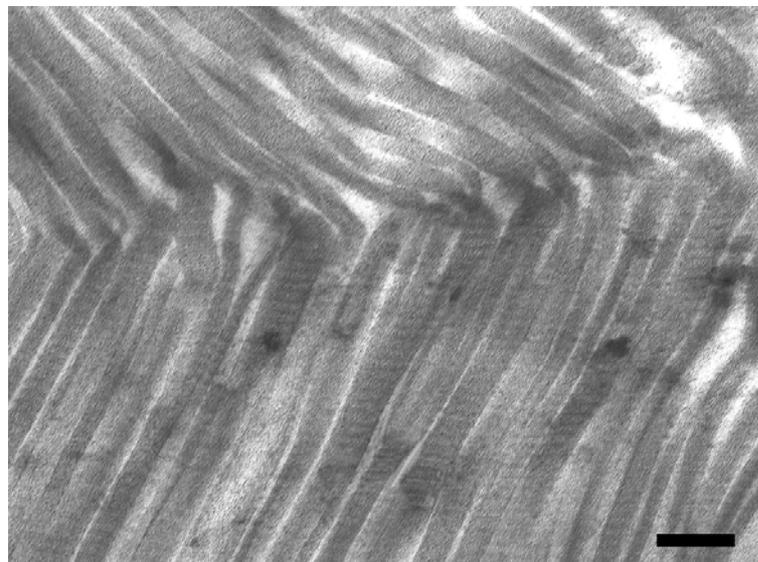


Figura 13. TEM: Tendine patellare (TP). Anche nel TP ogni crimp tendineo include più crimps fibrillari. Le fibrille nel punto in cui piegano mostrano diversi pattern di ripiegamento: alcune appaiono piegate con perdita del caratteristico bandeggio periodico, altre ritorte sul loro asse a guisa di baionetta. Barra = 500 nm.

**TABELLA I**

<b>CRIMPS</b>	<b>TENDINI</b>		
	Tendine del Retto Femorale (TRF)	Tendine del Vasto Intermedio (TVI)	Tendine Patellare (TP)
Numero	5.4±1.4 <sup>a</sup>	14.5±4.7 <sup>b</sup>	6.1±2.8 <sup>a</sup>
Ampiezza angolo al vertice (°)	141.5±15.0 <sup>a</sup>	122.3±14.8 <sup>b</sup>	146.2±12.2 <sup>a</sup>
Lunghezza base (µm)	75.5±22.6 <sup>a</sup>	36.0±14.1 <sup>b</sup>	72.3±28.9 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> differenza non statisticamente significativa

<sup>b</sup> differenza statisticamente significativa (P< 0.05)

Analisi comparativa dei dati morfometrici relativi alla struttura dei crimps nel tendine del retto femorale (TRF), nel tendine del vasto intermedio (TVI) e nel tendine patellare (TP). I dati sono espressi come media ± deviazione standard.