

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DOS ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS SOBRE A
BIOQUÍMICA, MORFOLOGIA, BIOMECÂNICA E EXPRESSÃO GÊNICA DE
DIFERENTES TENDÕES DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE CARGA**

RITA DE CÁSSIA MARQUETI

SÃO CARLOS – SP

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DOS ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS SOBRE A
BIOQUÍMICA, MORFOLOGIA, BIOMECÂNICA E EXPRESSÃO GÊNICA DE
DIFERENTES TENDÕES DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE CARGA**

RITA DE CÁSSIA MARQUETI

**Tese de Doutorado apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da
Universidade Federal de São Carlos como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutora em Ciências Fisiológicas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Co-orientador: Prof^o. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (UNICAMP)

Apoio Financeiro: FAPESP

SÃO CARLOS – SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M357ee

Marqueti, Rita de Cássia.

Efeitos dos esteróides anabólicos androgênicos sobre a bioquímica, morfologia, biomecânica e expressão gênica de diferentes tendões de ratos submetidos ao exercício de carga / Rita de Cássia Marqueti. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

207 f.


Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fisiologia humana. 2. Decanoato de nandrolona. 3. Remodelamento do tendão. 4. Metaloprotease. 5. Biomecânica. 6. Expressão gênica. I. Título.


CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Rita de Cássia Marqueti Durigan

Profª. Drª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo..... 

Profª. Drª. Ana Cláudia Mattiello-Sverzut..... 

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto..... 

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel..... 

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino..... 

*“A vida não é sempre o que se espera,
Pobre de quem não se considera um aprendiz.
Cada um é um, tudo vale nada,
Se até o fim da estrada não se chega a ser feliz”.*

Dedicatória

*Aos meus amados pais, Alfério e Terezinha,
por serem os alicerces de cada etapa sonhada e cumprida.
Pela imensa compreensão, incentivo e auxílio em todos os momentos da minha vida,
minha infinita gratidão!*

Ao meu esposo, João Luiz Quaglioti Durigan.

Você é minha fortaleza, meu grande amigo e companheiro.

Não tenho palavras para expressar meu amor, gratidão e admiração por você.

A cada dia que passa você me proporciona concentrações de respeito, alegria, sinceridade e compromisso presente. Tudo isso se traduz em felicidade mútua... faz tudo valer a pena, torna a vida mais bonita e interessante. Você é o anjo da minha vida. Obrigada por tudo!

Te Amo!

À minha querida orientadora,

Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, minha mestre!

Passaram-se seis anos e meio de convivência e durante todo este período aprendi muito contigo. Minhas palavras a você são de gratidão, pelos constantes ensinamentos, pela orientação, incentivo, paciência e companheirismo. Por respeitar as minhas limitações e me ensinar a superá-las; por me mostrar os caminhos da pesquisa, pelos conselhos (e olha que não foram poucos), e principalmente pela grande amizade. Sobre a amizade basta lembrar que você sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e também nos mais felizes da minha vida... O meu crescimento profissional e pessoal certamente se deve a sua competência e exemplo. Mulher admirável!

Muito Obrigada!

Ao meu co-orientador, Hernandes Faustino de Carvalho (do Instituto de Biologia da UNICAMP), por ter me orientado e confiado em meu trabalho, pela paciência e ajuda em todos os momentos...

Pelas críticas construtivas e palavras de incentivo que me fizeram enxergar mais longe.

Pela atenção e conversas nos momentos inoportunos da vida.

Admiro-te pela competência e sabedoria. Por ter me ensinado a não dizer “enfim”, simplesmente porque não podemos subornar nossas próprias opiniões e sim estimular nossa capacidade crítica de ir além. Obrigada por tudo!

Agradecimentos



O compromisso de sempre ter respostas prontas é pesado para qualquer ombro. Porém, é exatamente a possibilidade de não sabermos tudo que nos faz correr atrás e nos torna perseverantes. A curiosidade, esta é que excita nossa capacidade de descoberta, nos fortalece nos faz acreditar que podemos ser melhores do que somos. Quando se descobre que buscar as respostas, mesmo que muitas vezes sem sucesso, significa ao mesmo tempo aprender, ensinar, trocar experiências, críticas, oportunidades e vivências e que tudo isso pode nos tornar mais leves e felizes... Bem, então já temos motivos de sobra para agradecer!

A Deus, "Por me dar a serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, a coragem para modificar as coisas que posso e a sabedoria para distinguir a diferença".

Agradeço imensamente à minha família, em especial meus pais, Alfério e Terezinha, meus irmãos, Rafael e Donaldo, cunhada, Lucimara e sobrinho, Henrique. Minha nona, Egide, querida amada, sinto muita saudade de ti! Meu esposo João, que é minha nova família... Meus sogros, Victório e Maria Ivone e tia Maria Irma. A todos vocês, obrigada de coração aberto, por andarem comigo, confiarem em mim e por me ensinarem a sabedoria maior: "O Amor".

Ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez e Prof. Dr. Vilmar Baldissera pela parceria com o Laboratório de Fisiologia do Exercício que contribuiu para a realização da pesquisa, sempre me abrindo portas, pela atenção e lições compartilhadas.

A todos os professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela atenção, respeito, e conhecimento transmitido

À Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini, do Departamento de Fisioterapia, por todo o aprendizado compartilhado e pelas portas sempre abertas do seu laboratório. Agradeço também a sua equipe, meus colegas e amigos em especial: Gabriel, Thiago, Sabrina, Dório, Marcela, Cristina, Esperanza e João (meu esposo) pela troca de experiências, sugestões, atenção e principalmente pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, do Instituto de Biologia da UNICAMP, e seus alunos em especial, Andrea e Tati, pela atenção, troca de experiências, conversas e amizade.

À Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira da Escola de Educação Física e Esporte da USP, pela colaboração nas dosagens de hidroxiprolina e enzima conversora de angiotensina, pela sua atenção, disponibilidade e contribuição com este trabalho. Também a técnica Glória e a todos os alunos do seu laboratório que me auxiliaram nos experimentos. Muito obrigada.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, pela convivência diária, compreensão, auxílio, troca de experiências, aprendizado e amizade. Sou imensamente grata. Nosso laboratório tem uma característica, o de estar sempre cheio de pessoas! Convivi com muitos colegas queridos, que já defenderam e se foram deixando saudades: Renner, Marcelo, Raquel, Cristina, Carol, Oscar, Lili, Verzola, Estela, Milena e Márcia (que além de amiga agora é vizinha). Algumas colegas de longa data firme e forte ainda me acompanham: Carmen, Kelli e Juliana. Alguns de data não muito longa: Cláudio, Ana Carolina, Ana, Sabrina, Sílvia, Uliana, Verônica, Araceli, Natália, Patty. Outras jovens pesquisadoras: Livia e Cínthia. Algumas “agregadas”: Patrícia, Daniela, Angélica, Daíse e Elaine. É uma satisfação tê-las em nosso laboratório. Todos vocês foram sempre muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal. Aprendi a respeitar as diferenças e trabalhar em equipe. Sempre guardarei boas lembranças. Ah! Perdoem-me se esqueci de alguém, afinal são tantos!! Meu muito obrigado também aos técnicos: “Bete” (sempre alegre) e “Zé Roberto,” por terem auxiliado sempre que precisei, pela atenção e carinho.

Não poderia esquecer-me dos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia do Exercício, Richard, Guilherme, Jonato, Juca, Jose, Matheus, Rodrigo, Maria Fernanda, Diego, pela troca de conhecimentos, pelos momentos de alegria e risadas na hora do café, pela boa convivência e incentivos. Ao técnico, “Cacau”, obrigada por ter me ajudado e ensinado nos experimentos, sempre com muita paciência, a arte de trabalhar com animais.

Aos amigos que fiz no Laboratório do Prof. Hernandez, todos (incluindo os que já se foram e os que chegaram) vocês me acolheram e sempre estiveram dispostos a me ajudar. Agradeço em especial, Danilo, Taíze, Alexandre, Marco e Fabiana.

À amiga Estela, pela amizade, atenção e carinho ao longo de todo esse tempo... Pelas inúmeras vezes que me acolheste na sua casa, sempre que precisei!

À amiga Carol, pelo carinho, amizade, paciência e atenção. Sempre te falo, sua família é linda e você tem um coração grande!

À minha sempre amiga Araceli, pela convivência e verdadeira amizade... Não porque choras-te comigo nos momentos difíceis, mas porque ris-te comigo nos momentos alegres. “Eu também jamais vou me esquecer de tudo que passamos juntas”.

À amiga e madrinha, Anelena Follini, pela sua amizade, carisma e exemplo. Você é uma pessoa de grande beleza interior.

I would like to express my gratitude to Dr. Michael Kjær, who accepted me into the laboratory, for his support, advice and patience in improving my career at the Institute of Sport Medicine Copenhagen. I would also like to address my special thanks to collaborators Dra. Katja M. Heinemeier and Dr. Peter Schjerling, who helped me immensely in developing part of this project (gene expression in tendons). They were also a valuable source of ideas and motivation. I want to extend a special thanks to senior researchers: Nina Beyer, Henning Langberg, Peter Magnusson, and Jesper Andersen Lovindeer. Their collaboration was greatly appreciated. I am grateful to my colleagues and friends Jessica, Monica, Tinna, Abigail, Lotte, Frank, Ida, Ulla, Martin, Mette, Lars, Dorthé, Teressa, Christian, Philip, Susanne, Jakob, Anders and Troels (whose name I could never pronounce correctly, but who always understood) for being so considerate; to the technicians Ann-Christina, Anja, Ann-Marie and Camilla for their help; and, finally, to the friendly secretaries Birgitte, Else, Pia, Trine, Kirsten and Merethe. I am very grateful for the warmth and friendship I received and for the many lessons I learned during my time at the Institute. I have only good memories and I will never forget the moments and opportunities that allowed me to grow professionally and personally.

A todos, que de uma forma ou de outra participaram desta minha trajetória, mesmo aqueles que estiveram longe... A todos que fazem a diferença na minha vida. Aquele abraço de gratidão.

A FAPESP pela concessão da bolsa e assim proporcionar a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Estrutura organização e composição dos tendões.....	17
1.2	Descrição anatômica do tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP)	27
1.3	Esteróides anabólicos androgênicos (EAA).....	28
1.4	Contextualização do modelo experimental utilizado	34
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	REFERÊNCIAS.....	40
4	MANUSCRITO I.....	48
	Atividade das metaloproteinases de matriz (MMP-2) nas regiões tendíneas: efeitos do exercício de carga associado ao esteróide anabólico androgênico	49
5	MANUSCRITO II.....	71
	MMP-2, exercício de salto e nandrolona no músculo esquelético	72
6	MANUSCRITO III	86
	Respostas biomecânicas de diferentes tendões de ratos submetidos ao exercício de carga e o decanoato de nadrolona	87
7	MANUSCRITO IV	117

	Análise morfológica de diferentes tendões de ratos após exercício de carga e administração de esteróides anabólicos androgênicos.....	118
8	MANUSCRITO V.....	158
	Expressão gênica em diferentes regiões de tendões de ratos submetidos ao exercício de carga associado à administração de decanoato de nandrolona	159
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	205

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do salto vertical em associação com esteróide anabólico androgênico (EAA) nas propriedades bioquímicas, biomecânicas, morfológicas e a expressão dos principais genes responsáveis pelo remodelamento do tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) de ratos. Ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos experimentais: animais sedentários (S); animais sedentários com a administração de EAA (EAA) (5 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana); animais treinados (T) (salto vertical na água com carga de 50 a 80% do peso corporal do animal, duração de 7 semanas – 5 dias/semana) e animais treinados com a administração de EAA (EAAT). Foram utilizadas as técnicas: de zimografia (para analisar a atividade da metaloproteínase - MMP-2); teste biomecânico (área de secção transversa, deslocamento até a carga máxima, tensão máxima, deformação máxima, e módulo de elasticidade); morfologia dos tendões e real time PCR. A zimografia mostrou que o treinamento aumentou a atividade da MMP-2 em todas as regiões do TFS enquanto o EAA ou associação de ambos reduziu a atividade da mesma em todas as regiões analisadas. O teste biomecânico mostrou que o EAA aumentou a rigidez dos tendões (baixa elasticidade e capacidade de resistir carga), e os efeitos foram reforçados pela associação de ambos, EAA e treino. O TFP foi o mais afetado pelo treinamento, EAA, e pela interação de ambos. A morfologia juntamente com a estereologia mostrou que o treinamento aumenta a vascularização e celularidade, enquanto o EAA associado ao treinamento reduz esses dois parâmetros nos 3 tendões avaliados. A expressão gênica mostrou que o treinamento não aumentou a expressão dos principais genes responsáveis pela resistência tecidual: colágeno tipo I e III, mas o EAA ou a associação com o treinamento promoveram uma redução na expressão desses genes em todas as regiões dos tendões. Assim, conclui-se que o exercício aumentou o remodelamento e modulou diferentemente a expressão de genes relacionados com o remodelamento da MEC no tendão. Já a administração de EAA e associação com o exercício acarretaram efeitos negativos no tendão, propiciando um remodelamento deficiente que pode estar relacionado com a ocorrência de lesões.

Palavras-chave: Tendão, esteróide anabólico androgênico, remodelamento, metaloproteínase de matrix, teste biomecânico, histologia, expressão gênica.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of vertical jump associated with anabolic androgenic steroids (AAS) on the biochemical, biomechanical and morphological properties, and the expression of the main genes responsible for remodeling in the calcaneal tendon (CT), superficial flexor tendon (TFS) and deep flexor tendon (TFP) in rats. Animals were divided into four experimental groups: Sedentary (S), Trained (T) (vertical jump, 50 – 80% body weight load, 7 weeks, 5 days/week), AAS-treated sedentary rats (AAS) (5 mg/kg of body mass, twice a week.), and AAS-treated and trained animals (AAS-T). The techniques performed were: zymography (to analyze the metalloproteinase activity - MMP-2); biomechanical test (cross-sectional area, displacement at maximum load, maximum stress, maximum strain, and elastic modulus); morphology and real time PCR. The training promoted an increase in MMP-2 activity in the three regions of TFS, while the AAS treatment or the combination of training and AAS decreased both MMP-2 concentration and active form in all regions of the SFT. The biomechanical test showed that AAS increased tendon rigidity (i.e., lower elasticity and capacity to resist load) and the effects were enhanced by the combination of AAS and training. The DFT was the most affected by training, AAS, and the interaction of both. Taken together, the morphology and stereology showed that training increases the vascularity and cellularity, while the AAS combined with training reduced these two parameters in the three evaluated tendons. Gene expression showed that training did not increase the main genes expression responsible for tissue resistance: collagen type I and III, but the AAS or the association with training promoted a downregulation of expression in these genes on all tendons regions. In conclusion, the exercise increased remodeling and differently modulates the genes expression related to ECM remodeling in tendon. The AAS administration and combination with exercise induce negative effects, providing a poor remodeling and increasing risk of tendons injury.

Key-words: tendon, steroid anabolic androgenic, remodeling, matrix metalloproteinases, biomechanical test, histology, gene expression.

1 INTRODUÇÃO



Christiania - Copenhagen – Dinamarca

1.1 Estrutura, organização e composição dos tendões

Os tendões são estruturas dinâmicas capazes de se adaptar mecanicamente e estruturalmente em resposta às forças de tensão aplicadas pelo sistema músculo esquelético, o que resulta em adaptação funcional, para atender à demanda biomecânica (Koob, Summers, 2002; Birch, 2007).

Os tendões são os responsáveis mecanicamente pela transmissão de forças para o osso, fato que permite a locomoção e aumenta a estabilidade articular (Ker, 2002; Koob, Summers, 2002; Maganaris, Paul, 2002; Ritty, Herzog, 2003; Wang, 2006; Clegg et al., 2007). O tendão também é definido como um feixe inelástico de fibras de colágeno arranjadas paralelamente na direção à aplicação da força do músculo (Wang, 2006). No entanto, os tendões não se comportam como um material inextensível, mas agem como molas biológicas que se alongam elasticamente, armazenam e liberam energia durante a locomoção (Zajac, 1989) e respondem às cargas mecânicas mudando o metabolismo e suas propriedades mecânicas (Wang, 2006).

O tendão é uma estrutura altamente organizada em forma hierárquica, que contém moléculas de colágeno, fibrilas, feixes de fibrilas, fibras, fascículos e unidades tendão que correm paralelos ao eixo geométrico (Fig. 1) (Silver et al., 2003; Kjær, 2004, Franchi et al., 2007a). As fibras de colágeno consistem em um variável número de fibrilas. O diâmetro das fibrilas varia de 20 nm até 150 nm. No tendão de Aquiles em humanos, as fibrilas estão entre 30 nm e 130 nm de diâmetro; enquanto os flexores e extensores dos dedos das mãos e dos pés, o diâmetro é 20-60 nm (Kannus, 2000).

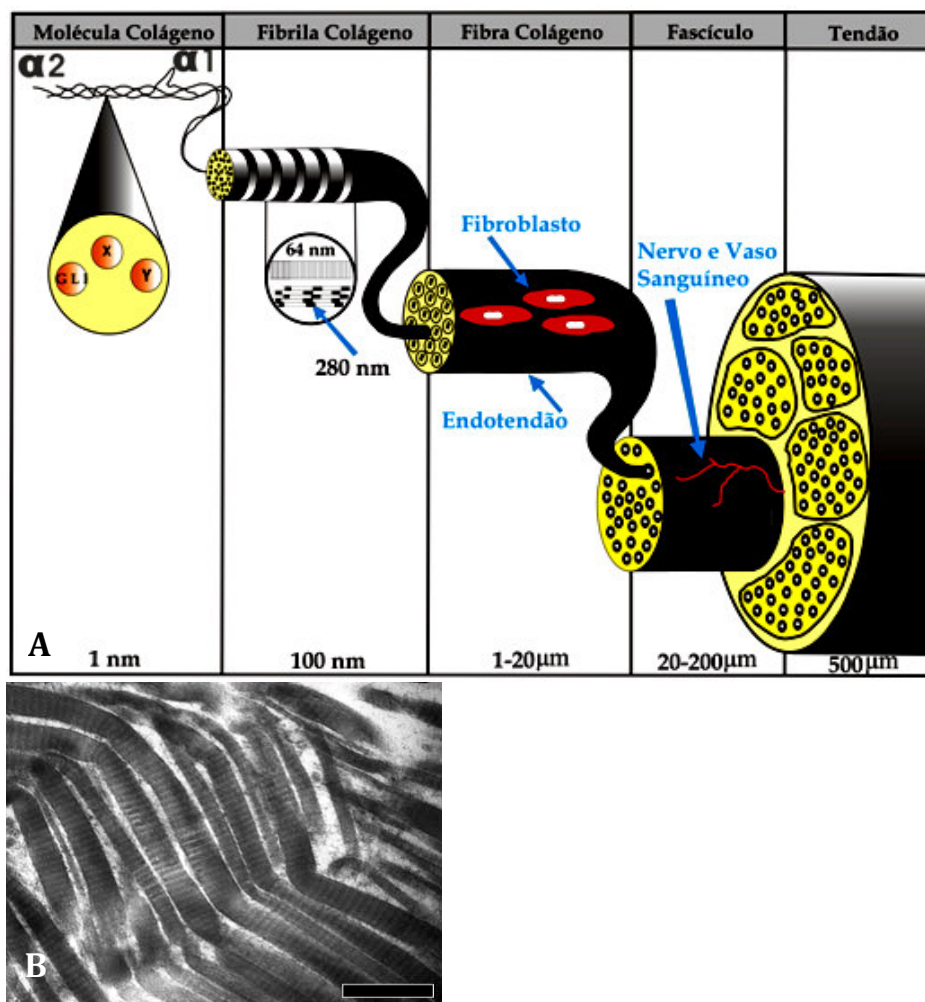


Figura 1. A. Estrutura hierárquica do tendão. O diagrama acima mostra a relação entre moléculas de colágeno, fibrilas, fibras, fascículos e unidade de tendão. Modificado de Silver et al., (2003). B. Microscopia eletrônica mostrando o crimp fibrilar. Franchi et al., (2007b).

Os tendões são revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo denominado paratendão, constituído principalmente por colágeno tipo I e III e fibras elásticas, funcionando como uma luva elástica permitindo a livre circulação do tendão contra os tecidos circundantes (Kannus, 2000). Abaixo do paratendão, o tendão é inteiramente recoberto pelo epitendão que é uma rede relativamente densa de colágeno fibrilar com 8-10 nm de espessura (Kannus, 2000; Magnusson et al., 2003). Na sua superfície externa, também chamada de camada

parietal (Franchi et al., 2007a) o epitendão é contínuo com o paratendão e na superfície interna com o endotendão, também chamada de camada visceral (Kannus, 2000, Franchi et al., 2007a), é formado por uma rede fina de tecido reticular no interior do tendão envolvendo cada fibra individual bem como grandes unidades de feixes de fibras, e capaz também de conduzir vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (Jozsa et al., 1991; Kannus, 2000). A bainha rica em vasos sanguíneos e nervos e juntamente com o epitendão que adere à superfície do tendão é chamado muitas vezes peritendão (Bejamin et al., 2008).

Os tendões são constituídos de 55-70% de água, e uma substancial parte desta está associada aos proteoglicanos (PGs) na MEC. No tendão seco, cerca de 60-85% é composto de colágeno (predominantemente do tipo I) arranjado em fibras resistentes à tensão. O tendão também contém colágeno do tipo III (0-10%), IV (~ 2%), V e VI. Há elastina (~ 2% do peso seco) e muito pouca substância inorgânica (< 0,2%). O restante das substâncias (~ 4,5 %) consiste de diferentes proteínas (Kjær, 2004, Benjamin et al., 2008). O colágeno tipo I é constituído por duas cadeias polipeptídicas $\alpha 1$ e uma cadeia polipeptídica $\alpha 2$ entrelaçadas em uma tripla-hélice para formar o pró-colágeno. (Risteli et al., 1995). O colágeno tipo III é estruturalmente similar ao colágeno tipo I, entretanto é uma molécula homotrimérica (Banos, et al., 2008) de três cadeias $\alpha 1$ (Kadler, 1995). O colágeno tipo III, que é o segundo colágeno encontrado mais comum, localizado principalmente no epitendão e endotendão (Wang, 2006) possui a habilidade de formar fibrilas heterotípicas de colágeno tipo I e V, além de controlar o diâmetro fibrilar (Waggett et al., 1998). A associação de colágeno tipo I e III é essencial para a fibrilogênese nos tendões (Banos et al., 2008)

As fibrilas que formam o tendão são virtualmente orientadas em uma direção, ou seja, são direcionadas ao longo do eixo que é também a direção do estresse fisiológico normal; os fibroblastos monitoram continuamente a magnitude e a direção desta força (Koob, Summers,

2002) sintetizando vários elementos da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno, proteoglicanos e outras proteínas (Magnusson et al., 2003). Os fibroblastos são arranjados tipicamente ao longo do eixo de força (Fig. 2) e podem ser conectados uns com os outros via junções tipo *gap* (Wang, 2006).



Figura 2. Secção longitudinal de tendão flexor superficial de rato corado com hematoxilina e eosina mostrando as ondulações dos feixes de fibras de colágeno e fibroblastos (setas). Barra; 30 μ m.

A ligação física entre os fibroblastos e a MEC formando uma interação célula-matriz permite que as células detectem e respondam a estímulos mecânicos, presumivelmente vitais para a função dos fibroblastos (Sarasa-Rened, Chiquet, 2005). Este processo, chamado de mecanotransdução, é um importante mecanismo no qual o estresse mecânico age sobre as células, iniciando processos de sinalizações intracelulares, promovendo, em alguns casos o crescimento celular, alteração de arquitetura e morfologia de diversos tipos celulares, além de

influenciar em respostas metabólicas (Kjaer, 2004; Chiquet-Ehrismann, Tucker, 2004; Chiquet et al., 2009). Em geral os fibroblastos se fixam à MEC via integrinas, receptores de superfície celular de adesão e que conectam o citoesqueleto intracelular à matriz permitindo que sinais mecânicos se propaguem de forma bi-direcional, ou seja, de fora para dentro e de dentro para fora. (Sarasa-Renedo, Chiquet, 2005; Franchi et al., 2007a). No entanto, outras proteínas não colagênicas como a tenascina C, uma glicoproteína que contribui na estruturação da MEC, liga-se também às integrinas na membrana dos fibroblastos transmitindo as modificações que ocorrem na MEC para as células (Järvinen et al., 2003; Chiquet-Ehrismann, Tucker, 2004).

Já o componente celular dos tendões, representado pelos fibroblastos, compreende cerca de 90 -95% dos elementos celulares do tendão, os outros 5 – 10% são compostos por condrócitos, células sinoviais e células vasculares como células endoteliais de capilares (Kannus, 2000; Wang, 2006).

As células do tendão são cercadas pela MEC (Waggett et al., 1998) descrita como um gel aquoso dominado por colágeno (Kerr, 2002). A integridade e especificidade da MEC são vitais para a função eficiente dos tendões (Birch et al., 2008). A elevada resistência à tração fornecida pelas fibras da matriz garante que o tendão seja capaz de resistir a grandes forças, enquanto o componente celular é responsável pela manutenção da matriz (Birch et al., 2008).

Em relação a muitos tecidos orgânicos, os tendões têm baixa celularidade e a força é transmitida pela rede densa de fibras de colágeno do tipo I, altamente alinhada ao longo do eixo de força, suplementado por várias PGs e outras proteínas não colagenosas (Ritty, Herzog, 2003). A maioria das macromoléculas presentes na MEC dos tendões pode ser classificada em três grupos: (1) colágeno, (2) proteoglicanos (PGs) e (3) glicoproteínas. O alinhamento do colágeno tipo I garante a integridade estrutural dos tendões (Yoon, Halper, 2005).

O tendão contém uma variedade de PGs sendo que as interações entre o colágeno e as PGs são um importante aspecto para o seu desenvolvimento (Buchanan, Marsh, 2002). A água presente nos tendões está associada aos PGs (Kjær, 2004) que são grandes moléculas hidrofílicas, compostas por uma proteína central na qual estão covalentemente ligadas uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), que são açúcares sulfatados (Provezano, Vanderby Jr, 2006). Pequenos PGs atuam na organização do tecido, orientação e ordenamento das fibrilas de colágeno (Buchanan, Marsh, 2002; Silver et al., 2003). As PGs dos tendões têm ainda um papel de lubrificar e de dar espaçamento, bem como permitir a fusão fibrilar. Essa lubrificação é importante para permitir o livre deslizamento das fibras e fibrilas próximas umas das outras e talvez previna a formação excessiva de ligações cruzadas (Franchi et al., 2007a). Os PGs promovem a difusão de moléculas de água e a migração de células. Além de modular o crescimento celular e a maturação de tecidos especializados, funcionam como filtros biológicos e modulam a atividade dos fatores de crescimento. São responsáveis ainda pela fibrilogênese do tendão e sua expressão é regulada de acordo com o estímulo mecânico que recebe (Yoon, Halper, 2005). Por exemplo, forças de tensão induzem a síntese de decorina (Yoon, Halper, 2005), fibromodulina e biglicana (Waggett et al., 1998; Rees et al., 2000) enquanto que as forças de compressão promovem a síntese de agreganas (Yoon, Halper, 2005).

É importante ainda destacar que o conteúdo de PGs é muito maior nas regiões de compressão que nas de tensão (Yoon, Halper, 2005). Os pequenos proteoglicanos, decorina, fibromodulina e biglicana correspondem a 90% do total de proteoglicanos (Carvalho, 2005). Covizi et al (2001) avaliaram em três diferentes tendões de ratos a quantidade e tipo de GAGs e detectaram a presença de dermatana sulfato em todas as regiões (proximal, intermediária e distal do tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) e região proximal e distal do tendão calcâneo (TC) enquanto que a condroitina sulfato foi predominante na região

intermediária do TFP e distal do TC. Estes achados indicam que a MEC dos tendões possui uma relação direta com a presença de forças mecânicas. Há distintas regiões que diferem quanto à atuação de cargas biomecânicas, isso tem incentivado o estudo das propriedades da matriz extracelular (Carvalho, Vidal, 1995).

Quando os tendões mudam de direção e contornam uma extremidade óssea ou uma articulação, ou ainda nas inserções dos tendões aos ossos (enteses) uma região de fibrocartilagem é desenvolvida como resposta adaptativa para proteção dos tendões contra pressões prejudiciais (Benjamin, Ralphs, 1998; Rees et al., 2009) estimulando a síntese de colágeno tipo II e proteoglicanos (Benjamin, Ralphs, 2004). As fibrocartilagens nos tendões também aumentam a área de fixação à superfície e funcionam como um “freio”, ou âncoras, que auxiliam na dissipação das forças e limitam o alongamento do tendão quando os músculos são contraídos (Benjamin et al., 2006; Shaw, Benjamin, 2007); estas estruturas são ordenadas para resistir às forças aplicadas perpendicularmente (Vogel, Koob, 1989).

Comparados aos músculos, os tendões possuem uma vascularização relativamente limitada; a área ocupada por vasos sanguíneos representa ~1-2% de toda a MEC onde os vasos emanam principalmente para o epitendão (Kjær, 2004). A hipovascularização em tendões de adultos ocorre devido à limitada taxa metabólica e suas funções mecânicas. A angiogênese nos tendões é controlada por várias proteínas estimulatórias e inibitórias (Pufe et al, 2005). Fatores inibitórios como a endostatina são expressos por células da fibrocartilagem dos tendões enquanto as mesmas células não expressam fatores estimulatórios (Benjamin et al., 2008). A inibição da angiogênese é necessária para a o desenvolvimento e manutenção da hipovascularização dos tendões (Pufe et al., 2005). Nas regiões onde os tendões recobrem superfícies ósseas há uma diminuição ainda maior do suprimento sanguíneo, e essa

característica pode ter uma relação direta com as forças de compressão aplicadas nestas regiões (Benjamin et al., 2008).

Estudos em humanos têm demonstrado que o exercício físico pode aumentar o fluxo sanguíneo dentro e ao redor do tecido conjuntivo de tendões (Kjær, 2004). O fluxo sanguíneo na região peritendínea do tendão calcâneo de humanos aumentou 7 vezes durante exercício intenso de flexão plantar comparado com os valores obtidos em repouso (Bousel et al., 2000). Durante longo período de treinamento um dos maiores papéis do fluxo sanguíneo está no reparo do tendão atuando como mediador inflamatório (Magnusson et al., 2003).

Os tendões são submetidos a forças mecânicas *in vivo*, como aquelas inerentes à atividade física, e, portanto, apresentam padrões de fibra e características viscoelásticas que contribuem para o seu comportamento mecânico (Wang, 2006, James et al., 2008). O arranjo e a orientação fibrilar resultante da associação do colágeno com outros componentes da matriz, bem como o grau de organização e ordem molecular são os principais responsáveis pelas propriedades biomecânicas de tendões e ligamentos (Vilarta, Vidal, 1989; Vidal, Carvalho, 1990).

As moléculas de colágeno se alinham para produzir as características do arranjo alternado e formar ligações cruzadas entre as moléculas com o aumento da estabilidade (Cawston, 1996). Este auto-alinhamento das moléculas de colágeno forma fibras que originam tecidos fortes e rígidos (Cawston, 1996). A habilidade das moléculas do colágeno de se reunir dentro de fibrilas em ligações cruzadas é um importante requerimento para o desenvolvimento da força tecidual (Silver et al., 2003; Kjær, 2004).

O arranjo paralelo das fibras de colágeno produz uma estrutura muito resistente e com alta força de tensão, porém pouco resistente à compressão ou cisalhamento (Riley, 2004). As fibras colágenas por possuírem ondulações quando uma pequena força tênsil é aplicada,

permitem que o tendão seja alongado facilmente e se comporte como um bom material elástico (Riley, 2004). Embora as fibras sejam inelásticas, o tendão pode responder de modo elástico pelo recuo e elasticidade do tecido conjuntivo. Os tendões podem suportar altas forças tensoras produzidas pelos músculos e apresentar um comportamento viscoelástico em resposta à carga (Wang, 2006).

O comportamento dos tecidos biológicos em resposta ao estresse mecânico pode ser representado por um gráfico clássico que mostra a magnitude da força aplicada sobre o material em relação ao deslocamento apresentado (Fig. 3) (Binkley, 1989). A curva força-deslocamento é representada pela curva tensão-deformação (*stress-strain*), onde a força é dividida pela área de secção transversa do tecido, e a variação no comprimento pelo comprimento inicial (Binkley, 1989). A curva tensão-deformação provê informações relacionadas à elasticidade, plasticidade, rigidez, ponto de falha, e energia que um tecido é capaz de absorver antes da ruptura (Binkley, 1989).

A deformação do tendão é caracterizada por uma região inicial não linear, com baixa tensão, denominada “toe region” correspondente a conformação “*crimp*” (Fig. 1), que é caracterizado por uma configuração em “*zigzag*” ou arranjos em forma ondulada dos tendões (Franchi, 2007a) cujo angulo varia entre 0 e 60° (Kannus, 2000). Na “toe region”, uma pequena força de tensão é necessária para que ocorra o alongamento do “*crimp*” (Hansen et al., 2002), iniciação do alongamento da tripla hélice, das extremidades não helicoidais e das ligações cruzadas (Riley, 2004), ou seja, uma pequena carga é capaz de causar uma grande deformação.

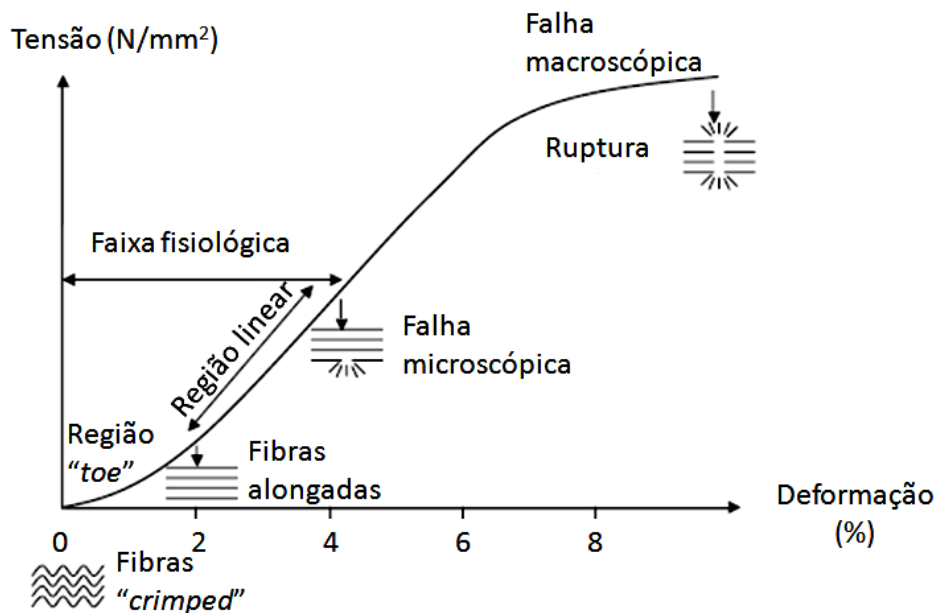


Figura 3. Curva tensão x deformação do tendão, adaptado de Wang, 2006.

Em seguida há uma região linear, conhecida como fase elástica do tendão, sendo que a inclinação da curva tensão-deformação nessa região se refere ao módulo elástico, ou módulo de *Young*, que representa a rigidez do tecido, e está diretamente relacionada com a resistência do material à deformação, ou seja, o tendão exibe pouca deformação em relação à carga aplicada (Wang, 2006). Finalmente, encontra-se uma região não linear, onde ocorre ruptura dos elementos fibrilares do tendão. Esta fase é irreversível, e o rompimento do tendão pode ocorrer, caso haja continuidade da aplicação da força (Wang, 2006; Riley, 2004). As propriedades mecânicas dos tendões têm sido muito estudadas e alteram-se durante o desenvolvimento, com a idade e também em resposta ao exercício (Riley, 2004).

1.2 Descrição anatômica do tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP)

De acordo com a localização anatômica, o tendão calcâneo se origina a partir dos músculos gastrocnêmio e sóleo e se insere no osso calcâneo (Fig. 4A) O TFS tem origem no *músculo flexor digitorum superficialis*, sua porção intermediária se dobra fixando-se sobre a tuberosidade calcanear, a porção distal se estende ao segundo, terceiro e quarto dígito (Fig. 4 A, B e C). O TFP tem origem no *músculo flexor digitorum profundus*, sua porção intermediária passa pelo sulco do maléolo medial deslizando sobre ele quando o músculo se contrai. A porção distal se divide em 5 tendões que se estendem para os dígitos (Fig.4 A e D) (Covizi et al., 2001).

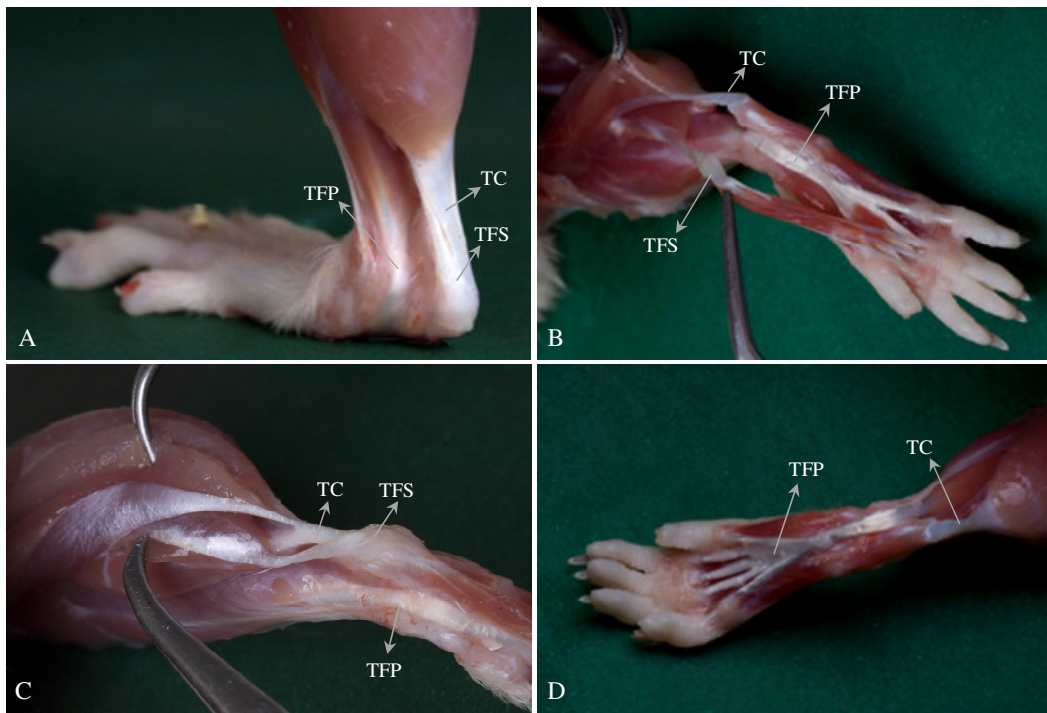


Figura 4. Localização anatômica do tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP).

1.3 Esteróides anabólicos androgênicos (EAA)

Substâncias farmacologicamente ativas com o objetivo de melhorar o desempenho físico são usadas há séculos, mas tem aumentado nos últimos 40 anos, desde a introdução dos esteróides anabólicos androgênicos (EAA) (Sjöqvist et al., 2008). Os atletas de diversos esportes utilizam os esteróides anabólicos androgênicos com a finalidade de aprimorar sua força, massa muscular, desempenho (LaBree, 1991; Milles, 1992) e aparência física (Labre, 2002).

Os EAA, denominados compostos químicos de derivação sintética, imitam os efeitos anabólicos da testosterona, enquanto ao mesmo tempo, minimizam os efeitos androgênicos (Inhofe, 1995; Mottram, George, 2000; Evans, 2004). Modificações na molécula de testosterona têm sido usadas farmacologicamente para alterar o potencial anabólico-androgênico (Evans, 2004).

Os derivados sintéticos da testosterona são modificados estruturalmente para aumentar as ações anabólicas mais que as ações androgênicas deste hormônio (Mottram, George, 2000). Mais de 100 esteróides sintéticos vem sendo desenvolvidos sendo que modificações estruturais originaram três grupos de derivados (Fig. 4). O grupo A é composto pelos ésteres do grupo 17β (cipionato de testosterona, propionato, enantato e undecanoato). A esterificação confere ao esteróide menor polaridade da molécula, tornando-a mais solúvel em veículos lipídicos permitindo preparações injetáveis que produzem a liberação lenta do esteróide na circulação (Shahidi, 2001). No grupo B estão os alquilados na posição 17α (metiltestosterona, metandrostenolona, nortrandolona, fluoximesterona, danazol, oxandrolona e estanozol), derivados que resistem ao metabolismo hepático, portanto são ativos quando administrados oralmente. A modificação está associada a níveis elevados de hepatotoxicidade. O grupo C

compreende os que sofreram alterações nos anéis A, B ou C da molécula de testosterona (Kuhn, 2002; Shahidi, 2001).

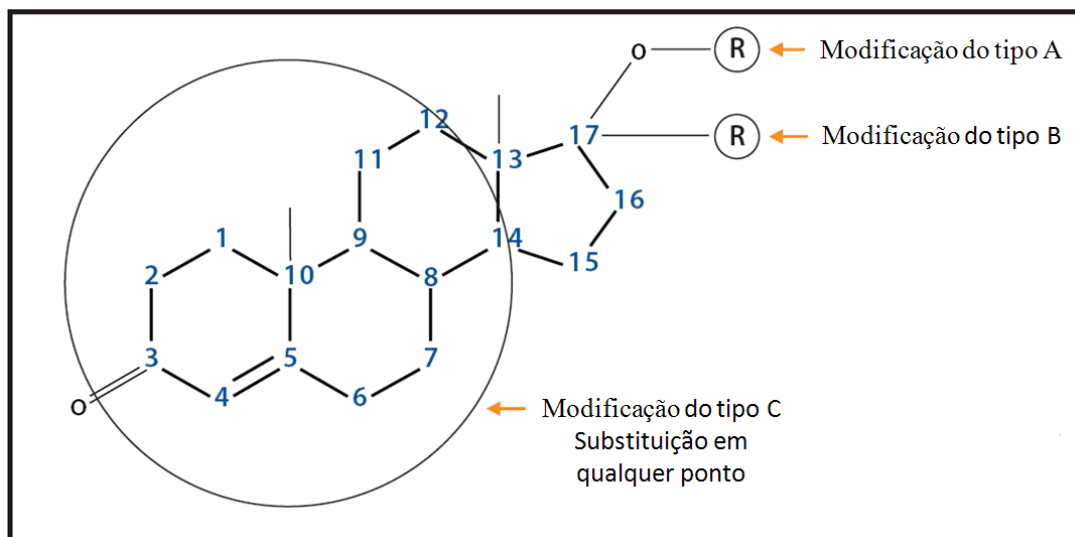


Figura 5 Principais transformações na molécula de testosterona que originam seus derivados sintéticos. Os EAA do tipo A são do grupo dos 17β -esterificados, os do tipo B formam o grupo dos 17α -alquilados e os do tipo C são os que sofrem alterações nos anéis A, B e C da molécula original (adaptado de Mottram, George, 2000).

O decanoato de nandrolona é formado pela esterificação de um grupo 17α -hidroxil com o ácido decanoico, um ácido graxo de cadeia longa, e é liberado lentamente na corrente sanguínea após sua injeção intramuscular, exercendo sua atividade anabólica ótima acima de seis a sete dias (Shahidi, 2001). Possui grande atividade anabólica e sua atividade androgênica é menor do que a da testosterona (Mottram, George, 2000; Kuhn, 2002).

Uma vez no meio intracelular, a nandrolona sofre ação da 5α -redutase. Esta conversão ocorre em grandes proporções nos órgãos sexuais, que possuem altas concentrações da enzima 5α -redutase. Nos músculos, como a presença de 5α -redutase é menor, e a própria nandrolona, classificada como não-aromatizável, interage com os receptores para esteróides, são produzidas respostas anabólicas relativamente maiores (Celotti, Cesi, 1992; Mottram,

George, 2000; Kuhn, 2002). Comparada à testosterona, a nandrolona proporciona menor atividade androgênica e maior ação anabólica, sendo por isso, um dos EAA mais utilizados no mundo (Kutscher et al., 2002).

Os EAA têm uma grande variedade de efeitos nos tecidos corporais. Suas ações fisiológicas ocorrem similarmente à ligação dos hormônios esteróides com uma proteína intracelular nos tecidos alvo. Este complexo hormônio-receptor se transloca para os sítios ligantes na cromatina promovendo a transcrição e subsequente síntese de RNAm. (Bahrke, Yesalis, 2004). Os efeitos dos EAA variam em diferentes tecidos de acordo com o local, tipos de enzimas e concentração de receptores andrógenos.

Entretanto, os mecanismos responsáveis pelas mudanças na força e composição corporal ainda não são conclusivos (Bahrke, Yesalis, 2004). Acredita-se que os EAA convertem um balanço nitrogenado negativo em positivo tanto pelo aumento da ingestão de proteína quanto pelo aumento da retenção de nitrogênio e da síntese de proteína nas células musculares esqueléticas. Outro mecanismo é a competição dos EAA por receptores de glicocorticóides promovendo efeitos anticatabólicos (Bahrke, Yesalis, 2004; Maravelias et al., 2005).

Com relação às dosagens supra-fisiológicas, Wu (1997) relatou que o padrão de abuso dos EAA por atletas excede de 10 a 100 vezes os níveis fisiológicos ou as doses terapêuticas, justificando assim, os efeitos tóxicos adicionais, uma vez que os receptores farmacológicos específicos são saturados com doses bem inferiores a estas. Os efeitos adversos do abuso dos EAA dependem da idade e sexo dos indivíduos, da duração e exposição total da dose e do tipo de esteróide usado. (Wu, 1997)

O uso dos EAA em longo prazo traz um alto risco de doenças somáticas e efeitos psicológicos adversos, havendo mais comumente envolvimento hepático, endócrino,

cardiovascular, imunológico, reprodutivo e psicológico que podem ser divididos em efeitos virilizantes, feminilizantes e tóxicos, mediados por mecanismos incertos (Evans, 2004). Outros efeitos são relatados, como nos músculo-esqueléticos, necrose avascular da cabeça do fêmur e aumento de lesões músculo-tendíneas (Hatfield, 1986; Laseter, Russell, 1990; Visuri, Lindholm, 1993; Evans et al., 1998).

Alguns casos de ruptura de tendão já foram relatados em associação com os EAA (Kramhoft, Sogaard, 1986; Standart, Bucknell, 1993; Visuri, Lindholm, 1993; Evans et al., 1998). Vários estudos clínicos e em animais sugerem que os efeitos deletérios dos EAA possam atuar sobre as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo do tendão (Karpaka, Pesola, Takala, 1992; Miles et al., 1992; Stannard, Bucknell, 1993). Dosagens supra-fisiológicas de EAA parecem resultar em alterações no metabolismo do colágeno muscular e ósseo (Evans et al., 1998).

A combinação dos EAA com o exercício pode induzir alterações patológicas em tendões (Hatfield, 1986; Michna, 1987; Miles et al., 1992; Motram, George, 2000; Bahrke; Yesalis, 2004) bem como mudanças da morfologia da junção músculo-tendínea (Laseter, Russell, 1990). Outro estudo mostrou a ocorrência de lesão do tendão pelo aparecimento de uma displasia nas fibras de colágeno, com a associação do exercício (10 semanas de corrida) e administração de EAA (Michna, 1987).

De acordo com Inhofe, (1995) na análise de microscopia eletrônica de tendões calcâneos de ratos foi observado que a administração de EAA associada a exercícios não causou alterações no diâmetro ou forma das fibrilas de colágeno, bem como os testes bioquímicos não revelaram nenhuma mudança no sinal de imunofluorescência qualitativa em relação ao colágeno tipo III e fibronectina. Porém, os testes biomecânicos mostraram aumento da rigidez, menor absorção de energia e menor alongamento dos tendões.

O tendão calcâneo de ratos tratados com EAA (decanoato de androlona e estanozolol) associado a exercício (corrida, 1,8 Km/h, 8 graus de inclinação, durante 30 minutos, 5 dias/semana, durante 6 semanas) indicaram em microscopia eletrônica um aumento das fibras de colágeno, e quanto às propriedades biomecânicas, observaram aumento da rigidez e menor alongamento (Miles et al., 1992). Uma explicação é a de que administração de EAA associada a exercícios pode aumentar a área de secção transversa e reduzir a flexibilidade dos tendões pela diminuição do limite de alongamento e aumento da rigidez na região. A força máxima que o tendão pode suportar parece não ser afetada. Porém, a energia que o tendão pode absorver antes da falha é diminuída devido à redução da flexibilidade (Miles et al., 1992). O aumento da ocorrência de lesões nos tendões pode resultar de um desenvolvimento insuficiente destes com relação ao rápido aumento de força do músculo e, quando o sujeito aumenta a intensidade e a frequência do treinamento, pode sofrer alto risco de ruptura de acordo com os casos publicados (Shahidi, 2001; Battista et al., 2003; Maravelias et al., 2005). O aumento da força é muito maior no músculo do que nos tendões, pois os ganhos de massa muscular são maiores quando o uso de EAA é combinado com treinamento de força em comparação com o uso de EAA sozinho (Mottran, George, 2000; Basaria, Wahlstrom, Adrian 2005). O EAA aumenta o número de mionúcleos e o exercício de força parece aumentar também o número de sítios receptores androgênicos no músculo (Hartgnes, Kuipers, 2004; Casavant et al., 2007; Kadi, 2008).

Adicionalmente, os EAA podem inibir a síntese de colágeno tanto em ligamentos quanto em tendões, e induzir mudanças no arranjo das fibrilas de colágeno, levando a alterações críticas da plasticidade tendínea (Karpakka et al., 1992; Evans et al., 1998).

Por outro lado, Fontana e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da mesterolona (um EAA de via oral) associada à corrida intensa (6 semanas, 5 dias/semana, com média de 15,82 m/min e 45,8 min/dia) no remodelamento do tendão calcâneo de ratos e observaram a

combinação de combinado mesterolona com o exercício aeróbico intenso estimula a síntese de proteínas colágenas e de proteínas não colagênicas, bem como o aumento da concentração de hidroxiprolina, do diâmetro e da área das fibrilas de colágeno. A densidade de fibroblastos também se mostrou aumentada em animais treinados, tratados ou a associação de ambos.

Neste contexto, fica evidente que os estudos realizados com EAA tanto em animais quanto em humanos ainda são controversos. No entanto, o uso abusivo dos EAA ainda é um grande problema, refletindo seus efeitos negativos sobre o organismo, em especial sobre o sistema músculoesquelético, porém neste último, com mecanismos de ação pouco esclarecidos e explorados. Assim, este trabalho apresenta importante contribuição à literatura científica, uma vez que houve a preocupação em analisar os efeitos do decanoato de nandrolona associado a um programa de exercício de carga em três tendões diferentes dividindo-os em regiões.

Em um trabalho prévio, Marqueti e colaboradores (2006) mostraram que os EAA e/ou EAA associado ao exercício de carga reduziu a atividade de metalopeptidase-2 (MMP-2) em tendões calcâneos de ratos, e alterou a estrutura tendínea. Em contra partida, o exercício de carga promoveu aumento da atividade da MMP-2 juntamente com adaptações estruturais e funcionais. Este estudo forneceu subsídios fundamentais para estimular o uso desse modelo experimental adaptado e investigar outras variáveis em diferentes tendões. As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio (Ca^{++}) ou zinco (Zn^{++}) que desempenham um importante papel na degradação e remodelamento da ECM (George, Dwivedi, 2004; Ortega et al., 2004; Collins et al., 2005). A família de MMPs compreende pelo menos 23 membros nos seres humanos que são reguladas ao nível da transcrição gênica, ativação enzimática e inibição por inibidores teciduais de MMPs (TIMP). Em condições normais, as MMPs estão presentes em níveis baixos, geralmente em forma latente, e são ativadas para manter o

remodelamento fisiológico do tecido (Mott, Werb, 2004; Jones et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007). A degradação do colágeno é iniciada no meio extracelular pelas MMPs, particularmente pela MMP-2 e -9 (Kjær, 2004).

Assim, a principal hipótese deste trabalho foi a de que o exercício de carga poderia ser capaz de modular e adaptar a morfologia, propriedades bioquímicas e biomecânicas e a expressão de genes envolvidos no remodelamento do TC, TFS e TFP. Por outro lado, espera-se ainda que essa adaptação molecular, estrutural e funcional, seja prejudicada pelo uso de esteróides anabolizantes. Este estudo acrescenta ainda informações sobre o comportamento dessas diferentes regiões mediante o exercício de carga e também em animais sedentários.

Deste modo, o principal objetivo do presente estudo foi verificar as alterações morfológicas, bioquímicas e biomecânicas, bem como avaliar a regulação dos principais genes que atuam no remodelamento do tecido tendíneo, nas regiões proximal e distal do TC, proximal, intermediária e distal do TFS e TFP, quando aplicado exercício de carga progressivo e/ou a associação do esteróide anabólico decanoato de nandrolona.

1.4 Contextualização do modelo experimental utilizado

O exercício de salto vertical na água utilizado nesse trabalho foi baseado no modelo proposto por Silva et al., (1999), com algumas modificações. Esses autores utilizaram um programa de exercício anaeróbio para estudar os efeitos na gordura sérica e tecidual de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Esse programa consistiu de 4 sessões de 10 saltos cada, intercalados por 1 minuto de repouso, cinco dias por semana, em tanques contendo água a $32^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com uma sobrecarga de 50% do peso corporal dos animais. Esses autores encontraram

que esse tipo de exercício diminuiu significativamente a gordura tecidual e os níveis séricos de colesterol no excesso de gordura da dieta.

Cunha et al., (2005) utilizaram também um modelo de salto semelhante para analisar a concentração de triglicerídeos no plasma, o conteúdo de glicogênio no fígado e no músculo esquelético antes e após o exercício, com e sem o uso de EAA (dos esteróides anabólicos androgênicos). Eles relataram que houve aumento no conteúdo de glicogênio do fígado após o treino o que é importante uma vez que esse órgão é responsável pela manutenção da glicemia durante o exercício. Não houve influência da administração de EAA nesse parâmetro.

Não houve alteração no conteúdo de glicogênio no músculo sóleo com o exercício. Porém, a administração de EAA aumentou o conteúdo de glicogênio nesse músculo. Na porção branca do músculo gastrocnêmio, o qual possui predominantemente fibras musculares glicolíticas, houve aumento na concentração de glicogênio com o exercício. Eles encontraram ainda uma redução significativa dos níveis de triglicerídeos no plasma em resposta ao exercício de alta intensidade, sugerindo que a oxidação dos ácidos graxos no período de recuperação após esse tipo de exercício é provavelmente influenciado pelo baixo conteúdo de glicogênio no fígado após o treino (Cunha et al., 2005).

Nosso grupo de pesquisa tem adotado esse modelo para analisar as alterações em tendões e músculos envolvidos nesse tipo de exercício, concomitantemente, para investigar também os efeitos da administração supra-fisiológica EAA. De acordo com Triplett et al., (2009), o salto vertical é muito usado no treinamento de atletas para aumentar a força muscular da perna. Além disso, tem a vantagem de ser menos lesivo que o treino em solo. Ademais, esse modelo faz com que o animal “utilize” os tendões propostos no estudo, resultando numa melhor especificidade do treinamento. No caso, o salto com carga requer o uso dos músculos flexores (posteriores) da pata e seus respectivos tendões. Assim no primeiro

trabalho, Marqueti et al., (2006) encontraram um aumento significativo na atividade da metalopeptidase de matriz (MMP-2) no tendão calcâneo (TC) de ratos que realizaram esse exercício (4 séries/10 saltos, 30 segundos de repouso entre as séries, 5 dias/semana, 5 semanas, carga de 50 a 70% do peso corporal do animal). Sabe-se que a MMP-2 é uma das enzimas dessa família mais importante para o remodelamento tendíneo (Kjaer, 2004). Assim, e esse achado indicou que em resposta a demanda mecânica do exercício de carga o TC mostrou uma boa adaptação. Porém, a administração de esteróides anabolizantes reduziu a atividade da MMP-2 no TC acarretando um remodelamento prejudicado. Dessa forma, para compreender melhor esses achados, um novo estudo foi proposto para avaliar o remodelamento de três tendões diferentes (TC, TFS e TFP) dividindo-os em regiões e associando novamente a administração de EAA. Nesse trabalho o modelo de salto passou por pequenas modificações em comparação com o de Marqueti et al. (2006). Assim, o modelo consistiu de 4 séries/10 saltos, 30 segundos de repouso entre as séries, 5 dias/semana, 7 semanas, carga de 50 a 80% do peso corporal do animal. Essa proposta deu origem aos trabalhos apresentados nessa tese. Dois deles já publicados (Marqueti et al., 2008a, Marqueti et al., 2008b), um artigo está submetido (Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise) e dois manuscritos estão em fase de redação (Análise morfológica de diferentes regiões de tendões de ratos após exercício de carga e administração de esteróides anabólicos androgênicos; Expressão gênica em diferentes regiões de tendões de ratos submetidos a exercício de carga associado à administração de decanoato de nandrolona).

Paralelo a esse trabalho, outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa foi desenvolvido com o objetivo de analisar a expressão gênica do VEGF do músculo sóleo de ratos com a administração suprafisiológica de decanoato de nandrolona, associando ao exercício de carga na água (Paschoal et al., 2009). Esses autores, relatam que o treinamento de salto com carga na água promoveu aumento na expressão do RNAm de VEGF, enquanto que

o salto com carga quando combinado com a administração de decanoato de nandrolona, inibe a expressão do RNAm de VEGF.

Malheiro et al., (2009), recentemente compararam 2 modelos de exercício (salto vertical com carga na água e corrida em esteira inclinada) e avaliaram a atividade da MMP-2 e histologia nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo. Na região proximal a MMP-2-pro e ativa aumentaram com o salto vertical, mas somente a MMP-2-pro aumentou após esteira rolante. Na região distal, apesar de tanto o salto vertical quanto a corrida aumentarem a atividade da e MMP-2- pró e ativa, a corrida aumentou a MMP-2 ativa cerca de 11 e 8 vezes após 1 e 4 dias de treinamento respectivamente. Os achados histológicos mostraram aumento também da vascularização em resposta aos modelos de exercícios utilizados, bem como da celularidade e espessura da camada peritendínea no tendão calcâneo de ratos após 1 dia de salto vertical e 4 dias de corrida em esteira.

Para compreender melhor como o rato executa o exercício salto na água, foi realizada a gravação de um vídeo. Observamos que quando o animal está se preparando para saltar ambas as patas ficam apoiadas no solo com os joelhos em flexão. De acordo com Komi (1984) essa postura é importante para que os músculos posteriores da pata (flexores) fiquem relaxados e armazenem energia elástica necessária para a execução do salto, esta é chamada fase excêntrica do movimento. Em seguida, o animal inicia a fase concêntrica, os joelhos se estendem juntamente com a flexão plantar. Nesta etapa, o calcâneo é o primeiro a deixar o solo enquanto os dedos são os últimos. Ocorre uma flexão dos dedos das patas assim que deixam o solo por completo (*toe-off*). Na fase de aterrissagem, os dedos, bem estendidos agora são os primeiros a tocar o solo seguido pelo calcâneo e por fim toda a pata se acomoda.

Os detalhes do salto podem ser visualizados no site abaixo:

<http://www.megaupload.com/?d=IAHECCIU>

2 OBJETIVOS



Botanisk Have - Copenhagen - Dinamarca

2.1 Objetivo geral

- Investigar os efeitos do exercício de carga associado ou não ao decanoato de nandrolona sobre o remodelamento e função do tendão calcâneo (TC), tendão flexor profundo (TFP) e tendão flexor superficial (TFS) de ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o remodelamento tecidual pela atividade de MMPs.
- Analisar as propriedades biomecânicas do TC, TFS e TFP.
- Analisar a organização tecidual por meio de análises histológicas.
- Avaliar o conteúdo de colágeno por meio da dosagem de hidroxiprolina.
- Analisar os efeitos dos EAA sobre a expressão gênica de colágeno tipo I e III, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 e IGF-a

Este trabalho deu origem a 2 artigos já publicados, 1 manuscrito submetido que encontra-se na segunda revisão, além de 2 manuscritos em fase de redação.

3 REFERÊNCIAS

- Bahrke MS, Yesalis C Abuse of androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol* 4:614-620, 2004.
- Banos CC, Thomas AH, Kuo CK. Collagen fibrillogenesis in tendon development: Current models and regulation of fibril assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today* 84: 228-44, 2008.
- Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs A Anabolic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *Curr Opin Pharmacol* 86: 5108-5117, 2001.
- Benjamin M, Kaiser E, Milz S. Structure-function relationships in tendons: a review *J Anat* 212: 211 – 28, 2008.
- Benjamin M, Ralphs JR. Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol* 233: 1-45, 2004.
- Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat* 193: 481-94, 1998.
- Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat* 208: 471-490, 2006.
- Binkley, J. Overview of ligament and tendon structure and mechanics: Implications for clinical practice. *Physiother Canada* 41: 24-30, 1989.
- Birch HL, Worboys S, Eissa S, Jackson B, Strassburg S, Clegg PD. Matrix metabolism rate differs in functionally distinct tendons. *Matrix Biol* 27: 182 – 189, 2008.
- Boushel R, Langberg H, Olesen J, Nowak M, Simonsen L, Bülow J, Kjaer M. Regional blood flow during exercise in humans measured by near-infrared spectroscopy and indocyanine green. *J Appl Physiol* 89: 1868-78, 2000.
- Buchanan CI, Marsh RL. Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Com. Biochem. Phys A.* 133: 1101 – 1107, 2002.
- Carvalho HF, Vidal BC The Elastic system of a pressure bearing tendon of the bullfrog. *Ann Anat* 177: 297 – 404, 1995b.

- Carvalho HF. Understanding The Biomechanics Of Tendon Fibrocartilages. *Journal of Theoretical Biology* 172: 293 – 297, 1995a.
- Casavant MJ, Blake K, Griffith J, Yates A, Copley LM. Consequences of use of anabolic androgenic steroids. *Pediatr Clin N Am* 54: 677–690, 2007.
- Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol Ther* 70: 163 – 182, 1996.
- Celotti F, Cesi CP. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 469-477, 1992.
- Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 911-920, 2009.
- Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1793: 911-20, 2009.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1085-1089, 2004.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159, 1987.
- Clegg PD, Strassburg S, Smith RK. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *Int J Exp Pathol* 88: 227-35, 2007.
- Collins JM, Ramamoorthy K, Silveira A, Patston P, Mao JJ. Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses. *J Biomech* 38:485-492, 2005.
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF. Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cel* 33: 483-490, 2001.
- Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. Influence of high-intensity training and anabolic steroids treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sciences*, 77: 1030 – 1043, 2005.

- Evans NA Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sport Med* 32: 534-538, 2004.
- Evans NA, Bowrey DJ, Newman GR. Ultrastructural analysis of ruptured tendon from anabolic steroid users. *Injury* 29: 769–773, 1998.
- Fontana K, Almeida FM, Tomiosso TC, Pimentel ER, da Cruz Höfling MA. Effect of high intensity aerobic exercise and mesterolone on remodeling of Achilles tendon of C57BL/6 transgenic mice. *Cell Tissue Res* 2009.
- Franchi M, Trirè A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *The Scientific World Journal* 7: 404-420, 2007a.
- 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* 210: 1-7. 2007b.
- George SJ, Dwivedi A MMPs, cadherins, and cell proliferation. *TCM* 14:100-105, 2004.
- Hansen KA, Weiss JA, Barton JK. Recruitment of tendon crimp with applied tensile strain. *J Biomech Eng* 124 : 72–77, 2002.
- Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 34: 513-554, 2004.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F , Schjerling P, Baldwin KM, Kjaer M. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J Appl Physiol* 106: 178–186, 2009.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, Schjerling P. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol* 582: 1303–1316, 2007a.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM, Kjaer M. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol* 102: 573–581, 2007b.
- Hishikawa K, Oemar BS, Nakaki T. Static pressure regulates connective tissue growth factor expression in human mesangial cells. *J Biol Chem* 276: 16797–16803, 2001.

- Inhofe PD, Grana WA, Egle D, Min KW, Tomasek J. The effects of anabolic steroids on rat tendon. An ultrastructural, biomechanical, and biochemical analysis. *Am J Sport Med* 23: 227-232, 1995.
- Järvinen TA, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Hurme T, Kvist M, Peltö-Huikko M, Kalimo H, Järvinen M. Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. *J Cell Sci* 116: 857-66, 2003.
- Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM, Hazleman BL, Riley GP. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. *Arthritis and Rheum* 54:832-842, 2006.
- Józsa L, Kannus P, Balint BJ, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat* 142: 306–312, 1991.
- Kadi F. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *British Journal of Pharmacology* 154: 522–528, 2008.
- Kadler K. Extracellular matrix 1: Fibril-forming collagens. *Protein Profile* 2: 491-619, 1995.
- Kannus, P, Structure of the tendon connective tissue. *Scand. J. Med Sci Sports* 10: 312-320, 2000.
- Karpakka JA, Pesola MK, Takala TE The effects of anabolic steroids on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. A preliminary report. *Am J Sport Med* 20: 262-266, 1992.
- Ker RF. The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Phys* 133: 987-1000, 2002.
- Kjær M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to Mechanical loading. *Physiol Rev* 84: 49-698, 2004.

- Komi, PV. Physiological and Biomechanical Correlates of Muscle Function: Effects of Muscle Structure and Stretch-Shortening Cycle on Force and Speed. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 12: 81-122, 1984.
- Koob TG, Summers AP. Tendon – bridging the gap. *Comp Biochem Phys A* 133: 905-909, 2002.
- Kramhøft M, Solgaard S. Spontaneous rupture of the extensor pollicis longus tendon after anabolic steroids. *J Hand Surg Br* 11:87, 1986.
- Kuhn, C.M. Anabolic steroids. *Recent Prog. Horm. Res* 57: 411–434, 2002.
- Kutscher EC, Lund BC, Perry PJ. Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports Med* 32: 285-96, 2002.
- Labre MP. Adolescent boys and the muscular male body ideal. *J. Adolescent Health*. 2002; 30:233-242
- LaBree M. A review of anabolic steroids: uses and effects. *J Sports Med Phys Fitness*. 31: 618-626, 1991.
- Langberg H, Skovgaard D, Petersen LJ, Bulow J & Kjaer M Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 521: 299–306, 1999.
- Laseter JT, Russel JA. Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 23: 1-3, 1991.
- Maganaris CN, Paul J. Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon. *J Biomech* 35: 1639 -1646, 2002.
- Magnusson SP, Hansen P, Kjær M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Méd Sci Sports* 13: 211-223, 2003.
- Malheiro OCM, Giacomini CT, Justilin LA, Delella FK, Dal-Pai-Silva M, Felisbino SL. Calcaneal tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running. *Anat Rec* 292: 1656-1662, 2009.

- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicol Lett* 158:167-175, 2005.
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am. J. Sport Med* 34: 1274-1280, 2006.
- Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF, et al. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol*.104:1087-93, 2008a.
- Marqueti RC, Prestes J, Stotzer US, Paschoal M, Leite RD, Perez SE, Selistre de Araujo HS. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med*. 29: 559-63, 2008b.
- Michna H. Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int. Orthop* 11: 157-162, 1987.
- Miles JW, Grana WA, Eagle D, et al. The effect of anabolic steroid on the biomechanical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint Surg Am* 74:411-422, 1992.
- Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16:558-564, 2004.
- Mottram DR, George AJ Anabolic steroids. *Baillière's best practice and research. Bailliere Clin Endoc Met* 14: 55-69, 2000.
- Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14: 86-94, 2004.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrimetalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*; 8:221-233, 2007.
- Provenzano PP, Vanderby R Jr. Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol* 25: 71-84, 2006.

- Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN. The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* 15: 211-22, 2005.
- Rees SG, Dent CM, Caterson B. Metabolism of proteoglycans in tendon. *Scand J Med Sci Sports* 19: 470-478, 2009.
- Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem J* 350:181-8, 2000.
- Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)* 43: 131-42, 2004.
- Risteli J, Niemi S, Kauppila S, Melkko J, Risteli L. Collagen propeptides as indicators of collagen assembly. *Acta Orthop Scand Suppl* 266: 183-188, 1995.
- Sarasa-Renedo A, Chiquet M. Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand J Med Sci Sports* 15: 223-230, 2005.
- Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Ther* 23: 1355-1390, 2001.
- Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 8: 235 – 243, 2002.
- Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech* 36: 1529 – 1553, 2003.
- Sjöqvist F, Garle M, Rane A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *Lancet* 371: 1872–82, 2008
- Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. *Eur J Appl Physiol* 86: 48-52, 2001.
- Stannard JP, Bucknell AL. Rupture of the triceps tendon associated with steroid injections. *Am J Sports Med* 21: 482-485, 1993.

- Triplet NT, Colado JC, Benavent J, Alakhdar Y, Madera J, Gonzalez LM, Tella V. Concentric and impact forces of single-leg jumps in an aquatic environment versus on land. *Med Sci Sports Exerc.* 41: 1790-6, 2009.
- Vidal BC, Carvalho HF. Aggregation state e molecular order of tendons as a function of age. *Matrix* 10: 48-57, 1990.
- Vilarta R, Vidal BC. Anisotropic e biomechanical properties of tendons modified by exercise e denervation: aggregation e macromolecular order in collagen bundles. *Matrix* 9:55-61, 1989.
- Visuri T, Lindholm H. Bilateral distal biceps tendon avulsions with use of anabolic steroids. *Med Sci Sport Exerc.* 1994;26:941-944.
- Vogel KG, Koob TJ. Structural specialization in tendon under compression. *Int Rev Cytol* 115: 267-293, 1989.
- Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagen and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16: 457-470, 1998
- Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 39: 1563-1582, 2006.
- Wu FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin Chem* 43:1289-92, 1997.
- Yang G, Crawford RC, Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J Biomech* 37: 1543-1550, 2004.
- Yesalis CE, Bahrke MS. Doping among adolescent athletes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14:25-35, 2000.
- Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5: 22-34, 2005.
- Zajac FE. Muscle and tendon: properties, models, scaling, and application to biomechanics and motor control. *Crit Rev Biomed Eng* 17: 359 -411, 1989.

4 MANUSCRITO I - publicado

Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. Eur J Appl Physiol 104: 1087-93, 2008.



Sankt Anne Plads - Copenhagen - Dinamarca

**ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMP-2) NAS REGIÕES
TENDÍNEAS: EFEITOS DO EXERCÍCIO DE CARGA ASSOCIADO AO
ESTERÓIDE ANABÓLICO ANDROGÊNICO**

Rita C. Marqueti¹, Jonato Prestes¹, Milena Paschoal¹, Oscar H. P. Ramos¹, Sérgio E. A. Perez¹, Hernandes F. Carvalho² e Heloisa S. Selistre-de-Araujo¹

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo; ²Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Título resumido: Exercício e EAA afetam a atividade da MMP-2 em tendões.

Resumo

As metalopeptidases (MMPs) são responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e pelo remodelamento tecidual. Para uma melhor compreensão dos efeitos do EAA no tendão de rato, foi analisada a atividade da MMP-2 nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo (TC) e proximal, intermediária e distal do tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) após exercício de carga associada ao EAA. Os animais foram agrupados em quatro grupos experimentais: animais sedentários (S); animais sedentários com a administração de EAA (S + E); animais treinados (T) e animais treinados com a administração de EAA (T + E). A análise da atividade das MMPs foi realizada por meio da técnica de zimografia. Ambas as regiões proximal e distal do tendão calcâneo apresentaram menor concentração de MMP-2 e a maior proporção de MMP-2 na forma ativa. A região intermediária do TFS diferiu ($p < 0.01$) das regiões proximal e distal com maior % de MMP-2 na forma ativa no grupo sedentário. A proporção de MMP-2 ativa diminuiu na região proximal do TC. O tratamento com EAA reduziu tanto a concentração como a forma ativa da MMP-2 nas três regiões do TFS e na região proximal do TC, porém não houve alteração no TFP. As diferentes respostas relacionadas ao exercício e ao uso do EAA são resultados da disparidade de metabolismo e recrutamento destas regiões tendíneas.

Palavras-chave: metalopeptidases de matrix (MMPs), tendão, esteróides anabólico-androgênicos (EAA), treinamento.

Introdução

Os tendões são estruturas especializadas, responsáveis pela transmissão das forças do músculo para o osso (Carvalho et al., 2000; Ker, 2002; Koob e Summers, 2002; Maganaris e Paul, 2002; Ritty e Herzog, 2003). Os fibroblastos monitoram a magnitude e a direção da força (Koob e Summers, 2002), a síntese e manutenção de elementos da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno, proteoglicanos (PGs) e outros componentes (Magnusson et al., 2003). A maioria dos tendões é pobre em número de células e a força é transmitida por meio de uma matriz densa de fibras de colágeno tipo I, que estão alinhadas ao longo do eixo de força e apoiadas por PGs e outras proteínas não colagenosas (Ritty e Herzog, 2003). A composição dos tendões varia de acordo com vários fatores, incluindo estágio de desenvolvimento, de carga mecânica e envelhecimento (Carvalho, 1995, Carvalho et al., 2006).

Os tendões exibem uma variedade de propriedades, como resistência a tração, a lesão local e reparo de rupturas, bem como a capacidade de modular a sua composição após a aplicação da carga mecânica (Carvalho, 1995). Além disso, os tendões possuem uma região fibrocartilaginosa (entese) adaptada para resistir às forças perpendiculares (Vogel e Koob, 1989). Distintas regiões nos tendões respondem de forma diferente a carga mecânica, o que incentivou o estudo das propriedades da MEC tendínea (Carvalho e Vidal, 1995; Waggett et al., 1998). Algumas regiões do tendão têm alta quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs), o que permite a este tecido suportar grandes quantidades de forças de compressão (Evanko e Vogel, 1990).

A manutenção da integridade da matriz envolve a síntese e degradação dos componentes da MEC, incluindo colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (González et al., 2002). A expressão de enzimas proteolíticas é essencial para

o remodelamento tecidual (Stannard e Bucknell, 1993). As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio (Ca^{++}) ou zinco (Zn^{++}) que desempenham um importante papel na degradação e remodelamento da ECM (George e Dwivedi, 2004; Ortega et al., 2004, Collins et al., 2005). A família de MMPs compreende pelo menos 23 membros nos seres humanos que são reguladas ao nível da transcrição gênica, ativação enzimática e inibição por inibidores teciduais de MMPs (TIMP). Em condições normais, as MMPs estão presentes em níveis baixos, geralmente em forma latente, e são ativadas para manter o remodelamento fisiológico do tecido (Mott e Werb, 2004; Jones et al. 2006; McCaw et al., 2007). A degradação do colágeno é iniciada no meio extracelular pelas MMPs, particularmente pela MMP-2 e -9 (Kjær, 2004). Um aumento da forma pró da MMP-2 foi descrito para em tendão de homens três dias após a execução do exercício (Koskinen et al., 2004). Além disso, o estiramento mecânico aumenta a expressão gênica das MMPs, resultando em elevadas concentrações de MMP-2 e MMP-9 no meio intersticial no tecido peritendinoso humano (Kjær, 2004).

Os fibroblastos sintetizam e degradam a MEC nos tendões, um processo de renovação tecidual que é importante na resposta do tecido ao exercício, carga mecânica e após lesão (Riley, 2005). No entanto, o uso de esteróides anabólico-androgênicos (EAA) inibe fortemente este remodelamento tecidual (Marqueti et al., 2006). Doses supra-fisiológicas de EAA resultam em alterações musculares, ósseas e do metabolismo tendíneo (Pärssinen et al., 2000). Os EAA são usados como ergogênicos por atletas e não atletas para melhorar o desempenho, aumentando o tamanho e a força muscular. Altas concentrações de EAA, bem como o seu uso periódico para o aumento de *performance* podem levar a danos graves e irreversíveis a diversos órgãos (Maravelias et al., 2005). A combinação de EAA e exercício induzem alterações deletérias no tendão, como a presença de displasia fibrilar (Michna 1986; Michna 1987; Miles et al., 1992; Inhofe et al., 1995; Mottram e George , 2000, Pärssinen et al., 2000; Bahrke e Yesalis, 2004). Essa alteração estrutural resulta em aumento da rigidez do

tendão e perda de elasticidade, de modo que tendão torna-se mais propenso à ruptura (Wood et al., 1988; Miles et al., 1992; Inhofe et al., 1995; Laseter e Russel, 1991; Evans, 2004). As injeções de EAA são frequentemente associadas às rupturas de tendões (Stannard e Bucknell, 1993) e ligamentos (Freeman e Rooker, 1995). O tratamento com EAA também compromete a síntese de colágeno nos músculos e tendões (Karpakka et al., 1992).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que o remodelamento do tendão de rato pode ser prejudicado, devido a diminuição da atividade da MMP-2, quando dois tipos de EAA estão associados (DecaDurabolin e Durateston), com ou sem a associação de exercício de carga (Marqueti et al., 2006). A MMP-2, também conhecida como gelatinase-A, ou colagenase tipo IV de 72kDa, pode ser transformada em uma forma ativa de 62kDa. A MMP-2 regula a integridade da MEC e a composição dos tendões (Kjær, 2004).

No entanto, as células e componentes da MEC não são igualmente distribuídos em diferentes regiões dos tendões. Dessa forma, seria interessante determinar se essas regiões são afetadas de forma diferente pelo treinamento e / ou pelo tratamento com EAA. Além disso, o conhecimento da atividade da MMP-2 em diferentes regiões do tendão pode ser útil na compreensão da adaptação de longo prazo do tendão ao exercício. Portanto, neste trabalho avaliou-se a presença de MMP-2 e sua forma ativa nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo (TC), e proximal, intermediária e distal regiões superficial (TFS) e tendões flexores profundos (TFP) em ratos, associando EAA e um protocolo de exercício de salto de alta intensidade. Os resultados demonstraram que a atividade da MMP-2 em distintas regiões do tendão é afetada de maneira diferente por estes dois tratamentos e que estes tendões e suas regiões desempenham papéis distintos na adaptação fisiológicos ao exercício.

Material e métodos

Animais: Quarenta ratos (*Wistar novergicus albinus*, pesando aproximadamente ± 200 g, no início do experimento) foram agrupados em 4 gaiolas de plástico, à temperatura ambiente com luz controlada em ciclo de 12 h (claro escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o guia de pesquisa para o cuidado e utilização de animais de laboratório (National Research Council, 1996). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, processo nº. 002/2006, parecer 004/2006.

Grupos experimentais: Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (10 animais/grupo), na seguinte ordem: sedentários sem suplementação de EAA (S), sedentário com suplementação de EAA (S + EAA), treinado sem suplementação de EAA (T), e exercitado com suplementação de EAA (T + EAA).

Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a um programa de exercício (saltos) em um tubo de plástico 25 centímetros de diâmetro, contendo uma quantidade de água equivalente ao dobro do comprimento do corpo do animal, com temperatura constante de 30 ± 2 ° C. Após a semana de adaptação os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento que consistiu de 7 semanas (5-d/semana).

Administração de EAA: Os animais receberam Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil). Doses de 5 mg/kg de massa corporal (dose suprafisiológica) foram injetadas por via subcutânea na região dorsal dos animais duas vezes por semana. Esta dosagem foi análoga à dosagem freqüentemente utilizada por atletas (Pope, 1988). Os grupos experimentais que não tiveram administração de EAA (S e T) receberam um

veículo apenas com óleo de amendoim e álcool benzílico. O decanoato de nandrolona foi administrado durante 7 semanas com início na primeira semana de treinamento, após a semana de adaptação.

Protocolo de treinamento: Para reduzir o estresse, os animais foram adaptados à água na semana pré-treinamento (semana de adaptação). Esta adaptação consistiu de sessões de levantamento de peso (50% da carga de peso corporal), uma vez por dia durante 5 dias em água a 30 ± 2 °C. A sobrecarga foi fixada no peito do animal, usando um colete adequado que permitia a execução dos saltos sem que a vestimenta caísse do corpo do mesmo. O número de séries (2-4) e repetições (5-10) foi ajustado diariamente e aumentado gradualmente. Todas as sessões sempre foram realizadas no período da tarde, após as 16:00 horas. Após a semana de adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento de saltos, com sobrecarga ajustada de acordo com o peso corporal do animal, como descrito anteriormente (Cunha et al., 2005; Marqueti et al., 2006). O protocolo de saltos consistiu de uma primeira semana de treinamento, em que o animal executou 4 séries de 10 saltos, um período de descanso de 30 segundos entre as séries e sobrecarga de 50% do peso corporal. Durante as seis semanas restantes o treinamento foi executado com o mesmo número de séries (4) e saltos (10) e intervalos de descanso (30 segundos entre as séries), porém, com uma sobrecarga adicional de 5%/semana, chegando a 80% do peso corporal na última semana. Todos os animais foram pesados três vezes/semana.

Preparação do tecido: Após sete semanas experimentais, uma última sessão de treinamento foi realizada antes do sacrifício dos animais. O tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) foram imediatamente dissecados e congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Os tendões (Fig.1) foram divididos em regiões proximal e distal (para o TC) e proximal, intermediária e distal (região para o TFS

e TFP).

Zimografia de gelatina: As amostras dos tendões foram tratados como descrito por (Cleutjens et al. 1995) Os tendões foram homogeneizadas e incubadas em 0,5 ml de tampão de extração (cacodílico ácido 10mM pH 5,0; NaCl 0,15 M; ZnCl₂ 1mM, CaCl₂ 20mM, NaN₃ 1,5 mM; Triton X-100 0,01% [v / v]), a 4 ° C por 24 horas. Após este período a solução foi centrifugada (10 min., 13.000xg a 4 ° C). Amostras contendo um *pool* de cinco regiões individuais de cada tendão foram concentradas com 10 microgramas de proteínas totais. As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de policrilamida contendo SDS 10% e gelatina na concentração final de 1mg/ml. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes em 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS e incubados em tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0; de CaCl₂ 5mM e NaN₃ 0,02%) a 37 ° C por 20 h. Os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) por 1 ½ h e descorados com ácido acético: metanol: água (1:4:5, v: v: v). A atividade gelatinolítica foi visualizada como faixas claras no gel corado. Os géis foram fotografados com uma Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels e as médias de intensidade das bandas foram analisadas utilizando o software *Gene Tools*. Os dados estão expressos como a concentração da MMP-2 (ou seja, a totalidade da densidade óptica integrada para a MMP-2 pró-enzima, intermediária e ativa) e forma ativa da MMP-2.

A análise estatística dos dados: Os resultados foram submetidos aos testes de homogeneidade (Teste de Levene) e normalidade. Em seguida, foi aplicada análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet, comparação com o controle (sedentários) e pelo teste de Tukey para detectar as diferenças entre os diferentes grupos. O nível de significância mínimo estabelecido foi de 5%. O pacote de software utilizado foi o Minitab 14.1.

Resultados

A atividade proteolítica das regiões proximal, intermediária e distal do TFS e TFP, e as regiões proximal e distal do TC foram analisadas por zimografia em gel de gelatina SDS-PAGE (Fig. 2A-C) e quantificadas por densitometria das bandas (Figs. 3 e 4).

Concentração e atividade da MMP-2: comparação entre as regiões dos tendões no grupo sedentário

Não houve variação na concentração total de MMP-2 entre as diferentes regiões de cada tendão analisados neste estudo nos animais sedentários (Fig. 3A). No entanto, a % de MMP-2 na forma ativa foi significativamente menor nas regiões proximais e distais do TFS em comparação com a região intermediária (Fig.3B). A atividade da MMP-2 destas regiões do TFS também foi menor do que a atividade nas regiões do TFP e do TC.

Concentração e atividade da MMP-2 nas regiões do tendão: comparação entre os grupos experimentais

Efeito do treinamento: O único efeito estatisticamente significativo do treinamento (grupo T) sobre a concentração total de MMP-2 foi observado na região proximal do TFS (Fig. 4a). Por outro lado, o treinamento aumentou a atividade da forma ativa da MMP-2 em todas as regiões do TFS (embora não seja estatisticamente significativa para a região proximal) (Fig. 4a-c). O efeito oposto foi observado na região proximal do TC, onde a atividade da MMP-2 foi reduzida quando comparado ao grupo S (Fig. 4g). A forma ativa da MMP-2 nas três regiões da TFP (Fig. 4d-f) e na região distal do TC (Fig. 4h) não se alterou em resposta ao treinamento.

Efeito do EAA: a administração do EAA nos animais sedentários (S + EAA) reduziu a atividade da forma ativa da MMP-2 nas três regiões do TFS (Fig. 4a-c). Este efeito também

foi observado para a região proximal do TC (Fig. 4g), sendo que essa região foi a única em que a concentração total de MMP-2 diminuiu em resposta ao tratamento com EAA (Fig. 4g).

EAA associado ao treinamento: Os resultados obtidos com a administração de EAA associado ao treinamento (T + EAA) foram semelhantes aos observados após tratamento dos animais sedentários. Houve uma tendência para uma queda da concentração total de MMP-2 para as regiões proximal, intermediária e distal de ambos os TFS e TFP (Fig. 4a-f). Uma redução significativa foi observada para a forma ativa da MMP-2 nas três regiões do TFS e para a região distal da TFP. A região proximal do TC apresentou comportamento semelhante (Fig. 4g), enquanto a região distal do TC não demonstrou diferença significativa (Figura 4h).

Discussão

As distintas regiões dos tendões estudados no presente trabalho diferem na sua morfologia e estrutura geral. A região intermediária do TFS e a região distal do TC circundam extremidades ósseas e são, presumivelmente, submetidos a altos níveis de forças de compressão e atrito do que a outras regiões do tendão (Covizi et al., 2001). Estruturalmente, a região intermediária do TFS é achatada e menos flexível do que a região proximal e distal (Covizi et al., 2001). Além dessas diferenças estruturais, existem também diferenças no conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados e elastina (Covizi et al., 2001). Assim, a hipótese desse estudo foi que as diferentes regiões dos tendões TFS, TFP e TC diferem em sua resposta a estímulos mecânicos e hormonais, no caso a administração de EAA. Essas diferenças são provavelmente um resultado da diferença na morfologia e fisiologia das regiões dos tendões, bem como do distinto recrutamento dos mesmos durante o exercício de salto. No presente estudo, o TFS respondeu mais rapidamente ao exercício, em uma clara

associação do músculo flexor superficial dos dedos para saltar, enquanto que a TFP está associado com o movimento das partes distais dos dígitos.

Tem sido bem demonstrado que o exercício físico aumenta a síntese de colágeno tipo I no tecido conjuntivo peritendíneo do TC em humanos (Kjær, 2004; Koskinen et al., 2004). Considerando que a concentração total da MMP-2 e % de forma ativa foram aumentadas no TFS em resposta ao exercício, é possível considerar que o aumento do remodelamento e do *turnover* da MEC está associado a uma resposta adaptativa dos tendões ao exercício. O TFS também respondeu mais rapidamente ao tratamento com EEA e isso pode estar relacionado com uma maior densidade de células neste tendão, em comparação com a predominância da MEC no TFP e TC. No entanto, mais detalhes sobre a fisiologia destes três tendões são necessários para uma melhor compreensão de suas respostas ao exercício e tratamento EEA.

O aumento na atividade das MMPs está associado à degradação da MEC e aumento do remodelamento tecidual (Koskinen et al., 2004; Riley, 2005; Riley et al., 2002). Assim, o exercício de carga aumentou significativamente a atividade da MMP-2 no tendão calcâneo, sugerindo que o remodelamento tecidual foi provavelmente aumentado para permitir a adaptação do tendão em resposta à demanda mecânica (Marqueti et al., 2006).

Marqueti e colaboradores (2006) também demonstraram uma diminuição significativa na atividade de MMP-2 no TC associado à administração do EEA. Além disso, foi observado que o somente treinamento aumentou a atividade da MMP, mas este efeito foi inibido quando o treinamento foi associado à administração de EEA. Da mesma forma, no presente estudo, a associação do treinamento ao EEA reduziu a forma ativa da MMP-2 em todas as regiões do TFS e na região proximal do TC, porém não foi observada diferença significativa no TFP. Dessa forma, esse estudo demonstrou que há uma evidente diferença entre as respostas dos tendões como um todo e de suas regiões específicas ao exercício e ao tratamento com EEA.

O presente estudo demonstrou claramente que a adaptação dos tendões e de diferentes regiões à carga mecânica e ao uso do EAA envolve a regulação da MMP-2. O treinamento físico aumentou a atividade da forma ativa da MMP-2 tendínea, e isso demonstrou uma ativação do remodelamento tecidual. No entanto, o uso do EEA não somente causou uma redução de MMP-2, mas também inibiu o efeito do treinamento de salto, o que sugere uma redução do remodelamento do tendão. Não está claro como o EAA modula a ativação da MMP-2. A presença de elementos andrógenos responsivos (*androgen responsive elements*-ARES) no promotor gênico da MMP-2 de células humanas (Li et al., 2007) acrescenta subsídios teóricos à compreensão de como a expressão gênica da MMP-2 é regulada, e fornece a explicação de que a inducibilidade androgênica não é provida pela seqüência característica *cis*-regulatória relacionada a transcrição constitutiva (Liao et al., 2003; Yang e Boyd, 2007). A controvérsia entre a regulação da expressão gênica da MMP-2 e a regulação negativa promovido pelo EAA, como observado no presente trabalho, pode ser explicado por uma possível ação antiinflamatória do EAA que tanto trans-regula a expressão de MMP-2 e previne a migração de células inflamatórias para o tendão. No entanto, essa hipótese ainda precisa ser testada.

Com base nos resultados do presente estudo, tornou-se claro que a administração abusiva de EAA, em associação com o exercício de carga pode resultar em efeitos colateral graves, além de comprometer a capacidade do sistema músculo esquelético em se adaptar ao exercício de carga. Este efeito nos tendões é provavelmente um reflexo da resposta anabólica atrasada neste tecido em relação à alta vascularização e resposta androgênica no músculo esquelético.

Referências

- Bahrke MS, Yesalis C (2004) Abuse of androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol* 4:614-620.
- Carvalho HF (1995) Understanding the biomechanics of tendon fibrocartilages. *Journal of Theoretical Biology* 172:293-297.
- Carvalho HF, Vidal BC (1995) The Elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog. *Ann Anat* 177:397-404.
- Carvalho HF, Felisbino SL, Covizi DZ, Della Colleta HH, Gomes L (2000) Structure and proteoglycan composition of specialized regions of the elastic tendon of the chicken wing. *Cell Tissue Res* 300: 435–446.
- Carvalho HF, Felisbino SL, Keene DR, Vogel KG (2006) Identification, content, and distribution of type VI collagen in bovine tendons. *Cell Tissue Res* 325:315-324
- Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT (1995) Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27:1281-1292.
- Collins JM, Ramamoorthy K, Silveira A, Patston P, Mao JJ (2005) Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses. *J Biomech* 38:485-492.
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF (2001) Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell* 33:483-490.
- Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK (2005) Influence of high-intensity training and anabolic steroids treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci* 77:1030-1043.

- Evanko SP, Vogel KG (1990) Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous region of bovine tendon. *Matrix* 10:420-436.
- Evans NA (2004) Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sport Med* 32:534-538.
- Freeman BJ, Rooker GD (1995) Spontaneous rupture of the anterior cruciate ligament after anabolic steroids. *Br J Sports Med* 29:274-275.
- George SJ, Dwivedi A (2004) MMPs, cadherins, and cell proliferation. *TCM* 14:100-105.
- González A, López B, Querejeta R, Díez J (2002) Regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in hypertension heart disease? *J Mol Cell Cardiol* 34:1585-1593.
- Inhofe PD, Grana WA, Egle D, Min KW, Tomasek J (1995) The effects of anabolic steroids on rat tendon. An ultrastructural, biomechanical, and biochemical analysis. *Am J Sport Med* 23:227-232.
- Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM, Hazleman BL, Riley GP (2006) Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human Achilles tendon. *Arthritis and Rheum* 54:832-842.
- Karpakka JA, Pesola MK, Takala TE (1992) The effects of anabolic steroids on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. A preliminary report. *Am J Sport Med* 20:262-266.
- Ker RF (2002) The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Phys* 133:987-1000.
- Kjær M (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to Mechanical loading. *Physiol Rev* 84:49-698.

- Koob TG, Summers AP (2002) Tendon – bridging the gap. *Comp Biochem Phys* 133: 905-909.
- Koskinen SOA, Heinemeir KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M (2004) Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Phys* 96:861-864.
- Laseter JT, Russel JA (1991) Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 23:1-3.
- Li BY, Liao XB, Fujito A, Thrasher JB, Shen FY, Xu PY (2007) Dual androgen-response elements mediate androgen regulation of MMP-2 expression in prostate cancer cells. *Asian J Androl* 9:41-50.
- Liao X, Thrasher B, Pelling J, Holzbeierlein J, Sang QX, Li B (2003) Androgen stimulates matrix metalloproteinase-2 expression in human prostate cancer. *Endocrinology* 144:1656-1663.
- Maganaris CN, Paul J (2002) Tensile properties of the in vivo human gastrocnemius tendon. *J Biomech* 35:1639-1646
- Magnusson SP, Hansen P, Kjær M (2003) Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 13:211-223.
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicol Lett* 158:167-175.
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS (2006) Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. *Am J Sport Med* 34:1274-1280.

- Michna H (1986) Organisation of collagen fibrils in tendon: changes induced by an anabolic steroid. Functional and ultrastructural studies. *Virchows Arch B Cell Pathol* 52:75-86.
- Michna H (1987) Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int. Orthop.* 11:157-162.
- Miles JW, Grana WG, Egle D, Min KW, Chitwood J (1992) The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint Surg* 74:411-422.
- Mott JD, Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16:558-564.
- Mottram DR, George AJ (2000) Anabolic steroids. *Baillière's best practice and research. Bailliere Clin Endoc Met* 14:55-69.
- Ortega N, Behonick DJ, Werb Z (2004) Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14:86-94.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221-233.
- Pärssinen M, Karila T, Kovanen V, Seppälä T (2000) The effect of supraphysiological doses of anabolic androgenic steroids on collagen metabolism. *Int J Sports Med* 21:406-411.
- Pope HG Jr, Katz DL (1988) Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroids use. *Am J Psychiatry* 145:487-490.
- Riley GP (2005) Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. *Scand J Med Sci Sports* 15:241-251.

- Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, Bank RA (2002) Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodeling in tendon pathology. *Matrix Biol* 21:185-195.
- Ritty TM, Herzog J (2003) Tendon cells produce gelatinases in response to type I collagen attachment. *J Orthopaed Res* 21:442-450.
- Stannard JP, Bucknell AL (1993) Rupture of the triceps tendon associated with steroid injections. *Am J Sports Med* 21:482-485
- Vogel KG, Koob TJ (1989) Structural specialization in tendon under compression. *Int Rev Cytol* 115:267-293.
- Yan C, Boyd DD (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J cell Physiol* 211:19-26.
- Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M (1998) Characterization of collagen and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16:457-470.
- Wood TO, Cooke PH, Goodship AE (1988) The effect of exercise and anabolic steroids on the mechanical properties and crimp morphology of the rat tendon. *Am J Sports Med* 16:153-158.

Figura 1

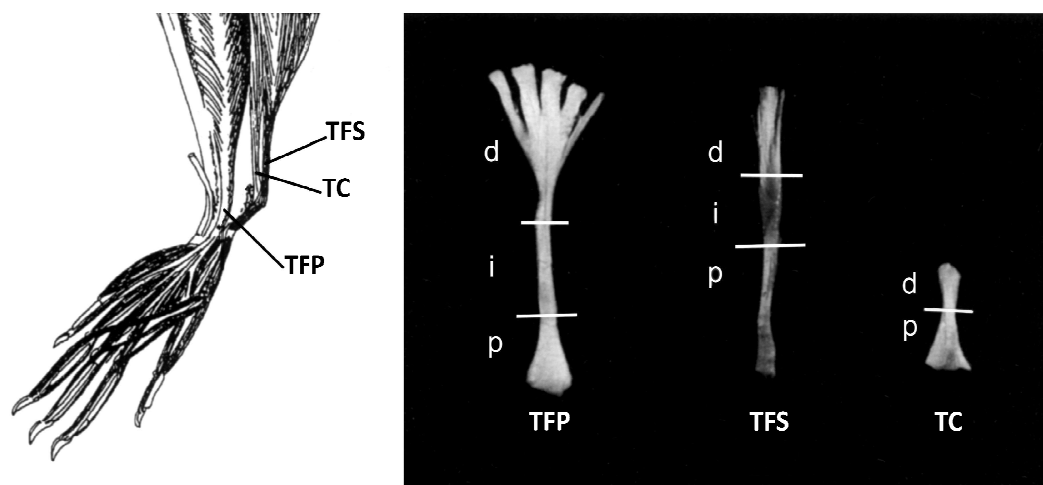


Figura 1. A) Localização anatômica tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) do membro posterior de ratos, como visto a partir do aspecto medial. **B)** Tendões dissecados mostrando a posição correspondente de cada região. O TFS e o TFP foram divididos em regiões proximal (p), intermediária (i) e distal (d), e o TC foi dividido em regiões proximal e distal. A região intermediária do TFS é achatada e firmemente fixada ao TC (Adaptado de Covizi et al., 2001).

Figura 2

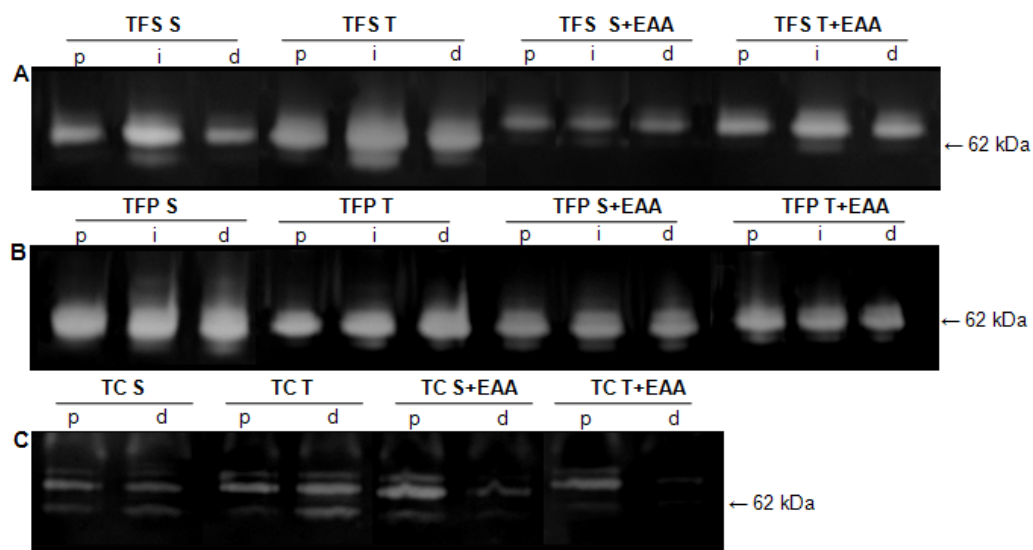


Figura 2. Análise da atividade da MMP-2 no TFS (A), TFP (B) e TC (C) por zimografia em 1% de gelatina-SDS-PAGE (S, T, S + EAA, e T + EAA grupos experimentais; p, proximal, i, intermediário e d, a região distal). Os géis foram analisados por densitometria e a atividade foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores foram apresentados pelas médias \pm 1DP, $p < 0,05$. * Diferença estatisticamente significativa do grupo treinado.

Figura 3

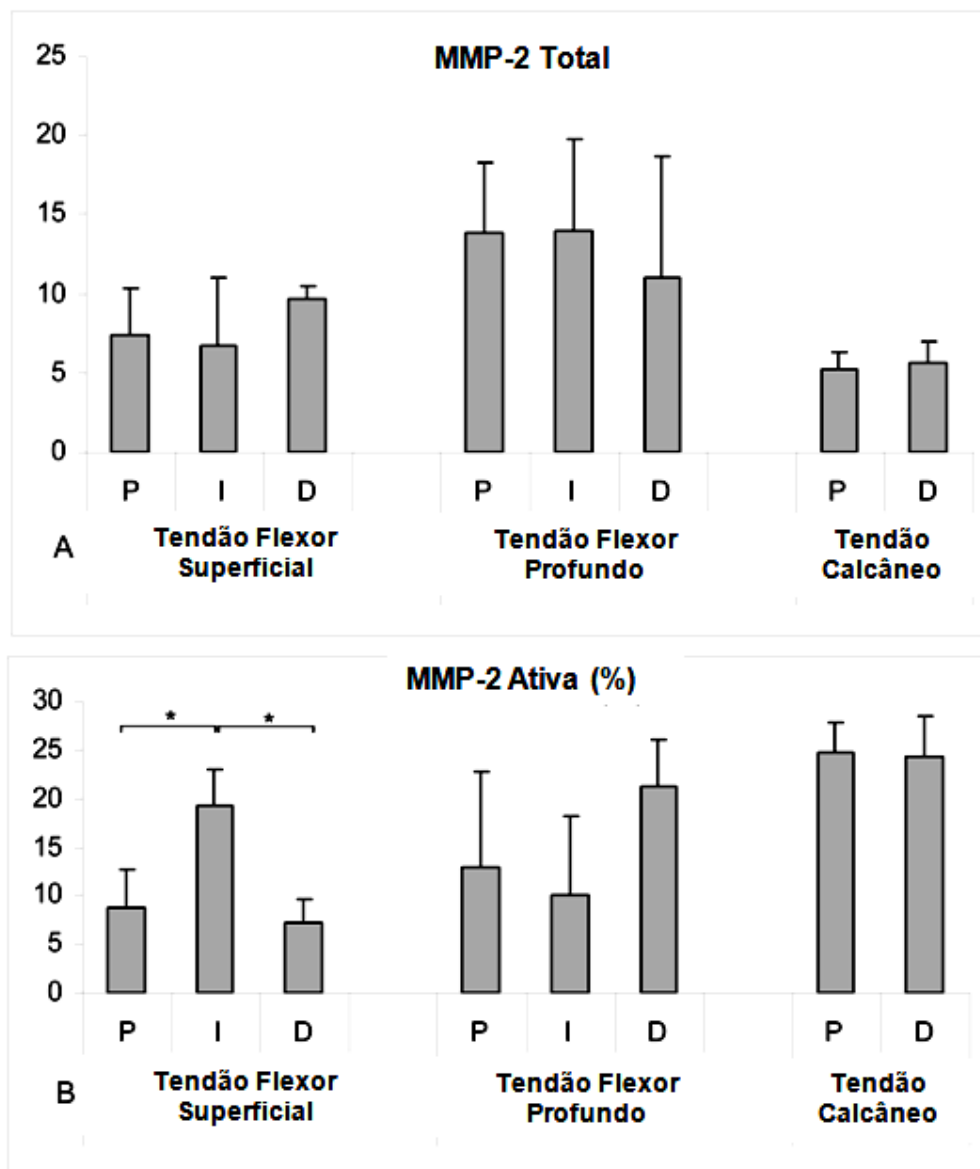


Figura 3. A) concentração da MMP-2 nas diferentes regiões do TFS, TFP e TC de animais sedentários determinada pela zimografia. A concentração da MMP-2 foi determinada somando-se a densidade óptica integrada (DOI) obtida (expressa em unidades arbitrárias) para as três bandas (MMP-2 na forma pró, intermediária e ativa). Os valores foram apresentados como média + 1DP. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre regiões do mesmo tendão. **B)** Variação da forma ativa da MMP-2, mensurada pela porcentagem da banda ativa (62KDa), em diferentes regiões. Nenhuma diferença estatística foi encontrada na forma ativa da MMP-2 entre as regiões do TFP e TC. A região intermediária (I), do TFS apresentou níveis aumentados na forma ativa da MMP-2, em comparação com as regiões proximal (P) e distal (D).

Figura 4

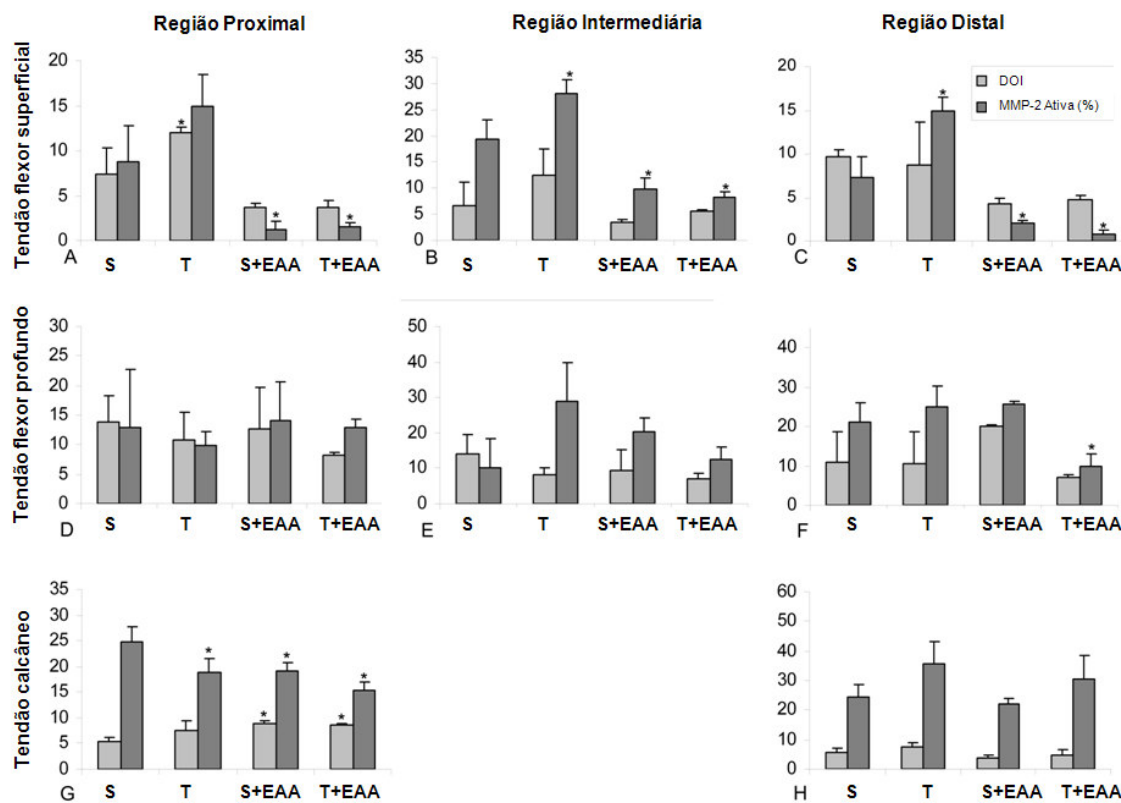


Figura 4. Concentração da MMP-2 (DOI) e proporção da forma ativa (MMP-2 ativa em porcentagem) obtida (expressa em unidades arbitrárias) em resposta ao treinamento (T), tratamento com EAA (S + EAA) e tratamento com EAA associado ao treinamento (T + EAA) nas diferentes regiões do TFS (A-C), TFP (D-F) e TC (G e H). Os valores foram apresentados como média \pm 1DP. * Diferença estatisticamente significativa para o grupo sedentário (S). A ANOVA revelou diferenças na concentração da MMP-2 entre os diferentes grupos experimentais para a região distal do tendão calcâneo ($p = 0,048$). Teste de Tukey identificou que esta diferença foi devido ao tratamento EAA, em comparação com o grupo treinado.

5 MANUSCRITO II - publicado

Marqueti RC, Prestes J, Stotzer US, Paschoal M, Leite RD, Perez SE, Selistre-de-Araujo HS. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. Int J Sports Med 29: 559-63, 2008.



Kulturcentret Assistens - Copenhagen - Dinamarca

**MMP-2, EXERCÍCIO DE SALTO E NANDROLONA NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO**

Rita de Cássia Marqueti, Jonato Prestes, Uliana Sbeguen Stotzer, Milena Paschoal, Richard
Diego Leite, Sergio Eduardo De Andrade Perez, e Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil

Resumo

As metalopeptidases de matriz (MMPs) são cruciais para o desenvolvimento e manutenção da homeostasia tecidual. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade de MMP-2 nos músculos gastrocnêmio, sóleo, extensor longo dos dedos (ELD) e tibial anterior (TA) após o exercício de carga associado ao esteróide anabolizante androgênico (EAA). Ratos *Wistar* foram agrupados em 4 grupos: sedentário (S); sedentário com administração de EAA (EAA), treinado, (T) e treinado com administração de EAA (EAAT). Os grupos exercitados realizaram 7 semanas de um programa de treinamento de salto em água. O exercício aumentou a atividade da MMP-2 no gastrocnêmio e sóleo, mas não no TA e EDL. O tratamento com EAA diminuiu a atividade MMP-2 no EDL, em relação ao grupo S, sem alterações significativas no gastrocnêmio e sóleo. A associação do EAA e treinamento restabeleceram a atividade da MMP-2 no EDL. O treinamento aumentou o *turnover* tecidual nos músculos motores primários, que por sua vez, responderam de forma diferente ao tratamento com EAA. Estes dados podem ser úteis para uma melhor compreensão da fisiologia muscular sob uso de EAA.

Palavras-chave: metalopeptidases de matriz, músculo esquelético, esteróides anabólicos androgênicos, exercício de carga.

Introdução

A matriz extracelular (MEC) que envolve as fibras musculares fornece suporte estrutural, proteção e manutenção da integridade funcional muscular [3]. Algumas proteínas da MEC muscular podem aumentar com o treinamento físico, [14,15] e a manutenção dessa MEC depende de uma variedade de enzimas proteolíticas, como as metalopeptidases de matriz (MMPs) [21,27]. As MMPs são geralmente encontradas em tecidos na isoforma pró-MMPs [14] e sua expressão é altamente regulada por fatores de crescimento e citocinas produzidas durante o remodelamento tecidual [2,18,22,25,26].

A MMP-2 desempenha um papel essencial na proliferação e diferenciação miofibrilar, na recuperação após lesão local e na manutenção da homeostase do tecido conjuntivo [4]. Após a lesão muscular, as células satélites, que são precursoras de células musculares, são ativadas e expressam as MMPs. A ativação da MMP-2 está relacionada com a regeneração de novas miofibrilas, provavelmente devido à degradação do colágeno tipo IV da membrana basal durante a proliferação dos mioblastos, migração e fusão [13]. A lesão muscular induzida pelo exercício aumenta a atividade das MMPs, no entanto, a correlação entre a intensidade do exercício e da atividade de MMP músculo não está bem estabelecida [5]. O exercício excêntrico intenso induziu um aumento da atividade das MMPs que é responsável pela degradação do colágeno IV no músculo esquelético [18]. A corrida de baixa intensidade (~40% do VO^2_{max}) não alterou a expressão da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio, sóleo e quadríceps de ratos [5]. Por outro lado, no exercício de corrida em alta intensidade (70-75% do VO^2_{max}), ocorreu aumento da expressão da proteína da MMP-2 na porção superficial do gastrocnêmio e quadríceps.

Os esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) têm sido utilizados para aumentar o desempenho físico durante o exercício físico [12,19,28]. No entanto, o abuso dos EAA por

longo período aumenta o risco de doenças, induz efeitos psicológicos adversos e promove lesão do tendão do músculo esquelético [8,10,20]. Alguns cientistas acreditam que há um aumento do risco de lesões músculos-esqueléticas com o uso de EAA [1,24]. O principal efeito negativo do uso do EAA parece estar relacionado ao tecido conjuntivo do sistema músculo-esquelético [28].

Nesse sentido, Marqueti et al. [20] mostraram que exercício de alta intensidade associado ao tratamento com EAA, diminuiu significativamente a atividade da MMP-2 no tendão de Aquiles de ratos. No entanto, o efeito dos EAA sobre a atividade das MMPs no músculo esquelético ainda não foi descrito. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do exercício de alta intensidade associado ao EAA na atividade de MMP-2 dos músculos gastrocnêmio, sóleo, extensor longo dos dedos (EDL) e tibial anterior (TA), os dois últimos são músculos antagonistas do salto [9]. Esse trabalho demonstrou que estes quatro tipos de músculos respondem diferentemente ao mesmo estímulo, portanto, modificando o remodelamento da MEC muscular de maneira distinta.

Material e Métodos

Animais e grupos experimentais: Quarenta ratos (*Wistar novergicus albinus*, pesando aproximadamente ± 200 g, no início do experimento) foram agrupados em 4 gaiolas de plástico, à temperatura ambiente com luz controlada em ciclo de 12 h (claro escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o guia de pesquisa para o cuidado e utilização de animais de laboratório (National Research Council, 1996). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de

São Carlos, processo nº. 002/2006, parecer 004/2006. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (10 animais/grupo), na seguinte ordem: sedentários sem suplementação de EAA (S), sedentário com suplementação de EAA (EAA), treinado sem suplementação de EAA (T), e exercitado com suplementação de EAA (EAAT).

Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a um programa de exercício (saltos) em um tubo de plástico 25 centímetros de diâmetro, contendo uma quantidade de água equivalente ao dobro do comprimento do corpo do animal, com temperatura constante de 30 ± 2 ° C. Após a semana de adaptação os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento que consistiu de 7 semanas (5-d/semana).

Administração de EAA: Os animais receberam Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil). Doses de 5 mg/kg de massa corporal (dose suprafisiológica) foram injetadas por via subcutânea na região dorsal dos animais duas vezes por semana. Esta dosagem foi análoga à dosagem freqüentemente utilizada por atletas (Pope, 1988). Os grupos experimentais que não tiveram administração de EAA (S e T) receberam um veículo apenas com óleo de amendoim e álcool benzílico. O decanoato de nandrolona foi administrado durante 7 semanas com início na primeira semana de treinamento, após a semana de adaptação.

Protocolo de treinamento: Para reduzir o estresse, os animais foram adaptados à água na semana pré-treinamento (semana de adaptação). Esta adaptação consistiu de sessões de levantamento de peso (50% da carga de peso corporal), uma vez por dia durante 5 dias em água a 30 ± 2 ° C. A sobrecarga foi fixada no peito do animal, usando um colete adequado que permitia a execução dos saltos sem que a vestimenta caísse do corpo do mesmo. O número de séries (2-4) e repetições (5-10) foi ajustado diariamente e aumentado gradualmente. Todas as sessões sempre foram realizadas no período da tarde, após as 16:00 horas. Após a semana de

adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento de saltos, com sobrecarga ajustada de acordo com o peso corporal do animal, como descrito anteriormente (Cunha et al., 2005; Marqueti et al., 2006). O protocolo de saltos consistiu de uma primeira semana de treinamento, em que o animal executou 4 séries de 10 saltos, um período de descanso de 30 segundos entre as séries e sobrecarga de 50% do peso corporal. Durante as seis semanas restantes o treinamento foi executado com o mesmo número de séries (4) e saltos (10) e intervalos de descanso (30 segundos entre as séries), porém, com uma sobrecarga adicional de 5%/semana, chegando a 80% do peso corporal na última semana. Todos os animais foram pesados três vezes/semana.

Preparação do tecido: Os animais foram eutanasiados por decapitação, imediatamente após a última sessão de treinamento. Em seguida, os músculos inteiros (gastrocnêmio, sóleo, TA e EDL) foram retirados de ambas as patas posteriores. Os músculos foram pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -84 °C para posterior análise bioquímica.

Zimografia: As amostras de músculo foram tratadas como descrito anteriormente para extrato musculare [6]. Cinco amostras (25mg cada) foram agrupadas em um total de 100 mg de tecido e incubadas em 2 mL de tampão de extração (cacodílico ácido 10mM pH 5,0; NaCl 0,15 M; ZnCl² 1mM, CaCl² 20mM, NaN³ 1,5 mM; Triton X-100 0,01% [v / v]), a 4 ° C por 24 horas. Após este período, a solução foi centrifugada (10 min., 13.000xg a 4 °C). As amostras foram concentradas com 20 microgramas de proteínas totais e resolvidas por eletroforese em gel de policrilamida contendo SDS 10% e gelatina na concentração final de 1mg/mL. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes em 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS e incubados em tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0; de CaCl² 5mM e NaN³ 0,02%) a 37 ° C por 20 h. Os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) por 1 ½ h e descorados com ácido acético: metanol: água (1:4:5, v: v: v). A

atividade gelatinolítica foi visualizada como faixas claras no gel corado. Os géis foram fotografados com uma Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels e as médias de intensidade das bandas foram analisadas utilizando o software *Gene Tools*.

A análise estatística. Todos os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados foram submetidos aos testes de Homogeneidade (Teste de Levene) e Normalidade. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, assim foi utilizado o ANOVA two-way, (levando em consideração as variáveis: exercício x EAA) e quando a diferença apresentada foi significativa, o teste de Tukey foi aplicado para comparações múltiplas. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado foi o Statistica $\text{\textcircled{R}}$ 6.1.

Resultados

As bandas encontradas em todos os grupos foram 72-62 kDa [3]. Embora as amostras apresentassem outras bandas de atividade da MMP-2, nesse estudo, foi enfatizada a banda ativa.

No grupo a EAA, a atividade da MMP diminuiu significativamente no músculo EDL comparado com os grupos S e EAAT (Figura 1). A atividade da MMP-2 não se alterou músculo TA em todos os grupos experimentais (Figura 2).

Os resultados observados para o gastrocnêmio (Figura 3) e sóleo (Figura 4) foram semelhantes. Porém, em ambos os músculos, o treinamento aumentou significativamente o nível de atividade de MMP-2 em comparação com os grupos S, EAA e EAAT. A atividade da MMP-2 nos grupos EEA e EEAT foi similar ao grupo S em ambos os músculos.

Discussão

As MMPs e seus inibidores no músculo esquelético têm importantes funções fisiológicas na manutenção da integridade e da homeostasia das fibras musculares e da MEC. No entanto, ainda pouco se sabe sobre o papel das MMPs no músculo esquelético. As MMPs têm um papel regulador no desenvolvimento e crescimento muscular, pois liberam fatores de crescimento locais, e também são importantes no processo de reparo após lesão traumática ou miopatia de desuso [4,13,15]. A atividade da MMP-2 é encontrada em tecidos sob constante remodelamento [14], e um aumento desta atividade é geralmente indicativo de degradação da MEC, fator fundamental para permitir o crescimento do tecido [16,17]. Uma das MMPs mais importantes associadas com a função do músculo esquelético é a MMP-2, também conhecida como gelatinase A, ou colagenase tipo IV de 72kDa, que pode ser transformada em uma isoforma ativa de 62kDa. A MMP-2 regula a integridade da MEC e a composição do músculo esquelético, exercendo um papel essencial na proliferação e diferenciação das miofibrilas, na regeneração das fibras musculares e na manutenção do tecido conjuntivo [4]. O tecido conjuntivo tem um papel importante na manutenção da força muscular [14]. Como mostrado anteriormente, um protocolo de salto na água ativada de maneira distinta a MMP-2 em vários músculos envolvidos neste movimento. Nossos resultados indicaram um aumento significativo na atividade de MMP-2 nos músculos sóleo e gastrocnêmio após o treinamento de carga. Esses músculos são considerados motores primários no movimento de salto, enquanto p EDL e o TA são músculos antagonistas desse movimento. De fato, nossos resultados mostraram que o treinamento não alterou a atividade da MMP-2 tanto no TA quanto no EDL. Estes resultados sugerem um maior remodelamento na MEC envolvendo os principais músculos envolvidos no salto. Por outro lado, o tratamento com EAA aboliu o

aumento da atividade da MMP-2, sugerindo que o gastrocnêmio e sóleo foram mais sensíveis ao EAA do que o EDL.

Tem sido demonstrado que o exercício de alta intensidade induz um aumento na atividade da MMP-2 nos músculos predominante compostos por fibras do tipo I e II [5,11,18]. De acordo com a literatura, o aumento na atividade da MMP-2 foi observada em fibras musculares predominante tipo I (sóleo) e no tipo II (gastrocnêmio), após o treinamento carga no presente estudo.

O remodelamento da MEC é influenciado pelo exercício físico, e tanto a síntese de colágeno quanto a atividade das MMPs aumentam com exercício de carga [5]. A MMP-2 é expressa em mioblastos, bem como em fibroblastos no tecido muscular normal e tem a sua expressão aumentada sob várias condições patológicas, como inflamação e exercício excessivo [18]. Da mesma forma, no tendão calcâneo, o protocolo de treinamento de salto mostrou um aumento significativo na atividade da MMP-2, sugerindo que o remodelamento provavelmente foi aumentado com o intuito de permitir o crescimento do tendão para uma melhor resposta ao exercício intenso [20].

Neste estudo prévio foi observado que EAA pode induzir lesões no tendão e prejudicar o remodelamento tecidual por meio da inibição da atividade da MMP-2 [20]. No entanto, o efeito dos EAA sobre a atividade da MMP muscular ainda não foi descrito. O presente estudo mostrou que os músculos responderam de forma diferente ao tratamento com EAA. A atividade das MMPs no músculo TA, gastrocnêmio e sóleo não se alteraram em comparação com o grupo controle, enquanto que a atividade MMP-2 do músculo EDL reduziu significativamente. Curiosamente, o músculo EDL apresentou resultados diferentes em comparação com os outros músculos analisados. Assim, foi repetido seis vezes a técnica de zimografia para assegurar a confiabilidade dos resultados. Infelizmente, devido à escassez de

estudos que avaliaram a MMP-2 no músculo após a exercício de salto associado com EAA é difícil explicar os mecanismos responsáveis por essas alterações no músculo EDL. Dessa forma, sugere-se que mais estudos sejam realizados associando a atividade das MMP, exercício e o uso do EAA no EDL, pois esses achados são de extrema importância para a área de medicina física e esporte.

O tratamento com EAA aboliu o aumento na atividade da MMP-2 induzida pelo exercício dos músculos primários envolvidos no salto (gastrocnêmio e sóleo). Contrariamente, no músculo antagonista do salto (EDL), o treinamento evitou esse efeito inibitório sobre na atividade da MMP. Essas alterações não foram observadas no músculo TA. Resumidamente, o treinamento aumenta a demanda fisiológica e dessa forma requer um maior remodelamento tecidual, principalmente nos músculos motores primários. O aumento na atividade da MMP-2 induzida pelo exercício tem um significado biológico positivo, fato que está relacionado com a regeneração muscular. A MMP-2, também exerce importante papel na regulação homeostática da MEC que, conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento da força muscular. O aumento na atividade da MMP-2 e o aumento do remodelamento da MEC após o exercício de carga é um importante mecanismo fisiológico de adaptação. Contrariamente, a administração de EAA e sua associação com o exercício não modifica, ou mesmo reduz a atividade MMP-2, o que pode comprometer o remodelamento da MEC muscular. Assim, a inibição na atividade das MMPs e o remodelamento tecidual prejudicado em uma situação de alta demanda fisiológica, pode levar à perda da funcionalidade e acarretar lesão no tecido muscular.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao Sr. José Carlos Lopes pela sua contribuição nas técnicas cirúrgicas e de apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil.

Referências

- ¹ Battista V, Combs J, Warne WJ. Asynchronous bilateral Achilles tendon ruptures and androstenediol use. *Am. J. Sports Med.* 2003;31:1007-1009.
- ² Bernal F, Hartung HP, Kieseier, BC. Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix Metalloproteinases. *Biol Res.* 2005; 38:267-271.
- ³ Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7:728-735.
- ⁴ Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix Metalloproteinases and Skeletal Muscle: a brief review. *Muscle Nerve.* 2004; 29:191-197.
- ⁵ Carmeli E, Moas M, Lennon S, Powers SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp. Physiol.* 2005; 90: 613-619.
- ⁶ Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27:1281-1292.
- ⁷ Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. Influence of high-intensity training and anabolic steroids treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci.* 2005; 77:1030-1043.

- ⁸ Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am. J. Sport Med.* 2004;32:534-538.
- ⁹ Folland JP, Williams AG. The Adaptations to Strength Training Morphological and Neurological Contributions to Increased Strength. *Sports Med.* 2007; 37:145-168.
- ¹⁰ Inhofe PD, Grana WA, Egle D, Min K, Tomasek, J. The effects of anabolic steroids on rat tendon. An ultrastructural, biomechanical, and biochemical analysis *J. Sport Med.* 1995;23:227-235.
- ¹¹ James RS, Navas CA, Herrel A. How important are skeletal muscle mechanics in setting limits on jumping performance? *J. Exp. Biol.*:2007; 210, 923-933.
- ¹² Kanayama G, Barry S, Hudson JI, Pope HG Jr. Body image and attitudes toward male roles in anabolic-androgenic steroid users. *Am J Psychiatry.* 2006; 163:697-703.
- ¹³ Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdiere-Sahuque M, Fardeau M, Alameddine HS. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev. Biol.* 1999;205:158-170
- ¹⁴ Kjær M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to Mechanical loading. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 49-698.
- ¹⁵ Kjaer M, Magnusson P, Krogsgaard M, Boysen Moller J, Olesen J, Heinemeier K, Hansen M, Haraldsson B, Koskinen S, Esmarck B, Langberg H. Extracellular Matrix Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Exercise. *J. Anat.* 2006; 208:445-450.

- ¹⁶ Koskinen SOA, Kjær M, Mohr T, Sørensen FB, Suuronen T, Takala TES. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. *Muscle Nerve*. 2000;23:580-589.
- ¹⁷ Koskinen SOA, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T, Martikkala V, Mäkinen TT, Oksa J, Rintamäki H, Löfberg M, Somer H, Takala TES. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2001a;11:9-15.
- ¹⁸ Koskinen SOA, Wang W, Ahtikoski AM, Kjær M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V, Takala TES. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2001b; 280: 1292-1300.
- ¹⁹ Labre, M. P. Adolescent boys and the muscular male body ideal. *J. Adolescent Health*. 2002; 30:233-242.
- ²⁰ Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. *Am. J. Sport Med.* 2006; 34:1274-1280.
- ²¹ Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:21491-21494.
- ²² Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrimetalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007; 8:221-233.

- ²³ Pope HG Jr, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroids use. *Am J Psychiatry*. 1988;145:487-490.
- ²⁴ Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin.Ther.*2001; 23:1355-1390.
- ²⁵ Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17:463-516.
- ²⁶ Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* 2007;15: 2223-2268.
- ²⁷ Yamada M, Tatsumi R, Kikui T, Okamoto S, Nonoshita S, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Shimokawa H, Sunagawa K, Allen RE. Matrix metalloproteinases are involved in mechanical stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve* 2006; 34:313-9.
- ²⁸ Yesalis CE, Bahrke MS. Doping among adolescent athletes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000; 14:25-35.

Figura 1

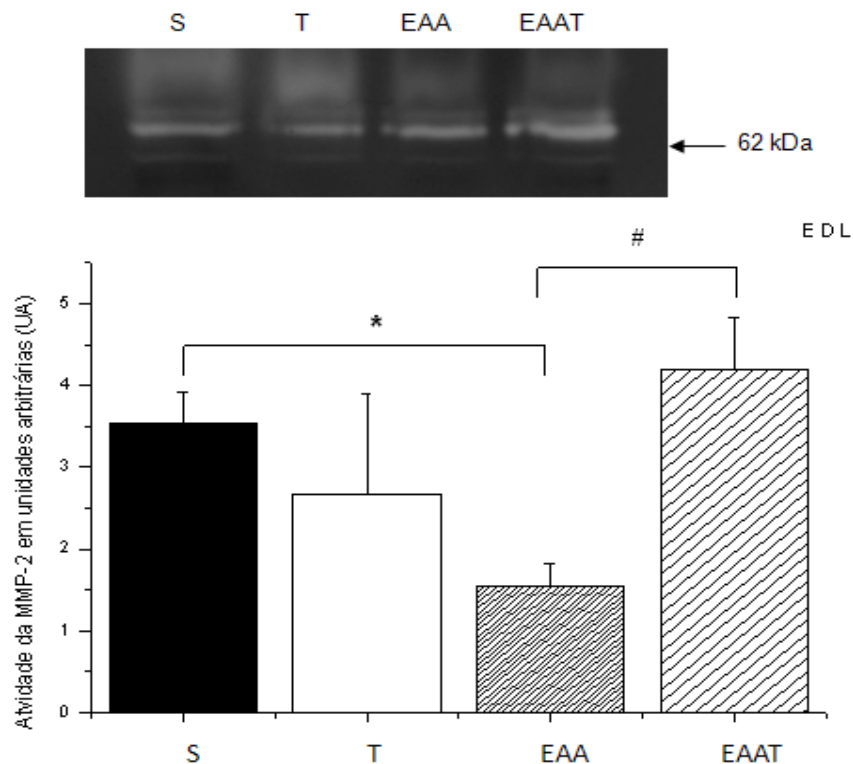


Figura 1. Análise da atividade da MMP-2 no extrato do músculo EDL por meio de zimografia em gel de gelatina 1%-SDS-PAGE. Cada banda representa um *pool* de amostras (n = 5; 25mg/amostra; 20µg de proteína de cada grupo) de diferentes grupos de animais. Antes de corar com Coomassie, o gel foi incubado por 20 horas em tampão de substrato, a 37 °C. Os géis foram analisados por densitometria e a atividade da banda de 62 kDa foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores foram apresentados por média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$. * Diferenças significativas em comparação com o grupo S. # Diferenças estatisticamente significativas entre EAA e grupos EAAT.

Figura 2

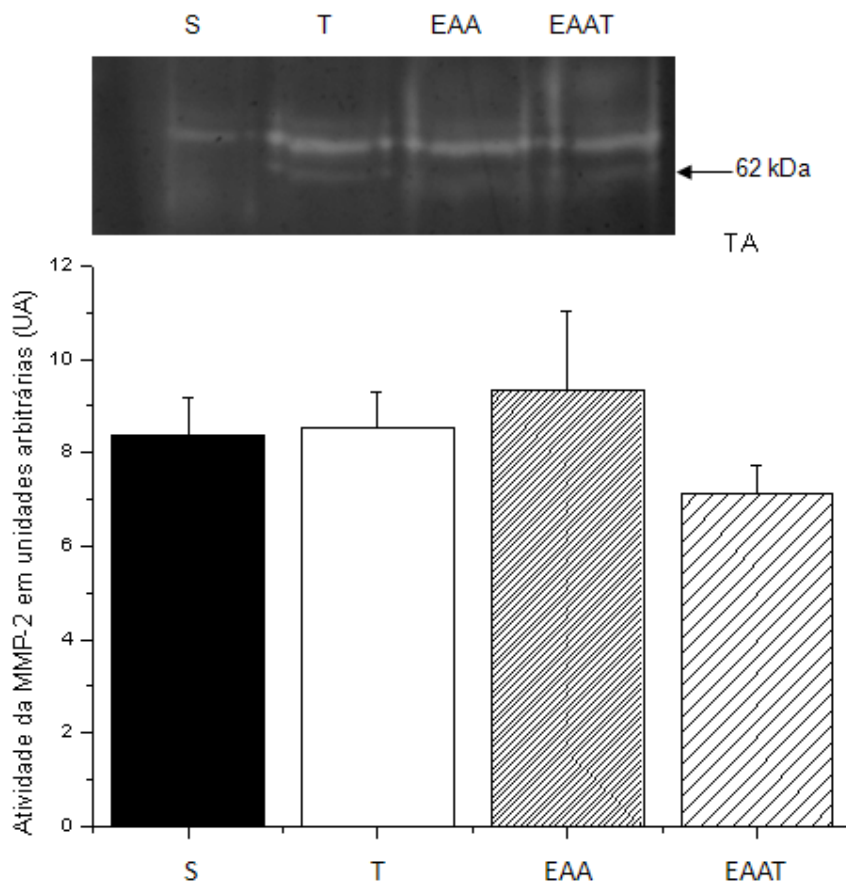


Figura 2. Análise da atividade da MMP-2 no extrato do músculo TA por meio de zimografia em gel de gelatina 1%-SDS-PAGE. Cada banda representa um pool de amostras ($n = 5$; 25mg/amostra; 20 μ g de proteína de cada grupo) de diferentes grupos de animais. Antes de corar com Coomassie, o gel foi incubado por 20 horas em tampão de substrato, a 37 °C. Os géis foram analisados por densitometria e a atividade da banda de 62 kDa foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores foram apresentados por média + erro padrão da média, $p < 0,05$.

Figura 3

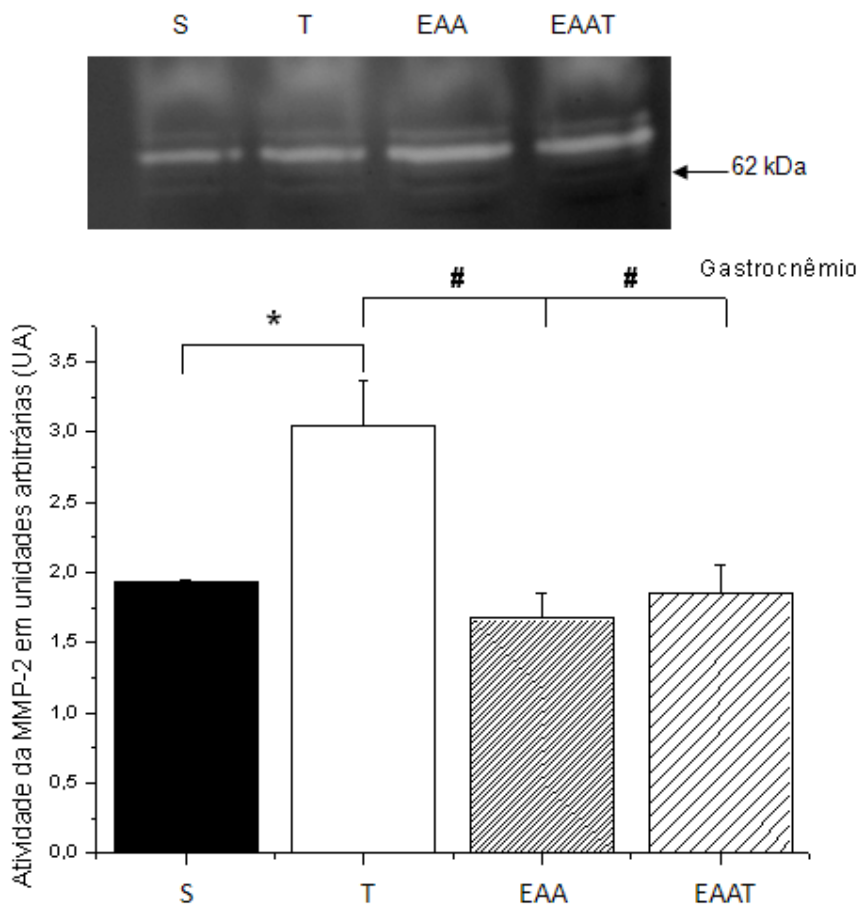


Figura 3. Análise da atividade da MMP-2 no extrato do músculo gastrocnêmio por meio de zimografia em gel de gelatina 1%-SDS-PAGE. Cada banda representa um *pool* de amostras (n = 5; 25mg/amostra; 20µg de proteína de cada grupo) de diferentes grupos de animais. Antes de corar com Coomassie, o gel foi incubado por 20 horas em tampão de substrato, a 37 °C. Os géis foram analisados por densitometria e a atividade da banda de 62 kDa foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores foram apresentados por média \pm erro padrão da média, $p < 0,05$. * Diferenças significativas em comparação com o grupo S. # Diferenças estatisticamente significativas entre EAA e grupos EAAT quando comparado com o grupo T.

Figura 4

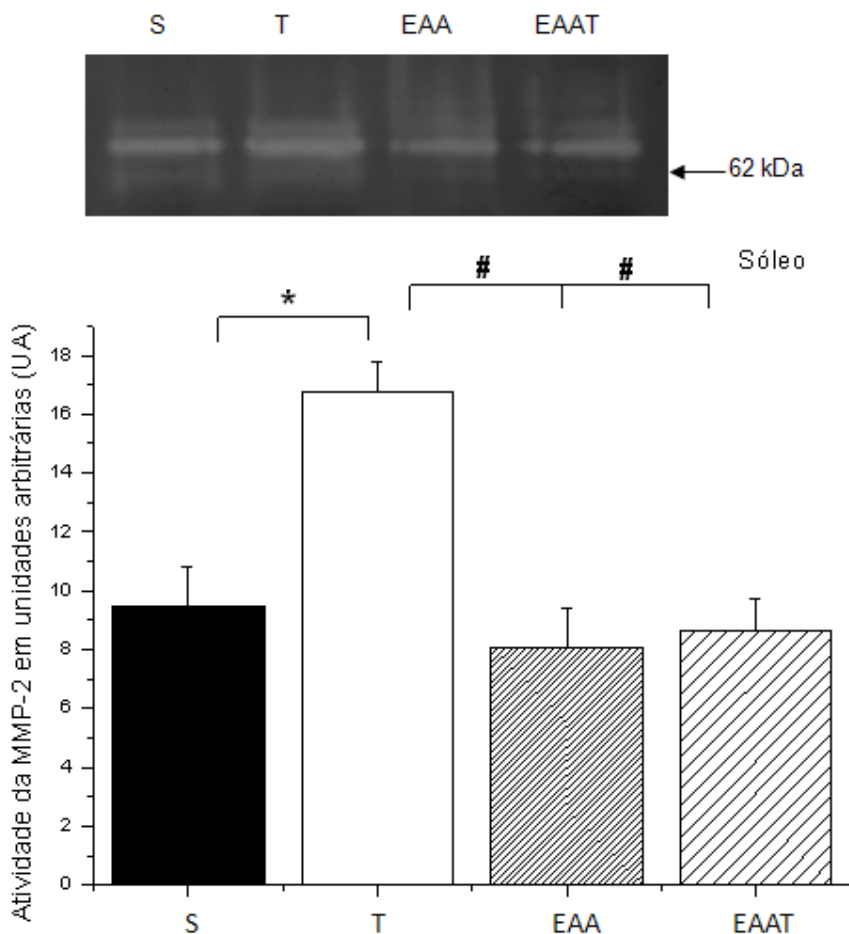


Figura 4. Análise da atividade da MMP-2 no extrato do músculo sóleo por meio de zimografia em gel de gelatina 1%-SDS-PAGE. Cada banda representa um *pool* de amostras (n = 5; 25mg/amostra; 20µg de proteína de cada grupo) de diferentes grupos de animais. Antes de corar com Coomassie, o gel foi incubado por 20 horas em tampão de substrato, a 37 °C. Os géis foram analisados por densitometria e a atividade da banda de 62 kDa foi expressa em unidades arbitrárias. Os valores foram apresentados por média \pm erro padrão da média, p <0,05.* Diferenças significativas em comparação com o grupo S. # Diferenças estatisticamente significativas entre EAA e grupos EAAT quando comparado com o grupo T.

6 MANUSCRITO III – submetido

*Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports -
Manuscript ID SJMSS-O-531-09.R1*



Kronborg Castle - Copenhagen – Dinamarca

**RESPOSTAS BIOMECÂNICAS DE DIFERENTES TENDÕES DE RATOS
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE CARGA E O DECANOATO DE NADROLONA**

¹ Rita C. Marqueti, ¹ Jonato Prestes, ¹ Charles C. Wang, HP ² Oscar Ramos, ¹ Sérgio E.A. Perez, R. ³ Wilson Nakagaki, ³ Hernandes F. Carvalho, ¹ * Heloisa S. Selistre-de-Araujo

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

² Instituto Butantã, São Paulo, SP, Brasil

³ Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Título resumido: biomecânica dos tendões, exercício e esteróides

Resumo

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) têm sido associados com o aumento da incidência de ruptura em tendões. O objetivo deste estudo foi comparar as propriedades biomecânicas do tendão calcâneo (TC), tendão do músculo flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) em ratos e também determinar o efeito do EAA em associação com exercício de carga (7 semanas de salto em água). Ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos experimentais: sedentário (S), treinados (T), tratados com EAA (5 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana) (EAA) e animais tratados com EAA e treinados (EAAT).

Ensaio mecânico mostraram que o TC diferiu do TFP e TFS, que apresentaram propriedades mecânicas semelhantes. No TC o exercício de salto promoveu uma “*toe region*” mais prolongada, aumentou da resistência à carga tensional e reduziu o módulo de elasticidade, características de um tendão elástico capaz de armazenar energia. O EAA originou um tendão menos complacente, e os efeitos foram reforçados pela associação de ambos, EAA e treino. O TFP foi o mais afetado pelo treinamento, EAA, e a interação de ambos, provavelmente devido o envolvimento dos dedos na etapa *toe-off* do salto, o que sugerimos estar relacionada com a rápida transmissão de força mais que a função de estocar energia. Em conclusão, os tendões se adaptaram de forma diferente ao exercício, mas responderam igualmente ao EAA, demonstrando flexibilidade reduzida, o que é sugerido para o aumento do risco de ruptura do tendão em consumidores de EAA.

Palavras-chave: decanoato de nandrolona, teste biomecânico, propriedades material, exercício de carga.

Introdução

Os tendões são estruturas especializadas, responsáveis pela transmissão das forças do músculo para o osso (Carvalho et al., 2000). A interação dinâmica entre músculo e tendão influencia a transmissão de força (Magnusson et al. 2008; Benjamin et al. 2008), e como resultado, as propriedades mecânicas dos tendões podem se modificar, dependendo do seu nível de utilização (Reeves, 2006). Os tendões possuem funções especializadas dependendo da sua localização anatômica e relação com outras estruturas. Além disso, eles apresentam uma variação notável nas propriedades morfológicas, moleculares e mecânicas, as quais estão relacionadas às suas funções (Birch, 2007). Alguns tendões se dobram ao redor das articulações ou dos ossos e são adaptados às forças de fricção e de compressão, desenvolvendo regiões especializadas no que se refere aos componentes da matriz extracelular e metabolismo (Carvalho & Vidal, 1995; Esquisatto et al., 2007).

O exercício modifica a morfologia e a organização das fibras colágenas, resultando em tendões com maior resistência à tração (Woo et al., 1980; Vilarta, Vidal, 1989). Os tendões apresentam maior área transversal e resistência à tração, bem como aumento da síntese de colágeno tipo I em resposta ao treinamento físico (Woo et al., 1980). Foi demonstrado que os tendões flexores digitais de ratos treinados por uma semana com corrida em esteira aumentam o número e o espessamento das fibras colágenas (Wang, 2006). Por outro lado, as propriedades estruturais do tendão calcâneo de coelho não foram afetadas após 40 semanas de treinamento (Viidik, 1967). Além disso, o treinamento em esteira de alta intensidade não influenciou a área de secção transversa do tendão de Aquiles de cavalos após 5 meses, enquanto que 18 meses promoveu em um aumento de 14% (Birch et al., 1999). Apesar destes resultados conflitantes e da escassez de estudos sobre os efeitos do treinamento de longa duração sobre a resistência à ruptura dos tendões, os estudos disponíveis sugerem uma correlação entre o aumento da força dos tendões e da rigidez, com o treinamento de longa

duração (Buchanan & Marsh, 2002, Koongsgaard et al., 2007; Couppé et al., 2008). Além disso, as forças geradas pelos músculos durante atividade física intensa pode ultrapassar a capacidade de transmissão de força do tendão e levar à ruptura ou degeneração (James et al., 2008).

O uso de esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) tem efeitos nocivos sobre o sistema musculotendíneo e aumenta o risco de ruptura do tendão (Battista et al., 2003). Além disso, a ruptura do tendão tem sido associada ao abuso dos EAA em alguns casos (Kramhøft & Solgaard, 1986; Stannard et al., 1993; Visuri, Lindholm, 1993; Evans, 1998). Os dados experimentais em modelos animais sugerem que os esteróides alteram as propriedades biomecânicas dos tendões (Evans, 1998) e que a sua combinação com o exercício aumenta o risco de lesão do tendão (Visuri & Lindholm, 1993). Os tendões não aumentam a sua resistência a tração como os músculos durante o treinamento e dessa forma, estão mais susceptíveis a ruptura (Battista et al., 2003; Maravelias et al., 2005). O tendão *flexor digitorum longus* de camundongos tratados com EAA e submetidos à corrida em esteira rolante (10 semanas), mostrou uma mudança significativa na distribuição do diâmetro das fibrilas de colágeno e um alinhamento menos organizado das fibras colágenas, o qual está relacionado à reduzida resistência à tração e um tendão mais propensos à ruptura (Michna, 1987). A associação dos EAA e exercício resultou em alterações morfológicas na junção mio-tendínea com maior frequência de sua ruptura em seres humanos (Laseter & Russel, 1991).

O mecanismo de ação do EAA nos tendões ainda não é totalmente conhecido. Marqueti e colaboradores, (2006) mostraram que o EAA reduz a atividade das metalopeptidases de matriz-2 (MMP-2) em animais submetidos ao exercício de salto vertical, prejudicando o remodelamento do tendão, o qual pode ser definido com um fator de risco para lesões do tendão calcâneo. No entanto, considerando a detalhada análise anatômica e diferenças regionais no tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor

profundo (TFP) (Covizi et al., 2001), nós encontramos variações regionais na atividade da MMP-2 em resposta ao exercício e esteróides anabólicos (Marqueti et al., 2008).

Com base nos resultados prévios em nosso laboratório, formulamos a hipótese que essas variações resultam das diferenças fisiológicas de cada tendão e da capacidade de se adaptar aos movimentos necessários para realizar um determinado exercício, que por sua vez, refletem as diferentes funções especializadas em movimentos dos membros inferiores. Além disso, especulamos que as variações relatadas na MMP-2 podem correlacionar a habilidade dos tendões em se adaptar ao exercício e/ou tratamento com esteróides anabólicos. Por isso, realizamos um estudo que consistiu em caracterizar as propriedades biomecânicas do TC, TFS, e TFP e suas variações em resposta ao exercício de salto e administração de EAA.

Material e métodos

Animais: Vinte e seis ratos (*Wistar norvegicus albinus*, pesando aproximadamente ± 200 g, no início do experimento) foram agrupados em 4 gaiolas de plástico, à temperatura ambiente com luz controlada em ciclo de 12 h (claro escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o guia de pesquisa para o cuidado e utilização de animais de laboratório (National Research Council, 1996). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, processo n°. 002/2006, parecer 004/2006.

Grupos experimentais: Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (6 animais/grupo), na seguinte ordem: sedentários sem suplementação de EAA (S), sedentário com suplementação de EAA (EAA), treinado sem suplementação de EAA (T), e exercitado com suplementação de EAA (EAAT). Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a

um programa de exercício (saltos) em um tubo de plástico 25 centímetros de diâmetro, contendo uma quantidade de água equivalente ao dobro do comprimento do corpo do animal, com temperatura constante de 30 ± 2 ° C. Após a semana de adaptação os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento que consistiu de 7 semanas (5-d/semana).

Tratamento com EAA: Os animais receberam Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil). Doses de 5 mg/kg de massa corporal (dose suprafisiológica) foram injetadas por via subcutânea na região dorsal dos animais duas vezes por semana. Esta dosagem foi análoga à dosagem frequentemente utilizada por atletas (Pope, 1988). Os grupos experimentais que não tiveram administração de EAA (S e T) receberam um veículo apenas com óleo de amendoim e álcool benzílico. O decanoato de nandrolona foi administrado durante 7 semanas com início na primeira semana de treinamento, após a semana de adaptação.

Protocolo de treinamento: Para reduzir o estresse, os animais foram adaptados à água na semana pré-treinamento (semana de adaptação). Esta adaptação consistiu de sessões de levantamento de peso (50% da carga de peso corporal), uma vez por dia durante 5 dias em água a 30 ± 2 ° C. A sobrecarga foi fixada no peito do animal, usando um colete adequado que permitia a execução dos saltos sem que a vestimenta caísse do corpo do mesmo. O número de séries (2-4) e repetições (5-10) foi ajustado diariamente e aumentado gradualmente. Todas as sessões sempre foram realizadas no período da tarde, após as 16:00 horas. Após a semana de adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento de saltos, com sobrecarga ajustada de acordo com o peso corporal do animal, como descrito anteriormente (Cunha et al., 2005; Marqueti et al., 2006). O protocolo de saltos consistiu de uma primeira semana de treinamento, em que o animal executou 4 séries de 10 saltos, um período de descanso de 30 segundos entre as séries e sobrecarga de 50% do peso corporal. Durante as seis semanas restantes o treinamento foi executado com o mesmo número de séries (4) e saltos (10) e

intervalos de descanso (30 segundos entre as séries), porém, com uma sobrecarga adicional de 5%/semana, chegando a 80% do peso corporal na última semana. Todos os animais foram pesados três vezes/semana. A profundidade da água e a sobrecarga constituíram barreiras para impedir que os ratos utilizassem suas caudas para auxiliar na atividade de salto. Algumas sessões de treinamento foram gravadas com uma câmera de alta velocidade (Cannon, HV20), para analisar o movimento a 30 frames por segundo.

Preparação do tecido: Após 7 semanas do experimento, os animais foram sacrificados imediatamente após a última sessão de treinamento. O tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) foram imediatamente da pata direita posterior e colocados em soro fisiológico para evitar a secagem. Todo o procedimento para o ensaio mecânico foi realizado à temperatura ambiente (Crevier et al., 1996; Schechtman e Bader, 1997; Carpenter et al., 1998; Benevides et al., 2004).

Teste mecânico: O comprimento e a área de secção transversa (mm^2) foram determinados através do cálculo dos valores médios obtidos de três diferentes partes da região de interesse para cada tendão, utilizando-se paquímetro digital (Digimess, Stainless Steel, USA) antes do teste. Os tendões foram fixados a um suporte mecânico por meio de garras especiais fixando as regiões proximal e distal dos três tendões. Um filtro de papel foi envolvido nas regiões de contato dos tendões com as garras para protegê-los de lesões macroscópicas e evitar deslize dos mesmos durante os ensaios (Probst et al., 2000). Um aparelho Instron (modelo 5500R) foi utilizado para o teste. Cada tendão foi submetido a um aumento gradual da carga, a uma taxa de deslocamento constante de 20 mm/min utilizando uma célula de carga de 0,5 kN (Tohyama, Yasuda, 2000). Os dados foram utilizados para a construção das curvas força-x-deslocamento, a partir do qual a curvas tensão X deformação foram derivadas. Com base nestas curvas, os parâmetros seguintes foram calculados: (a) deslocamento até a carga máxima, (b) tensão, (c) deformação, e (d) módulo de elasticidade, de acordo com Nakagaki et

al., (2007). A área da secção transversa foi uma apresentada de acordo com os efeitos do exercício de carga, do EAA, ou a combinação dos dois, sobre as propriedades estruturais dos tendões.

A análise estatística: Os dados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). A análise estatística foi feita inicialmente pelo teste de Shapiro-Wilk para a normalidade e o teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade e, portanto, a uma ANOVA seguida de análise múltipla pareada de Tukey foi utilizada para comparações entre os tendões e a ANOVA *two way* foi utilizada (levando em consideração as variáveis intervenientes T x EAA), seguido do teste *post-hoc de* Bonferroni para comparações múltiplas. Em todos os cálculos, um nível de significância crítica de 5% ($p < 0,05$) foi corrigido. O software utilizado foi o Statistica 6.1.

Resultados

Salto vertical

Não há informação disponível sobre a cinética de saltos verticais em ratos. Assim, os saltos foram registrados com uma câmera digital de alta velocidade. As imagens foram separadas em períodos de tempo (0,03 s), e utilizadas para determinar as principais características do movimento que poderia ajudar a compreender a participação do CT, TFP, e TFS, na fase ascendente do salto. A Figura 1 mostra uma série de tempo no qual as setas foram atribuídas à posição das coxas, perna, pé e dedos. O *takeoff* foi integrado em 0,3 s (10 frames). O movimento foi dividido em três grandes etapas sobrepostas: (1) extensão da perna, (2) extensão plantar, e (3) *toe-off*. A extensão das pernas continuou do início do movimento até o

takeoff. A extensão plantar ocorreu na segunda metade do movimento, e o *toe-off* foi particularmente rápido, gastando apenas um período de tempo (cerca de 0,03 s).

Propriedades biomecânicas do TC, TFS e TFP (comparações entre os tendões do grupo sedentário)

A Figura 2 mostra o modelo da curva tensão-deformação obtida para cada tendão no grupo S. Os TFS e TFP mostraram propriedades mecânicas semelhantes, ao contrário do TC que apresentou propriedades diferentes de ambos. As diferenças no perfil da curva indicaram que o TC acomodou menos energia e resistiu à carga tensional mais rapidamente do que o TFS e TFP no grupo sedentário. A análise das propriedades materiais dos três tendões mostrou que o TFS e o TFP foram semelhantes entre si e diferiram do TC, considerando-se o deslocamento com a carga máxima (Fig. 3A), estresse (Fig. 3B), tensão (Fig. 3C) e o módulo elástico (Fig. 3D).

Efeito do treinamento, EAA e do treinamento associado ao EAA nas propriedades estruturais e biomecânicas do TC, TFS e TFP

A Figura 4 mostra um modelo (medias) das curvas tensão-deformação obtidas para os três tendões nas diferentes condições experimentais, e as tabelas I e II mostram os dados numéricos e a análise estatística, respectivamente. A estatística apresentada na Tabela II indica que o TFP foi o mais afetado pelo exercício e o tratamento com EAA e pela interação entre os dois fatores, nas atuais condições experimentais.

Tendão calcâneo

O TC apresentou uma toe region mais longa e alcançou uma maior deformação em resposta ao exercício de salto (Fig. 4). Considerando que a administração de EAA teve pouco efeito sobre o perfil geral da curva tensão-deformação, a sua administração comprometeu a curva gerando mudanças quando associado ao treinamento de salto. A área de seção transversa do TC foi reduzida em resposta ao EAA, mas não em resposta ao treinamento de salto isolado (T) ou T associado com EAA (EAAT) (Tabela I e II). Na verdade, o TC foi muito resistente aos efeitos do treinamento, do EAA e do treinamento associado ao EAA (EAAT) com relação ao deslocamento até a carga máxima, tensão e deformação. No entanto, foi observada uma tendência de redução para o módulo elástico em resposta ao treinamento, o qual foi negativamente modulado nos grupos EAA e EAAT. A diminuição significativa da deformação foi observada para o EAA e EAAT em comparação com o grupo T.

Tendão flexor superficial

Ao contrário do que foi observado para o TC, o TFS mostrou uma “toe region” mais curta em resposta ao treinamento (Fig. 4B). Como mencionado acima, o TFS foi o menos afetado pelo treinamento, EAA, ou a combinação de ambos (Tabelas I e II). Como julgado pelos dados experimentais, os únicos parâmetros afetados foram a redução na área de seção transversa e o aumento do módulo de elasticidade no grupo de EAAT.

Tendão flexor profundo

O padrão geral das curvas de tensão-deformação foi semelhante para o TFS e TFP, mas o TFP foi capaz de resistir maior tensão nos grupos T e EAA (Fig. 4C). Por outro lado, EAA associado ao treinamento (EAAT) resultou em um tendão mais fraco e menos flexível (Tabelas I e II). Ao contrário do TC e o TFS, a TFP mostraram uma reduzida área de seção

transversa em resposta ao T, EAA, ou EAAT. O EAA mostrou um efeito menos evidente do treinamento. O TFP mostrou uma redução no parâmetro deslocamento até carga máxima no grupo EAAT, mas não nos grupos T e EAA. Por outro lado, o treinamento causou um aumento da tensão, enquanto EAA sozinho não causou nenhum efeito, e a associação à administração de EAA (EAAT) reverteu o efeito do exercício e o tendão apresentou uma menor resistência à tensão. A tensão só foi afetada no grupo EAAT. Surpreendentemente, enquanto o T e o EAA resultaram em um aumento no módulo de elástico, a combinação de exercício de carga e EAA restauraram esse valor para os níveis do grupo controle no TFP.

Discussão

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que investiga os efeitos da carga mecânica resultante do exercício de salto combinado com EAA sobre a biomecânica do TC, TFS e TFP. Os resultados demonstraram que (1) as características biomecânicas do TC e (2) sua resposta ao exercício de salto são diferentes das características dos TFS e TFP, e que (3) EAA provocou um desvio à esquerda na curva tensão-deformação para os três tendões, e (4) seus efeitos foram amplificados com a associação simultânea do exercício. Além disso, a análise estatística mostrou que o TFP foi o mais afetado pelo treinamento e EAA, e pela interação desses dois fatores.

A análise do movimento envolvido no salto vertical em ratos revelou que, de forma semelhante aos seres humanos, a extensão da perna (pela ação do músculo quadríceps) e extensão plantar (pela ação dos músculos sóleo e gastrocnêmio) correspondem à fase lenta do movimento e da maior parte da carga durante o salto, enquanto que a fase *toe-off* é rápida e está menos associada com o gasto de energia necessária para a “decolagem” take off. Mesmo que não tenhamos avaliado o armazenamento de energia no presente estudo, supomos que a extensão da perna e a extensão plantar armazenem energia para executar o salto, enquanto o

toe-off é uma etapa rápida e depende mais da velocidade do que do armazenamento de energia, e é provável que esteja associado com o equilíbrio e a direção do movimento. Além disso, o trabalho experimental é necessário para desenvolver essas idéias, que se forem provadas verdadeiras, poderiam explicar as diferenças entre os tendões em sua resposta ao exercício salto

As fibras do tendão assumem uma configuração de repouso, ou acomodação, tipicamente representada na curva tensão-deformação que é a *toe region* de modo que uma pequena tensão exercida no tendão é capaz de alongar essa região inicial, ou seja, o alongamento das ondulações das fibras em resposta a uma leve tensão. As fibras alinhadas resistem à deformação adicional que resulta na inclinação da curva tensão-deformação em um segmento linear. Nesta região linear, o tendão é alongado menos de 4% e as fibras de colágeno se tornam progressivamente mais orientadas na direção da carga, aumentando a rigidez do tendão. Até este estágio, a deformação do tendão é reversível. Se um tendão é alongado acima de 4%, ocorre o rompimento de fibras do tendão (Devkota & Weinhold 2003); a falha macroscópica ocorrerá em cerca de 8-10 % da deformação, resultando em ruptura do tendão (Wang 2006, Rees et al. 2006).

O TC diferiu do TFP e TFS com relação ao padrão das curvas tensão-deformação e parâmetros biomecânicos dos animais sedentários. O TC mostrou menor deslocamento até a carga máxima e maior módulo de elasticidade. Curiosamente, a resposta do TC para o exercício de salto também foi diferente daquela mostrada pelo TFP e TFS. Considerando que a curva tensão-deformação obtidos para o TC mostrou um deslocamento para a direita e uma longa *toe region* em resposta ao treinamento, as curvas encontradas para o TFP e TFS mostraram um desvio à esquerda. Esses parâmetros são na maior parte qualitativos, mas mostram que o TC se tornou mais elástico, com uma longa *toe region* e reduzido módulo elástico, coerente com a idéia de que este tendão atua em conjunto com os músculos para

armazenar energia para saltar. A adaptabilidade e a flexibilidade do TC têm sido consideradas características importantes para alcançar a eficiência ideal para atividades esportivas (Lichtwark & Wilson, 2007). É possível que a menor fração de trabalho realizada pela unidade sóleo-gastrocnêmio durante o salto e a flutuação na água (mesmo na presença da sobrecarga imposta pelo peso adicional) minimizou os efeitos observados e comprometeu a significância estatística dos dados.

A análise estatística demonstrou que a TFP é o mais afetado pelo exercício, EAAT, e pela combinação dos dois e isso deve ser por causa de seu envolvimento no movimento toe-off. Como mencionado anteriormente, esse movimento é caracterizado pela velocidade (em vez de armazenamento de energia), e poderia ser o principal fator responsável pelo comportamento diferente observado do TC e TFP, em resposta ao treinamento. O TFS é provavelmente apenas minimamente recrutado durante o salto.

O treinamento físico pode aumentar o conteúdo de colágeno e resultar em hipertrofia do tendão (Kjaer et al., 2005; Wang, 2006; Nakagaki et al., 2007). No entanto, o exercício de salto levou a uma diminuição da área de secção transversa do TFP, o que sugere que o treinamento pode aumentar a capacidade do tendão em suportar carga, mesmo sem um aumento na área de secção transversa.

Sommer (1987) relatou que 16 semanas de corrida resultou em um aumento de 40% na área de secção transversa do TC de rato com o treinamento de alta intensidade, enquanto que o treinamento de resistência de baixa intensidade não alterou a área transversal do tendão. Já a maior área de secção transversa no tendão de corredores treinados (treinamento durante 5 anos, com 80 km/semana), sugere que a exposição crônica a cargas repetitivas resulta em hipertrofia do tecido (Rosager et al., 2002). Outro estudo relatou que o treinamento de corrida de curta duração reduziu a espessura do tendão (Shadwick, 1990). Portanto, 7 semanas de

regime de treinamento utilizado no presente estudo parece ser moderado em comparação com outros tipos de exercícios que resultaram em marcado espessamento dos tendões.

Apesar das diferenças entre o TC e TFP (e TFS) com relação à adaptação ao exercício discutido acima, os três tendões responderam qualitativamente da mesma forma para os grupos EAA e EAAT. Os três tendões apresentaram capacidade reduzida em acomodar carga tensional inicial (ou seja, diminuída *toe region*), reduzida capacidade para resistir à tensão (ou seja, diminuída deformação máxima), e reduzida deformabilidade (ou seja, aumento módulo de elasticidade) nos grupos EAA e EAAT.

Mais importante ainda, a administração de EAA reverteu o efeito do treinamento no TC. É importante ressaltar que o módulo de elasticidade foi significativamente maior no grupo de EAAT mesmo para o TFS, que foi menos afetado pelo exercício ou EAA sozinho. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostram que os efeitos dos EAA são reforçados pelo treinamento simultâneo, resultando em tendões que absorvem menos energia e falham com menor alongamento (Miles et al., 1992; Inhofe et al., 1995), mesmo utilizando protocolos que diferem em natureza (salto vs corrida), intensidade (água vs solo) e duração. Em conjunto, essas alterações sugerem que a perda de flexibilidade é um fator importante que contribui para o elevado risco de ruptura do tendão durante o treino em consumidores de EAA.

Buchanan e Marsh (2002) sugeriram que modificações nas propriedades mecânicas não são uma tentativa do tendão para aumentar a força e, assim, suportar maiores cargas, mas sim uma estratégia para resistir aos danos causados por fadiga do material. Esta estratégia deve incluir o aumento no remodelamento do tecido. O *turnover* da matriz extracelular nos tendões é influenciado pela atividade física, pela demanda de oxigênio e fluxo sanguíneo, pelas modificações na da síntese de colágeno e pela atividade da metalopeptidases de matriz em resposta à carga mecânica (Buchaman & Marsh 2001; Marqueti et al., 2008).

É interessante notar que as diferenças observadas nas propriedades biomecânicas dos três tendões em resposta ao treinamento coincidiram com os efeitos opostos sobre o conteúdo da forma ativa da MMP-2: o TC mostrou uma diminuição da quantidade de MMP-2 ativa, enquanto a TFP e SFT apresentaram quantidades aumentadas da forma ativa desta enzima. Por outro lado, os três tendões se comportaram igualmente no grupo EAA e EAAT, com flexibilidade reduzida e correspondente redução do conteúdo da forma ativa da MMP-2 (Marqueti et al., 2008).

Os presentes resultados permitem a distinção de dois tipos de adaptabilidade do tendão. Os tendões podem se tornar mais flexíveis (ou elásticos) (como o TC) ou tornarem-se mais rígidos (como o TFP e TFS), dependendo da função desempenhada pelo músculo correspondente durante os movimentos necessários. Isso confirma a hipótese de que diferentes tendões possuem funções distintas em um conjunto de movimentos, modulando o remodelamento da matriz extracelular e adaptação às novas demandas fisiológicas. Considerando que a capacidade de suportar carga e modular a elasticidade são características inerentes aos tendões e que essas propriedades são adaptadas de forma diferenciada pelo exercício, o EAA promoveu efeitos negativos aumentando a rigidez do tendão (ou seja, menor elasticidade e capacidade de resistir à carga) e o comprometendo a capacidade de se adaptar a diferentes movimentos e rotinas de treinamento. Além disso, o uso abusivo e indiscriminado dos EAA em associação com o treinamento comprometeu a capacidade do tendão de se adaptar individualmente para exercícios complexos, colocando-os em maior risco de ruptura. Resumindo, o uso descontrolado dos EAA durante o treinamento de alta *performance* compromete a função do tendão e o risco de ruptura é um preço demasiado alto a pagar.

Perspectivas

Em estudos futuros, seria muito interessante analisar as propriedades mecânicas em diferentes protocolos de exercício, tais como o exercício em esteira rolante, escalada, salto em solo, pois os efeitos do impacto podem ser minimizados em exercícios aquáticos, como o usado neste estudo. Além disso, diversas doses ou a associação de 2 ou 3 diferentes EAA também poderiam ser estudadas. Ainda, seria muito importante avaliar diferentes metodologias de ensaios mecânicos, tanto nos tendões e como nos músculos relacionados anatomicamente com esses tendões, não apenas para melhorar a compreensão da eficiência mecânica no complexo mio-tendíneo, mas também para entender melhor os efeitos dos EAA.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Vitor Luiz Sordi pela ajuda com o ensaio mecânico, a Alexandre Bruni Cardoso pela ajuda fornecida com a apresentação e análise estatística dos dados e ao apoio financeiro, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo: 06/50986-6).

Referências

- Battista V, Combs J, Warne WJ (2003) Asynchronous bilateral Achilles tendon ruptures and androstenediol use. *Am J Sports Med* 31: 1007-1009
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Gomes L (2004) Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res* 5: 206-215
- Benjamin M, Kaiser E, Milz S (2008) Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat* 212: 211-228

- Birch HL (2007) Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *Int J Exp Pathol* 88: 241-248
- Birch HL, McLaughlin L, Smith RK, Goodship AE (1999) Treadmill exercise-induced tendon hypertrophy: assessment of tendons with different mechanical functions. *Equine Vet J* Suppl 30: 222-226
- Buchanan CI, Marsh RL (2002) Effects of exercise on the biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol A* 133: 1101-1107
- Carpenter JE, Flanagan CL, Thomopoulos ST, Yian EH, Soslowky LJ (1998) The effects of overuse combined with intrinsic or extrinsic alterations in an animal model of rotator cuff tendinosis. *Am J Sports Med* 26: 801-807
- Carvalho HF, Vidal BC (1995) The elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog. *Ann Anat* 177: 397-404
- Couppé C, Koongsgaard M, Aagaard P, Hansen P, Bojsen-Moller J, Kjaer M, Magnusson SP (2008) Habitual loading results in tendon hypertrophy and increased stiffness of the human patellar tendon. *J Appl Physiol* 105: 805-810
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF (2001) Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cell* 33: 483-490
- Crevier N, Pourcelot P, Denoix JM, Geiger D, Bortolussi C, Ribot X, Sanaa M (1996) Segmental variations of in vitro mechanical properties in equine superficial digital flexor tendons. *Am J Vet Res* 57: 1111-1117
- Cunha TS, Tanno AP, Moura MJCS, Marcondes FK (2005) Influence of high-intensity training and anabolic steroids treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci* 77: 1030-1043

- Devkota AC, Weinhold PS (2003) Mechanical response of tendon subsequent to ramp loading to varying strain limits. *Clin Biomech* 18: 969-974
- Esquisatto MA, Joazeiro PP, Pimentel ER, Gomes L (2007) The effect of age on the structure and composition of rat tendon fibrocartilage. *Cell Biol Int* 31: 570-577
- Evans NA, Bowrey DJ, Newman G (1998) Ultrastructural analysis of ruptured tendon from anabolic steroid users. *Injury* 29: 769-773
- Inhofe PD, Grana WA, Egle D, Min KW, Tomasek J (1995) The effects of anabolic steroids on rat tendon. An ultrastructural, biomechanical, and biochemical analysis. *Am J Sports Med* 23: 227-232
- James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB (2008) Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am* 33: 102-112
- Kjaer M, Langberg H, Miller BF, Boushel R, Cramer R, Koskinen S, Heinemeier K, Olesen JL, Dossing S, Hansen M, Pedersen SG, Rennie MJ, Magnusson P (2005) Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5: 41-52
- Koongsgaard M, Reitelseder S, Pedersen TG, Holm L, Aagaard P, Kjaer M, Magnusson SP (2007) Region specific patellar tendon hypertrophy in humans following resistance training. *Acta Physiol (Oxf)* 191: 111-131
- Kramhøft M, Solgaard S (1986) Spontaneous rupture of the extensor pollicis longus tendon after anabolic steroids. *J Hand Surg* 11: 87
- Laseter JT, Russell JA (1991) Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 23: 1-3

- Lichtwark GA, Wilson AM (2000) Is Achilles tendon compliance optimized for maximum muscle efficiency during locomotion? *J Biomech* 40: 1768-1775
- Magnusson SP, Hansen P, Kjær M (2003) Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 13: 211-223
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol Lett* 158: 167-175
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS (2006) Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am J Sport Med* 34: 1274-1280
- Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF, Selistre-de-Araujo HS (2008) Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol* 104: 1087-1093
- Michna H (1987) Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int Orthop* 11: 157-162
- Miles JW, Grana WA, Egle D, Min KW, Chitwood J (1992) The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint Surg Am* 74: 411-422
- Nakagaki WR, Biancalana A, Benevides GP, Gomes L (2007) Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. *Connect Tissue Res* 48: 219-228

- Pope HG Jr, Katz DL (1988) Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroids use. *Am J Psychiatry* 145: 487-490
- Probst A, Palmes D, Freise H, Langer M, Joist A, Spiegel HU (2000) A new clamping technique for biomechanical testing of tendons in small animals. *J Invest Surg* 13: 313-318
- Rees JD, Wilson AM, Wolman RL (2006) Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology* 45: 508-521
- Reeves ND (2006) Adaptation of the tendon to mechanical usage. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 6: 174-180
- Reeves ND, Narici MV, Maganaris CN (2003) Strength training alters the viscoelastic properties of tendons in elderly humans. *Muscle Nerve* 28: 74-81
- Rosager S, Aagaard P, Dyhre-Poulsen P, Neergaard K, Kjaer M, Magnusson SP (2002) Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand J Med Sci Sports* 12: 90-98
- Schechtman H, Bader DL (1997) In vitro fatigue of human tendons. *J Biomech* 30:829-835
- Shadwick RE (1990) Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J Appl Physiol* 68: 1033-1040
- Sommer HM (1987) The biomechanical and metabolic effects of a running regime on the Achilles tendon in the rat. *Int Orthop* 11: 71-75
- Stannard JP, Bucknell AL (1993) Rupture of the triceps tendon associated with steroid injections. *Am J Sports Med* 21: 482-485
- Tohyama H, Yasuda K (2000) The effects of stress enhancement on the extracellular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J Biomech* 35: 559-565

Viidik A (1967) The effect of training on the tensile strength of isolated rabbit tendons. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1: 141-147

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

Visuri T, Lindholm H (1993) Bilateral distal biceps tendon avulsions with use of anabolic steroids. *Med Sci Sport Exer* 26: 941-944

Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M (1998) Characterization of collagen and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16: 457-470

Wang JH (2006) Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 39: 1563-1582

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

Tabela I

Tabela I – Variação na área de secção transversa e propriedades materiais do TC, TFS e TFP em resposta ao exercício de salto (T), esteróides anabólicos androgênicos (EAA), e simultâneo exercício de salto e EAA (EAAT). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média ($p < 0,05$).

Tendões	Grupos	Propiedades				
		Área de secção transversa (mm ²)	Deslocamento até a carga máxima (mm)	Tensão máxima (MPa)	Deformação máxima (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
TC	S	1.47 \pm 0.05	1.32 \pm 0.11	37.88 \pm 2.97	12.01 \pm 1.00	136.0 \pm 10.2
	T	1.38 \pm 0.03	1.43 \pm 0.12	41,55 \pm 4.02	15.61 \pm 0.65 ^a	71.1 \pm 15.5
	EAA	0.92 \pm 0.04 ^{a,b}	1.61 \pm 0.18	44,19 \pm 1.83	12.42 \pm 0.94	181.1 \pm 21.3 ^b
	EAAT	1.43 \pm 0.04 ^c	1.41 \pm 0.14	39.97 \pm 4,40	10.80 \pm 0.85 ^b	196.5 \pm 37.3 ^{b,c}
TFS	S	0.84 \pm 0.06	1.77 \pm 0.12	30.68 \pm 3.16	17.58 \pm 1.37	79.1 \pm 10.7
	T	0.83 \pm 0.04	1.91 \pm 0.08	30.39 \pm 1.02	18.86 \pm 2.54	116.7 \pm 17.9
	EAA	0.91 \pm 0.03	2.04 \pm 0.22	29.72 \pm 1.45	14.69 \pm 0.96	119.4 \pm 13.7
	EAAT	0.70 \pm 0.03 ^c	1.59 \pm 0.16	30.84 \pm 0.91	12.79 \pm 0.85	148.4 \pm 4.7 ^a
TFP	S	2.11 \pm 0.06	1.73 \pm 0.12	23.49 \pm 2.73	16.64 \pm 2.01	77.8 \pm 5.3
	T	1.49 \pm 0.03 ^a	1.86 \pm 0.11	41.40 \pm 1.36 ^a	19.18 \pm 1.48	128.8 \pm 13.0 ^a
	EAA	1.70 \pm 0.04 ^{a,b}	1.92 \pm 0.14	30.83 \pm 5.01	17.90 \pm 0.89	129.8 \pm 15.8 ^a
	EAAT	1.39 \pm 0.05 ^{a,c}	1.06 \pm 0.05 ^{a,b,c}	16.40 \pm 1.10 ^{b,c}	9.07 \pm 0.63 ^{a,b,c}	77.8 \pm 5.9 ^{b,c}

^a Diferente do grupo S; ^b Diferente do grupo T; ^c Diferente do grupo EAA. ANOVA seguida por teste de Tukey.

Tabela II

Table II - Análise da ANOVA *Two-way* para área de secção transversa e dados das propriedades materiais obtidos do TC, TFS e TFP em resposta ao exercício de salto (T), EAA, e interação de ambos (EAAT). N.S., variação não-significativa.

Tendões	Parâmetros	Treinamento	EAA	Interação
TC	Área de secção transversa	0.000079	0.000011	0.000001
	Deslocamento até a carga máxima	N.S.	N.S.	N.S.
	Tensão máxima	N.S.	N.S.	N.S.
	Deformação máxima	N.S.	0.019636	0.007126
	Módulo de elasticidade	N.S.	0.001970	N.S.
TFS	Área de secção transversa	0.016034	N.S.	0.027200
	Deslocamento até a carga máxima	N.S.	N.S.	N.S.
	Tensão máxima	N.S.	N.S.	N.S.
	Deformação máxima	N.S.	0.010197	N.S.
	Módulo de elasticidade	0.016805	0.010731	N.S.
TFP	Área de secção transversa	0.000000	0.000019	0.002870
	Deslocamento até a carga máxima	0.003235	0.009953	0.000178
	Tensão máxima	N.S.	0.007752	0.000026
	Deformação máxima	0.032046	0.004036	0.000469
	Módulo de elasticidade	N.S.	N.S.	0.000237

Figura 1

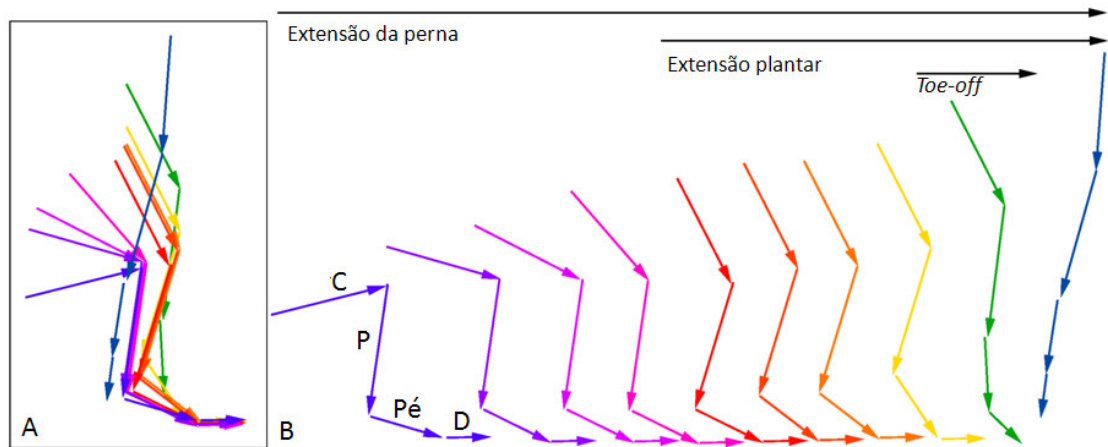


Figura 1. Desenho esquemático obtido a partir de gravação na parte ascendente do salto vertical do rato nas condições experimentais usadas. (A série) sobrepostas de movimentos das coxas (C), perna (P), pé (Pé), e dedos (D). (B) A seqüência dos eventos da perna do rato consiste de extensão da perna, extensão plantar, e *toe-off*. A série foi composta de 10 frames e cada frame consistiu em 0,03 s. Extensão de perna durou o tempo inteiro da série, enquanto a extensão plantar compôs a segunda metade do movimento. O *toe-off* foi uma fase rápida, durando cerca de 0,03 s, imediatamente antes do *takeoff* (decolagem).

Figura 2

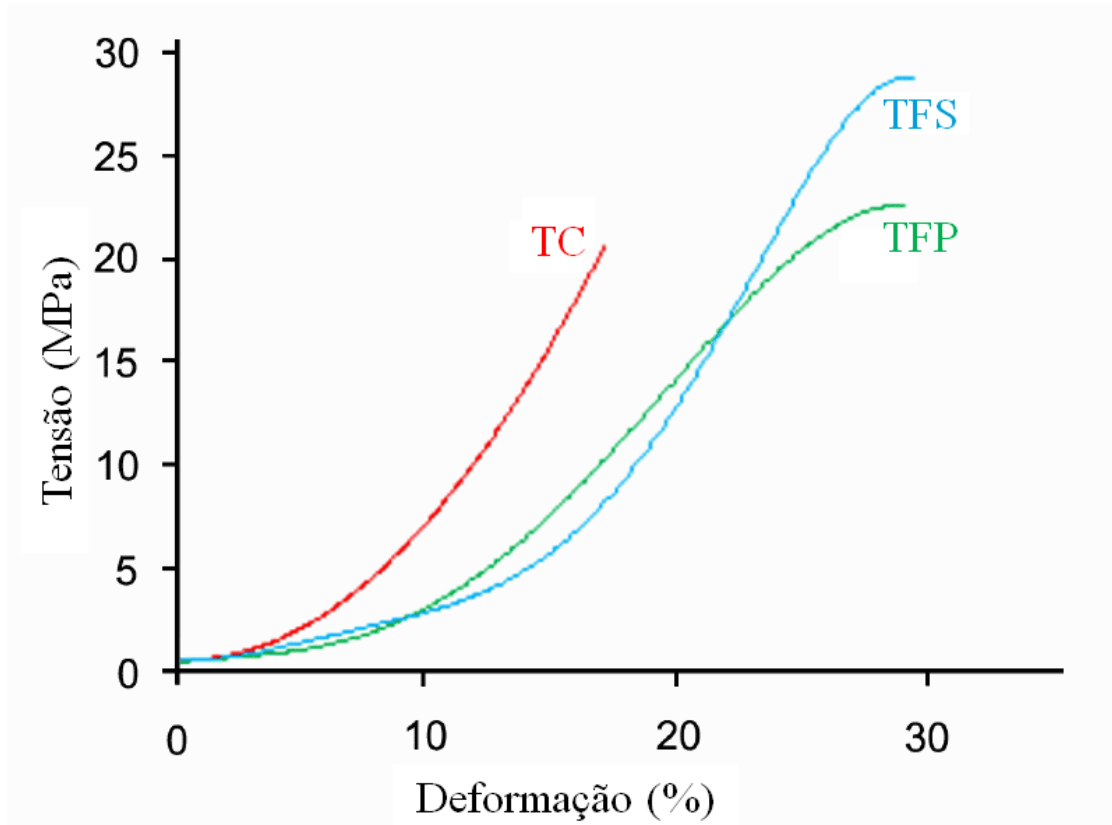


Figura 2 Curvas tensão-deformação obtidas para o TC, TFS e TFP no grupo S. Fica evidente que o TFS e TFP se comportaram de forma semelhante no grupo sedentário, diferindo do TC. O perfil da curva indica que o TFS e TFP se deformam mais sob tensão, mas foram capazes de resistir a forças semelhantes.

Figura 3

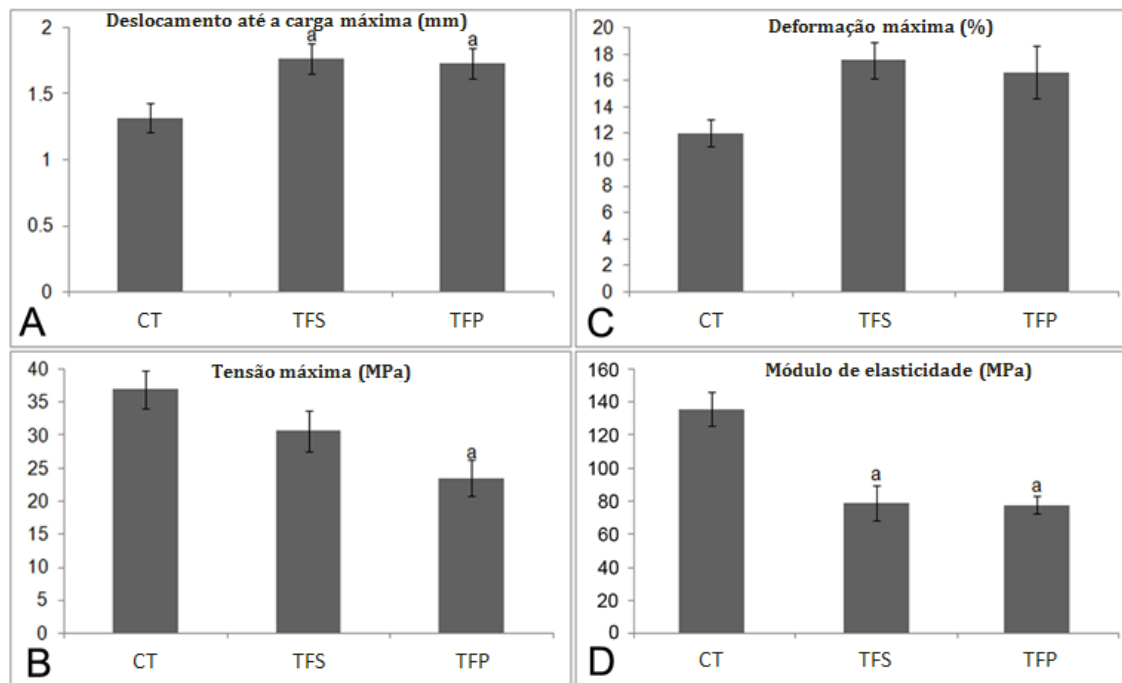


Figura 3 Propriedades materiais dos tendões TC, TFP e TFS (comparação entre os tendões do grupo sedentário). São apresentados o deslocamento até a carga máxima (A), tensão máxima (B), deformação máxima (C) e módulo de elasticidade (D). Os ensaios mecânicos dos diferentes tendões apontou que o TC possui menor deslocamento até a carga máxima, maior tensão e maior módulo de elasticidade do que o TFP e TFS. Estes últimos mostraram propriedades semelhantes. Esses resultados demonstram que o TC foi mais resistente e menos deformável, em resposta à tensão. Os dados foram apresentados como média \pm SEM ($p < 0,05$).

Figura 4

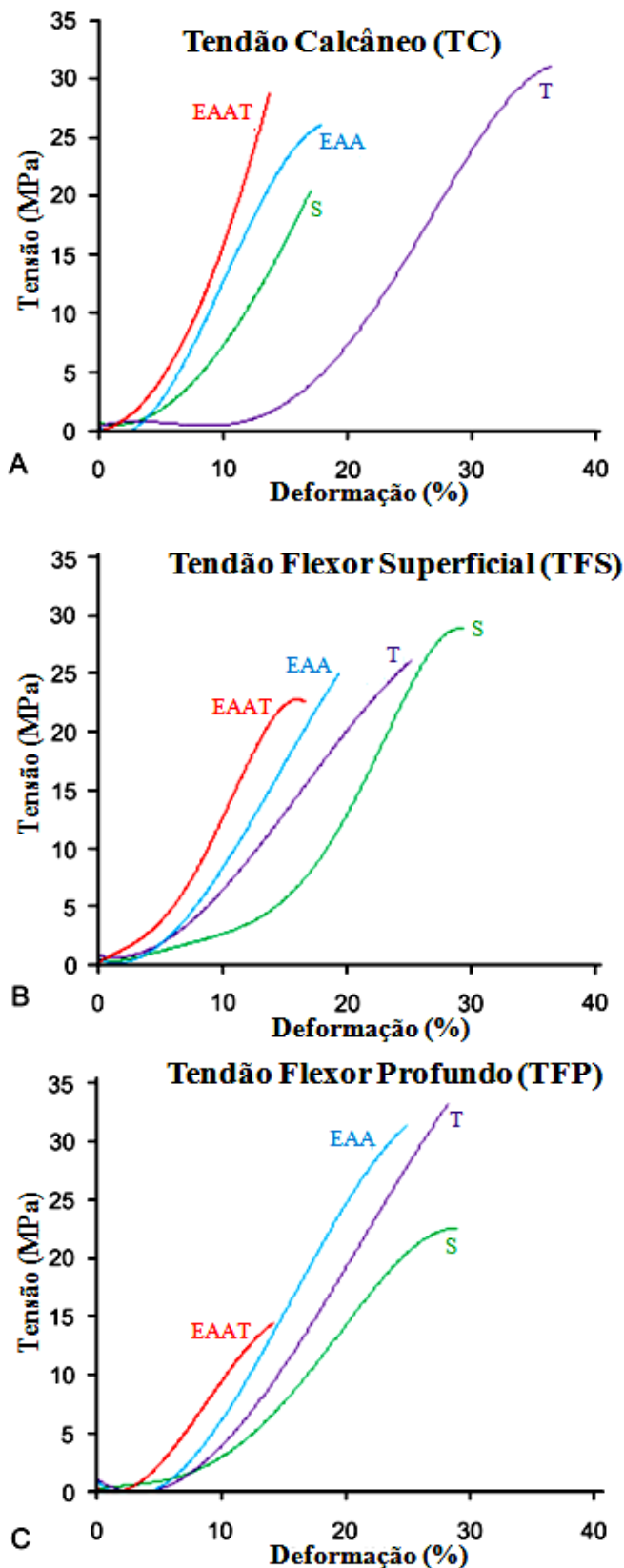


Figura 4 Curvas tensão-deformação obtidas para TC (A), TFS (B) e TFP (C) em resposta ao exercício de carga (T), administração de EAA (EAA), e da associação de EAA e exercício de carga (EAAT). Fica evidente que o treinamento de salto apresentou um comportamento diferente em cada tendão. Apesar de a capacidade dos tendões em se adaptar às condições fisiológicas, as respostas dos três tendões com relação ao tratamento com EAA e exercício de carga (EAAT) foram semelhantes.

7 MANUSCRITO IV - em fase de redação



Botanisk Have - Copenhagen - Dinamarca

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE DIFERENTES TENDÕES DE RATOS APÓS
EXERCÍCIO DE CARGA E ADMINISTRAÇÃO DE ESTERÓIDES ANABÓLICOS
ANDROGÊNICOS**

¹Rita de Cássia Marqueti, ¹Marcelo Gustavo Paulino,¹Sérgio Eduardo de Andrade Perez,
¹Marisa Narciso Fernandes, ²Edilamar Menezes de Oliveira, ³Hernandes Faustino de
Carvalho, ¹Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São
Paulo; ²Laboratório de Bioquímica da Atividade Motora - Escola de Educação Física e
Esporte da Universidade de São Paulo;³Departamento de Biologia Celular, Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Resumo

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) podem predispor alterações morfofuncionais e acarretar ruptura aos tendões. Porém, pouco se sabe sobre a influência dessas drogas na camada peritendínea e área interna de diferentes regiões dos tendões. Assim, este trabalho teve como principal objetivo avaliar as alterações morfológicas e o conteúdo de colágeno em diferentes regiões do tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) quando aplicado exercício de carga associado ou não a EAA. Ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 5/grupo): sedentário (S), treinados (T), tratados com EAA (5 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana) (EAA) e animais tratados com EAA e treinados (EAAT). Os tendões foram processados e analisados por meio da técnica de histologia morfometria e quantificação de hidroxiprolina (OH-Pro). Os principais achados mostram que o treinamento aumentou a densidade de volume (Vv%) de vasos sanguíneos em todas as regiões do TC e TFP; aumentou a Vv% de células da camada peritendínea nas regiões proximal e distal do TFS e proximal do TFP; aumentou a Vv% de células do tendão propriamente dito nas regiões proximal e distal do TFS e TFP. A administração de EAA isolada não mostrou alterações significativas sobre a morfologia, exceto a ocorrência de células redondas e alinhadas contornando internamente a camada peritendínea da região distal do TC e diminuição da concentração de OH-Pro na região proximal do TFP. Porém, a associação de EAA e exercício de carga apresentou como principal efeito negativo a detenção do aumento da Vv% de vasos na região proximal do TC, intermediária do TFS e todas as regiões do TFP e um aumento exacerbado da Vv% de células adiposas na região proximal do TC. Resultados semelhantes foram encontrados em relação à concentração de OH-Pro, em geral o treinamento aumentou e a associação de EAA e exercício reduziu o conteúdo de OH-Pro. Em conclusão, o exercício promove modificações morfológicas benéficas para adaptação do tecido à sobrecarga. No entanto, esse efeito parece ser perdido quando há associação de EAA e exercício de carga e esta implicação negativa pode acarretar potencial risco de lesão aos tendões.

Palavras-chave: tendão, esteróides anabólico-androgênicos (EAA), exercício de carga, histologia, hidroxiprolina.

Introdução

Nos tendões como nos demais tecidos conjuntivos, há uma predominância de matriz extracelular (MEC) sobre os componentes celulares (Wang, 2006). Neles a MEC é altamente organizada em uma estrutura multihierárquica de moléculas de colágeno, fibrilas, fibras, fascículos e unidades de tendões (Silver et al., 2003; Kjær, 2004, Provezano, Vanderby, 2006).

Os arranjos adotados pelo colágeno e suas associações com outras moléculas resultam numa série de propriedades especiais para resistir às forças de tensão, compressão e fricção (Benjamin, Ralphs, 1998). Estas regiões de fibrocartilagem são exemplos de extrema organização da estrutura e composição da MEC dos tendões para resistir ao atrito e cargas compressivas e sem comprometer a transmissão de forças dos músculos para os ossos (Carvalho, 1995a; Felisbino, Carvalho 1999; Shaw, Benjamin, 2007; Malheiro et al., 2009) As diferenças nas microestruturas do tendão ao longo do seu comprimento são principalmente reflexos das diferentes cargas mecânicas aplicadas (Abrahamsson et al., 1989; Carvalho, 1995b; Waggett et al., 1998). Adicionalmente, quando os tendões passam por estruturas ósseas que causam compressão, há a formação de uma camada sinovial que possui a finalidade de reduzir a fricção (Abrahamsson et al., 1989).

O treinamento modifica as propriedades estruturais e mecânicas (Magnusson, et al., 2003), bem como a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno nos tendões (Woo, 1982; Benjamim et al., 2008). Trabalhos prévios mostraram aumento do número de fibroblastos na região peritendínea e aumento da atividade de metalopeptidase (MMP-2) em animais que realizaram treinamento de salto com carga durante 6 semanas (Marqueti, et al 2006) e 7 semanas (Marqueti et al 2008).

O consumo de esteróides anabólicos androgênicos (EAA) tem efeitos adversos sobre o sistema musculotendíneo, aumentando o risco de rupturas nos tendões (Battista et al., 2003; Maravelias et al., 2005). Michna (1987) observou que a administração de EAA em ratos causou um acúmulo de colágeno na matriz extracelular e desordens no tecido conjuntivo. Inhofe e colaboradores (1995) observaram aumento da rigidez, diminuição do alongamento e menor absorção de energia, e estes efeitos são potencializados pela associação de EAA com exercícios. Outro estudo relatou que a atividade da MMP-2 foi inibida em diferentes regiões de tendões de ratos com administração de EAA ou associação de EAA e exercício de carga (Marqueti et al., 2008). Em adição, os EAA também comprometeram o remodelamento do tendão calcâneo estrutural e funcionalmente por reduzir a atividade de MMP-2, além de indicar sinais de lesão tecidual nos achados histológicos (Marqueti et al., 2006).

As regiões proximal e distal do tendão calcâneo (TC), e as regiões proximal, intermediária e distal do tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) foram estudadas por Covizi e colaboradores (2001) em ratos de 90 dias de idade. Os autores demonstraram que há variações na morfologia e na quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) entre as regiões de cada tendão. Recentemente, Malheiro e colaboradores (2009) analisaram o tendão calcâneo de ratos divididos entre grupos controle, adaptados à água (3 dias sem sobrecarga), que realizaram saltos verticais (4 séries/10 saltos, 50% de carga durante 4 dias) e animais que correram (30 mim/dia, 13 m/mim, 5 graus de inclinação, durante 4 dias). Este trabalho mostrou que 3 dias após a adaptação dos animais à água foi observado um aumento da espessura e da vascularização na região peritendínea, e 1 e 4 dias após os exercícios de salto e corrida houve aumento também da celularidade.

Neste contexto, o principal objetivo do presente estudo foi verificar as alterações morfológicas e o conteúdo de colágeno da camada peritendínea e área interna, de três tendões diferentes quando aplicado exercício de carga associado ou não ao esteróide anabólico,

decanoato de nandrolona. A hipótese foi que o treinamento, por meio do mecanismo de carga, pode promover alterações morfológicas benéficas para adaptar o sistema músculo-tendíneo, enquanto que altas doses de EAA pode reduzir essa habilidade de adaptação.

Material e métodos

Animais: Vinte ratos (*Wistar novergicus albinus*, pesando aproximadamente 200 ± 17 g, no início do experimento) foram agrupados em 4 gaiolas de plástico, à temperatura ambiente com luz controlada em ciclo de 12 h (claro escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o guia de pesquisa para o cuidado e utilização de animais de laboratório (National Research Council, 1996). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, processo n°. 002/2006, parecer 004/2006.

Grupos experimentais: Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (5 animais/grupo), na seguinte ordem: sedentários sem suplementação de EAA (S), sedentário com suplementação de EAA (EAA), treinado sem suplementação de EAA (T), e exercitado com suplementação de EAA (EAAT).

Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a um programa de exercício (saltos) em um tubo de plástico 25 centímetros de diâmetro, contendo uma quantidade de água equivalente ao dobro do comprimento do corpo do animal, com temperatura constante de 30 ± 2 ° C. Após a semana de adaptação os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento que consistiu de 7 semanas (5-d/semana).

Administração de EAA: Os animais receberam Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil). Doses de 5 mg/kg de massa corporal (dose

suprafisiológica) foram injetadas por via subcutânea na região dorsal dos animais duas vezes por semana. Esta dosagem foi análoga à dosagem frequentemente utilizada por atletas (Pope, 1988). Os grupos experimentais que não tiveram administração de EAA (S e T) receberam um veículo apenas com óleo de amendoim e álcool benzílico. O decanoato de nandrolona foi administrado durante 7 semanas com início na primeira semana de treinamento, após a semana de adaptação.

Protocolo de treinamento: Os animais foram adaptados à água na semana pré-treinamento (semana de adaptação). Esta adaptação consistiu de sessões de levantamento de peso (50% da carga de peso corporal), uma vez por dia durante 5 dias em água a $30 \pm 2^\circ \text{C}$. A sobrecarga foi fixada no peito do animal, usando um colete adequado que permitia a execução dos saltos sem que a vestimenta caísse do corpo do mesmo. O número de séries (2-4) e repetições (5-10) foi ajustado diariamente e aumentado gradualmente. Todas as sessões sempre foram realizadas no período da tarde, após as 16:00 horas. Após a semana de adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento de saltos, com sobrecarga ajustada de acordo com o peso corporal do animal, como descrito anteriormente (Cunha et al., 2005; Marqueti et al., 2006). O protocolo de saltos consistiu de uma primeira semana de treinamento, em que o animal executou 4 séries de 10 saltos, um período de descanso de 30 segundos entre as séries e sobrecarga de 50% do peso corporal. Durante as seis semanas restantes o treinamento foi executado com o mesmo número de séries (4) e saltos (10) e intervalos de descanso (30 segundos entre as séries), porém, com uma sobrecarga adicional de 5%/semana, chegando a 80% do peso corporal na última semana. Todos os animais foram pesados três vezes/semana.

Preparação do tecido: Após sete semanas experimentais, uma última sessão de treinamento foi realizada antes do sacrifício dos animais. Os tendões calcâneo, flexor superficial e flexor profundo foram imediatamente dissecados das patas posteriores. O TC foi dividido nas regiões proximal e distal e o SFT e DFT nas regiões proximal, intermediária e distal. Os

tendões podem ser visualizados na figura 1. Cada região foi fixada por imersão em formaldeído 4% em tampão salina fosfato (PBS) por 24 horas, lavadas com água destilada, desidratadas em etanol 70% e incluídas em resina glicol metacrilato (historresina, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). Cortes seriados longitudinais de 2 μm foram obtidos com navalhas de vidro e corados com hematoxilina-eosina para as análises histológicas. Os cortes foram examinados utilizando um microscópio Olympus BX51 equipado com uma câmera digital SV Micro Sound Vision (Preston South, Australia). Todas as imagens foram capturadas em 20x de aumento.

Análise das imagens: Todas as regiões de cada tendão foram analisadas levando em consideração duas partes: a camada peritendínea (ou bainha peritendinosa) e a área interna (interior do tendão). Dez imagens não-consecutivas foram adquiridas em cada uma das partes (peritendínea e interna). Para a análise das imagens foi utilizado o software Photoshop (Adobe Systems Inc, San Jose, Calif). Um sistema de planimetria com uma grade de 130 pontos interfaceado com Photoshop foi utilizado para determinar a densidade de volume ($V_v\%$) de células adiposas, vasos sanguíneos (luz do vaso, camada perivascular, células endoteliais), células da camada peritendínea (outras células) e das células do tendão propriamente dito (fibroblastos e fibrocondrócitos) de acordo com o método de Weibel (1969). A estereologia foi realizada contando as estruturas acima citadas quando estas coincidiam com os pontos indicados pela grade. Após a contagem, foi determinada a porcentagem das estruturas da camada peritendínea e da área interna tendo como referência o número de pontos da grade que incidiam sobre estas camadas. O número de pontos da camada peritendínea variou de acordo tamanho da mesma enquanto a área interna foi completamente preenchida pelos pontos da grade (130 pontos). A densidade de volume foi calculada multiplicando-se a soma do número de pontos da grade coincidentes com as estruturas de interesse por 100, dividindo-se pelo

número total de pontos incidentes sobre as partes (camada peritendínea e área interna). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Hidroxirolina

A concentração de hidroxiprolina (OH-Pro) foi realizada para estimar a variação no conteúdo de colágeno das diferentes regiões dos tendões. As regiões dos tendões foram hidrolisadas em HCl 8N (1 ml/100 mg de tecido), por 12 horas a 115 °C. A quantificação de OH-Pro foi realizada utilizando-se o método de Bergman e Loxley (1970) adaptado por Leite e colaboradores (1995).

Análise estatística: A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de Kolmogorov e Smirnov para a normalidade e o teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade e, portanto, a ANOVA *two way* seguida de análise múltipla de Tukey foi utilizada para comparações entre os tratamentos. Para as comparações entre as regiões proximal e distal do TC foi realizado teste *t* de *Student* e para as comparações entre as regiões proximal, intermediária e distal do TFS e TFP foi usada ANOVA *one way* seguida de análise múltipla de Tukey pareada. Para todas as comparações, a significância estatística foi considerado um nível de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). O software utilizado foi Statistica® 7.0 (Stat. Soft. Inc. Tusa, Ok, USA).

Resultados

Após sete semanas de exercício de carga associado à administração de decanoato de nandrolona os grupos exibiram diferenças histológicas consistentes entre si.

CT - comparação entre as regiões proximal e distal dos animais sedentários

Poucas células adiposas foram observadas apenas na região proximal do TC (Fig. 2A, Fig. 3A). As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas entre as regiões proximal e distal (Fig. 3B, C e D). Uma organização típica da camada peritendínea foi observada na região proximal e distal do TC de animais sedentários, sem diferenças notáveis entre estas duas regiões (Fig. 2A e B). Feixes paralelos e compactos de colágeno foram observados na região proximal e distal do tendão propriamente dito (Fig. 2C e D).

TC - comparação entre os grupos

Efeito do Treinamento: O exercício de carga acarretou um aumento da Vv% de vasos sanguíneos na camada peritendínea das regiões, proximal e distal do TC (Fig. 2E e F, Fig. 4 C e D). O exercício de carga induziu um aumento da Vv% de células adiposas apenas na região distal (Fig. 2F, Fig. 4B). Fibroblastos com citoplasma reduzido alinhados linearmente entre os feixes de colágeno dispostos longitudinalmente foram visualizados tendão propriamente dito da região proximal (Fig. 2G). Na região distal os fibroblastos exibiram uma forma ovalada (Fig. 2H). Esta morfologia pode ser devido à ação das forças (de compressão) aplicadas nesta região tipicamente caracterizada como fibrocartilagem.

Efeito do tratamento com EAA: O tratamento com EAA aumentou a Vv% de células apenas na camada peritendínea da região distal (Fig. 2J, Fig. 4F). Curiosamente, ao redor da camada peritendínea da região distal, foram observadas células redondas e alinhadas (indicado por cabeça de setas, Fig. 2J) sugerindo a presença de células semelhantes às sinoviais. Na região distal do TC o tendão propriamente dito apresentou fibroblastos com forma alongada dispostos linearmente (Fig. 2L).

Efeito da Associação EAAT: Na região proximal do TC a administração de EAA associada ao exercício de carga promoveu aumento da Vv% de células adiposas (Fig. 2M , Fig. 4A). O

EAA associado ao treinamento reduziu fortemente a Vv% de vasos sanguíneos na camada peritendínea quando comparado com animais que realizaram somente o treinamento (Fig. 4C). Assim, o exercício de carga quando associado à administração de EAA parece não ser capaz de proteger do efeito negativo do decanoato de nandrolona sobre a Vv% de vasos sanguíneos (Fig. 4C e D). Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais relativo à Vv% de células do tendão propriamente dito nas regiões proximal e distal do TC (Fig. 2C, D, G, H, K, L, O e P, Fig. 4G e H).

TFS - comparação entre as regiões proximal, intermediária e distal dos animais sedentários

O TFS apresentou diferenças morfológicas interessantes entre a região proximal, intermediária e distal dos animais sedentários. Uma das observações mais importantes foi a presença de células de gordura apenas na camada peritendínea da região proximal dos animais sedentários (Fig. 5A, Fig.6A, e Fig. 7A). A região intermediária apresentou aumento na Vv%: de vasos sanguíneos, de células da camada peritendínea e de células do tendão propriamente dito (Fig. 5C, Fig. 6C e D, respectivamente).

TFS - comparações entre os grupos

Efeito do Treinamento: O exercício de carga promoveu aumento da Vv% de células na camada peritendínea nas regiões proximal, intermediária e distal do TFS (Fig. 5G, I e K, Fig. 7G, H e I, respectivamente). Além disso, na região intermediária, a camada peritendínea apresentou sítios de fibrocartilagem com células de formato redondo e não alinhadas (Fig. 5I). Esta organização típica de fibrocartilagem parece ser restrita à superfície articular. No entanto, interessantemente, o treinamento parece reforçar esta resposta morfológica. Com relação ao tendão propriamente dito, o exercício de carga promoveu aumento da Vv% de células nas regiões proximal e distal (Fig. 5H e L, Fig. 7J e L).

Efeito do EAA: O tratamento com EAA no TFS não mostrou alteração de nenhuma das variáveis quando administrado isoladamente.

Efeito da associação EAAT: A associação dos EAA e exercício de carga diminuiu a Vv% da de vasos sanguíneos na região intermediária (Fig. 5U, Fig. 7E). Nas regiões proximal e distal, não foram observadas diferenças entre os grupos (Fig.7D e F, respectivamente). Com relação ao tendão propriamente dito, a Vv% de células aumentou na região proximal e diminuiu na região intermediária (Fig. 5T e V, Fig.7J e K, respectivamente). Curiosamente, foi observado na camada peritendínea da região intermediária células atípicas, redondas, condensadas e com matriz pericelular abundante (células semelhantes às sinoviais) (Fig. 5U).

TFP - comparação entre as regiões proximal, intermediária e distal dos animais sedentários

A região distal da TFP mostrou maior Vv% de vasos sanguíneos que as demais regiões (Fig. 8E, Fig. 9B). As regiões intermediária e distal apresentaram maior Vv% de células na camada peritendínea (Fig. 8C e E, Fig.9C). No tendão propriamente dito a região intermediária apresentou maior Vv% de células (Fig. 8D, Fig. 9D). Ainda, no tendão propriamente dito da região intermediária os fibroblastos possuem forma ovalada (Fig. 8D), enquanto nas regiões proximais e distais foram observadas células alongadas, em forma de fuso e achatadas (Fig. 8B e F).

TFP - comparações entre os grupos

Efeito do Treinamento: O exercício de carga aumentou a Vv% de vasos sanguíneos na região proximal, intermediária e distal da camada peritendínea no TFP (Fig. 8G, I e K, Fig. 10D, E e F, respectivamente). As células da camada peritendínea apresentaram maior Vv% na região

proximal (Fig. 8I, Fig. 10G), as demais regiões não mostraram diferenças entre os grupos (Fig. 10H e I). Células semelhante às sinoviais foram observadas na borda da camada peritendínea das regiões proximal e intermediária (Fig. 8G e I, nesta ordem). No tendão propriamente dito, o exercício de carga promoveu aumento da Vv% de células nas regiões proximal e distal (Fig. 8H e L, Fig. 10J e L, respectivamente). Observou-se que os fibroblastos da região proximal possuem formato redondo, dispostos em lacunas e separados com ampla matriz pericelular (Fig. 8H). Nos demais grupos, ao contrário, os fibroblastos dessa região são mais alongados e em forma de fuso (Fig. 8B, N e T).

Efeito do EAA: Apenas na região intermediária da camada peritendínea foi observado um aumento da Vv% de vasos sanguíneos (Fig. 8O, Fig. 10E). No entanto, no tendão propriamente dito, ocorreu a diminuição da Vv% de células na região intermediária (Fig. 8P, Fig. 10K).

Efeito da associação EAAT: O principal achado quanto a associação do EAA e exercício de carga foi a contenção da Vv% de vasos na região proximal, intermediária e distal (Fig. 8S, U e X, Fig. 10D, E e F, respectivamente). Ficou claro que o exercício de carga não foi capaz de reverter o efeito negativo do EAA, inibindo o aumento da Vv% de vasos em todas as regiões e o aumentou da Vv% de células dessa camada na região proximal (Fig. 8S, Fig. 10G), e inibindo também a Vv% das células do tendão propriamente dito (Fig. 8T, Fig. 10J e). As regiões intermediária e distal não demonstraram diferenças entre os grupos com relação à Vv% de células da camada peritendínea (Fig. 10H e I). No entanto, ambas as regiões demonstraram células semelhantes às sinoviais na borda da camada peritendínea (Fig. 8S e U). Não foram observadas células adiposas no TFP em nenhum dos grupos experimentais (Fig. 8A, C e E, Fig. 10A, B e C).

Concentração de Hidroxiprolina (OH-Pro)

O exercício de carga aumentou a concentração de OH-Pro nas regiões distal do TC (Fig. 11A), e intermediária e distal do TFP (Fig. 11C). A administração de EAA reduziu os níveis de OH-Pro na região proximal do TFP (Fig. 11C). Quando o exercício de carga foi combinado com EAA a concentração de OH-Pro diminuiu na região distal do TFS (Fig. 11B). Observa-se, no entanto que exercício de carga combinado com EAA não foi capaz de reverter os efeitos negativos do EAA, esse efeito é bem evidente na região intermediária do TFP (Fig. 11C).

Quando comparamos a concentração de OH-Pro entre as regiões dos animais sedentários observamos diferenças significativas em todos os tendões. A região distal do TC (Fig. 11D) apresentou maior concentração de OH-Pro. No TFS, a região intermediária e distal (Fig. 11E) apresentou maior concentração de OH-Pro que a região proximal, sendo que região distal também indica um maior conteúdo de OH-Pro que a intermediária. Com relação ao TFP (Fig. 11F) a região intermediária apresentou maior concentração de OH-Pro que a região proximal, porém esta última mostrou um conteúdo de OH-Pro maior que a região distal.

Discussão

Este trabalho avaliou os aspectos morfológicos e o conteúdo de colágeno nas diferentes regiões do TC, TFS e TFP. Os principais achados sugerem que os tendões possuem diferentes mecanismos de adaptação à carga mecânica e alteram a sua composição tecidual de acordo com a demanda e função regional. Evidentemente, até mesmo em atividades cotidianas, alguns tendões estão sujeitos a maiores cargas tensionais que outros apresentando assim propriedades mecânicas e estruturais distintas (Birch et al., 2008).

Animais sedentários: Em animais sedentários, foi observada uma interessante variação morfológica do ponto de vista funcional de cada tendão. A região intermediária do TFS

apresentou simultaneamente maior Vv% de células na camada peritendínea e no tendão propriamente dito, bem como maior Vv% de vasos. Além disso, as células e os feixes de colágeno da área interna apareceram dispostos de forma menos organizada, quando comparado com o arranjo tipicamente ordenado das células em paralelo com as fibras de colágeno. Na camada peritendínea deste tendão, este arranjo desorganizado fica ainda mais evidente. No tendão, regiões onde a tensão é exercida em todas as direções, os feixes de colágeno se entrelaçam sem orientação regular, enquanto em regiões onde a tensão é unidirecional, as fibras apresentam-se alinhadas preferencialmente na direção da força aplicada (O'Brien, 1997), assim o arranjo variado da região intermediária pode indicar que esta região do tendão está sujeita a forças aplicadas em direção diferente daquelas paralelas ao longo do tendão. A região intermediária do TFP também apresentou maior Vv% de células na camada peritendínea e no tendão propriamente dito. No entanto, no TFP a região distal mostrou maior Vv% de vasos comparada com as demais e a Vv% de células da camada peritendínea foi similar a região intermediária. Para entender essas diferenças, é necessário compreender que anatomicamente, as regiões intermediárias desses dois tendões são diferentes (TFS e TFP). Enquanto a região intermediária do TFP passa pelo maléolo lateral e pode deslizar sobre o mesmo quando da contração do músculo flexor digital profundo, a região intermediária do TFS, com formato mais achatado e menos flexível, encontra-se firmemente fixada à superfície articular túbio-társica restringindo o deslizamento desse tendão (Fig. 1).

Além disso, foi observada uma maior Vv% de vasos na região distal do TFP. Benjamin e colaboradores (2008) relataram que as regiões dos tendões que correm em direção aos dedos são bem vascularizadas, alternando com regiões hipovascularizadas no mesmo tendão. Do ponto de vista anatômico, a região distal do TFP se ramifica em cinco porções que se estendem aos dígitos (Covizi et al., 2001).

Neste trabalho, a região distal do TC, também descrita como uma região de compressão (Shaw, Benjamin, 2008), e a região intermediária do TFP, mostraram aspectos de fibrocartilagem, apresentando células redondas dispostas em lacunas. Este achado corrobora a descrição da literatura sobre as células de regiões fibrocartilagenosas (Covizi et al., 2001; Carvalho, Vidal, 1995a; Shaw, Benjamin, 2007). As células neste sítio são mais arredondadas, cujo fenótipo lembra os condrócitos (Vogel, Koob 1989; Perez-Castro, Vogel, 1999; Clegg et al., 2007; Newsham-West, 2007) apresentando uma matriz pericelular com uma maior concentração de proteoglicanos (Benjamin, Ralphs, 1998; Carvalho et al., 2000; Covizi et al., 2001; Carvalho et al., 2006). No atual trabalho, observamos que estas regiões (distal do TC e intermediária do TFP) nos animais que realizaram exercício de carga as características referentes ao fenótipo celular ficam ainda mais evidentes.

Já as regiões proximais dos três tendões e distal do TFS e TFP apresentaram fibroblastos com formato mais alongado e alinhados em paralelo com os feixes de colágeno. De acordo com Covizi e colaboradores (2001), estas regiões foram classificadas como mais fibrosas e tipicamente tensionais por apresentarem fibroblastos mais alongados e menor conteúdo de glicosaminoglicanos. Esse formato alongado e mais achatado dos fibroblastos parece ter uma relação direta com a direção da força aplicada (Kjaer et al., 2009) e representam células mais maduras entre os feixes de colágeno (Oshiro et al., 2003). Deste modo, a região proximal dos três tendões parece ter um metabolismo tecidual diferenciado, preservando o colágeno, contendo menor Vv% de células na periferia, no tendão propriamente dito e menor Vv% de vasos, porém esta pode assegurar a função de resistência às forças tensionais aplicadas durante a contração muscular.

Exercício de carga: A Vv% de células no tendão propriamente dito foi significativamente maior nos animais treinados, considerando o TFS e o TFP (região proximal e distal), além de um aumento da Vv% de células na camada peritendínea como resposta ao exercício de carga

no TFS (em todas as regiões) e no TFP (na região distal). Esta resposta celular ao exercício de carga pode ser explicada pelo aumento da demanda tecidual local, aumento do *turnover* do tecido conjuntivo e proteínas da MEC, em virtude do aumento da força de contração muscular, que promove estímulo mecânico para a síntese de colágeno (Kjaer et al., 2009). Assim, os fibroblastos respondem convertendo o estímulo mecânico em sinais químicos para modificar a expressão gênica aumentando a síntese de colágeno bem como dos componentes da MEC (Chiquet, 1999; Kjaer, 2004; Chiquet, 2009). O tecido conjuntivo peritendíneo reflete muitas das modificações que ocorrem no interior do tendão (Langberg et al., 2002) como por exemplo, o aumento do pro-peptídeo carboxiterminal do pró-colágeno tipo I (PICP) no espaço intersticial peritendíneo em resposta ao exercício físico agudo indica maior síntese de colágeno em tendão calcâneo de humanos (Langberg et al., 2001; Langberg et al., 2002; Kjaer, 2004). Malheiro e colaboradores (2009) mostraram aumento da celularidade e da espessura da camada peritendínea no tendão calcâneo de ratos após 1 dia de salto vertical e 4 dias de corrida em esteira. Embora os tendões sejam considerados tecidos quase que metabolicamente inativos, a região peritendínea é capaz de aumentar a atividade metabólica em resposta à atividade física (Magnusson et al., 2003). Assim, sugere-se que a maior celularidade na região peritendínea apresentada nesse estudo está relacionada também com o metabolismo tecidual local, pois, essa região também apresentou maior $V_v\%$ de vasos sanguíneos. No estudo de Malheiro e colaboradores (2009) as variáveis foram analisadas 1 e 4 dias após exercício, e no atual estudo as variáveis foram avaliadas 7 semanas após o treinamento de salto. Nossos achados indicam claramente que as respostas inerentes a atividade física nessa região peritendínea sinalizam adaptação e remodelamento tecidual contínuo com o treinamento de longa duração.

Nesse sentido, os tendões, tecidos brancos, diferentes dos músculos, vermelhos, possuem uma vascularização considerada pobre, porém mesmo assim, os vasos são

importantes para garantir as funções normais das células e reparo tecidual (Benjamin et al., 2008). Nesse estudo, foi observado aumento na Vv% de vasos em resposta ao exercício de carga no TC (regiões proximal e distal) e TFP (regiões proximal, intermediária e distal). Durante o exercício, o fluxo sanguíneo de tendões pode aumentar até sete vezes quando comparado com o fluxo normal de repouso (Magnusson et al., 2003). Malheiro e colaboradores (2009) também observaram aumento da vascularização da camada peritendínea em resposta aos modelos de exercícios utilizados (salto e corrida em esteira). Ao contrário do que mostram alguns estudos, a região intermediária do TFS que passa por uma proeminência óssea (calcâneo), apresentou maior Vv% de vasos que as demais regiões em animais sedentários. Esses estudos relatam que nas regiões onde os tendões recobrem superfícies ósseas há uma grande diminuição do suprimento sanguíneo, sendo que essa característica pode ter uma relação direta com as forças de compressão aplicadas nessas regiões (Petersen et al., 2000, 2002, 2003; Benjamin et al., 2008). Porém, parece que os tendões que são expostos ao atrito possuem uma camada sinovial abrangendo os vasos sanguíneos e assim estes tendões recebem a sua nutrição a partir do líquido sinovial (O'Brien, 1997). Este último pode explicar nossos achados, mas é importante acrescentar que a maioria dos estudos avaliou a região interna do tendão e não a região periférica como realizado nesse.

Administração de EAA: A administração de EAA ocasionou diferentes efeitos em cada tendão. No TC (região distal) foi observado um aumento de células na camada peritendínea. No TFS (região intermediária) as células da área interna aumentaram apenas quando comparado com o grupo EAAT, e no TFP (região intermediária), houve aumento da Vv% de vasos na camada peritendínea e diminuição da Vv% de células da área interna. Há uma escassez de trabalhos associando os efeitos dos EAA e as variáveis avaliadas neste estudo, em diferentes regiões dos tendões, bem como em diferentes tendões, fato que dificulta a comparação e discussão dos achados do presente manuscrito. No entanto, em um estudo

prévio utilizando o mesmo modelo experimental deste atual trabalho, Marqueti e colaboradores (2006) mostraram que a administração combinada de deca-durabin e decanoato de nandrolona acarretou uma alteração na morfologia (fibrose periférica) e diminuição na atividade de metalopeptidases de matriz tipo 2 (MMP-2), prejudicando assim o remodelamento do tendão calcâneo.

Exercício de carga associado ao EAA: O treinamento associado à administração de EAA interferiu negativamente nas propriedades morfológicas dos tendões, principalmente com relação à vascularização. É importante destacar que o exercício de carga aumenta o RNAm de receptores androgênicos tanto em músculos de roedores como de humanos, assim quando os EAA são associados ao exercício causam efeito potencializado mais que a administração de EAA isolado (Bamman et al., 2001). Sabendo-se que os tendões não acompanham o aumento de força como os músculos, a maior intensidade e frequência de treinamento podem predispor lesões e rupturas (Shahidi, 2001; Battista, Combs, Warne, 2003; Maravelias et al, 2005).

Neste estudo o EAA associado ao exercício de carga comprometeu o aumento da Vv% de vasos sanguíneos no TC (região proximal), no TFS (região intermediária) e TFP (as 3 regiões). A maioria dos trabalhos na literatura associou o uso de EAA a uma série de efeitos cardiovasculares, incluindo o desenvolvimento de cardiomiopatias, fibrilação atrial, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, distúrbios do sistema hemostático, trombose ventricular e embolia sistêmica, e falência aguda do coração (Hartgens, Kuipers, 2004). O efeito dos EAA sobre a Vv% de vasos sanguíneos, ainda não está clara, mas um estudo realizado por Paschoal e colaboradores (2009) em músculo sóleo de ratos, mostrou que o treinamento de salto com carga aumentou a expressão de VEGF em relação aos grupos não treinados (sedentário com e sem uso de EAA). Nos animais que treinaram e receberam administração de EAA houve uma inibição na expressão de VEGF. A partir desse achado, pode-se sugerir uma forte ligação entre a inibição da expressão do VEGF com a inibição da

Vv% de vasos no tecido, uma vez que o VEGF é uma molécula importante na indução da angiogênese (Prior et al, 2003). Além disso, outro estudo mostrou que a exposição prolongada de células endoteliais a doses diferentes de EAA alterou o crescimento das células endoteliais com um forte efeito antiproliferativo, induzindo apoptose e modificando os níveis de cálcio intracelular. Desta forma, as alterações observadas nas células endoteliais podem predispor sérios danos nas células vasculares, uma vez que as células endoteliais são os principais componentes da parede dos vasos (D'Ascenzo, 2007).

Curiosamente, a combinação de exercício de carga com o EAA acarretou o aparecimento de células adiposas na região proximal do TC. No entanto, as células adiposas aparecem também no grupo exercitado (região distal do TC) e nos grupos sedentários (região proximal do TFS e proximal do TC). Benjamin et al, (2004) propuseram uma série de funções para o tecido adiposo nas enteses dos tendões que inclui a facilitação da circulação entre os fascículos do tendão, e entre o tendão e o osso; e a dissipação do estresse e da concentração de tensões nos locais de fixação.

Apesar das descrições funcionais a respeito do tecido adiposo nos tendões, Jozsa e colaboradores (1997) descrevem uma relação de tendinopatia com o aparecimento de lipídios e infiltrado de linfócitos em tendão calcâneo lesionado de humanos. Curiosamente, no grupo EAAT a Vv% de células adiposas encontrada no TC foi 2 vezes maior que nos animais treinados (TC) e 4 vezes maior que os animais sedentários (TFS). Dessa forma, o aumento exacerbado da Vv% de tecido adiposo no grupo EAAT pode determinar uma resposta não funcional ao tendão. Entretanto, outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

De forma interessante, em nosso estudo, algumas células semelhantes às sinoviais apareceram contornando internamente a camada peritendínea de animais que realizaram exercício carga (TFP, região proximal e intermediária), nos animais que tiveram

administração de EAA (TC, região distal) e no EAA associado ao exercício de carga (TFS, região intermediária e TFP, região proximal e intermediária). Outro estudo também demonstrou que estas células podem cobrir internamente o tecido peritendíneo (Franchi et al, 2007). No entanto, as células sinoviais não foram encontradas em todas as regiões, pois nem todos os tendões possuem uma camada sinovial (Benjamin, Kaiser, Wilz, 2008).

As células sinoviais nos tendões secretam líquido sinovial, assim como nas articulações, e este líquido auxilia na redução do atrito e nutrição do tecido (Benjamin, Kaiser, Wilz, 2008). O ácido hialurônico está presente tanto no líquido sinovial quanto no fluido das bainhas dos tendões, e Amadio (2005) sugere que o principal papel do ácido hialurônico é fornecer uma alta viscosidade ao líquido sinovial facilitando a entrega de nutrientes, ao invés de agir apenas como um lubrificante. As bainhas sinoviais formam túneis de acesso para os tendões, que passam por superfícies ósseas ou estruturas anatômicas que possam causar atrito (Jozsa, Kannus, 1997; Klan, 1996). Estas bainhas podem ser encontradas, mais freqüentemente, nas regiões de compressão ao redor dos tendões flexores das mãos e dos pés (Jozsa, Kannus, 1997; Klan et al., 1996). Porém, foi encontrado uma maior quantidade de células semelhantes às sinoviais na região intermediária do TFS (do grupo EAAT, Fig. 5U), o qual não descarta a possibilidade de lesão neste local. Chang e colaboradores (1998) relatam que a proliferação e a migração das células sinoviais pode ocorrer na presença de lesão, com o propósito de auxiliar na cicatrização do tendão. Nestas condições, as células sinoviais podem exibir o papel de marcadores inflamatórios mostrando-se ativas logo após a lesão (Khan et al., 1996). O aparecimento do aglomerado de células no atual trabalho (Fig. 5U), talvez esteja relacionado com algum tipo de lesão na tentativa de induzir uma resposta de proteção, por uma razão ainda desconhecida e que precisa ser melhor investigada. No entanto, em uma análise biomecânica foi observado que a associação do treinamento ao exercício de carga acarreta uma maior rigidez nos 3 tendões avaliados (Marqueti et al, *in press*, 2010). Desse

modo, pode haver uma forte correlação entre os achados morfológicos com os biomecânicos os quais sinalizam, dentre efeitos adversos provocador pelos EAA, uma maior rigidez capaz de predispor lesões e ocasionar futuras rupturas no tendão.

Com relação ao conteúdo de colágeno foi observada uma interessante resposta do exercício de carga, que promoveu um aumento na concentração de OH nas regiões: distal do TC e intermediária e distal do TFP. Neste sentido, o exercício de carga acelera a formação e degradação do tecido conjuntivo em músculos e tendões, resultando na adaptação fisiológica da MEC (Kjaer et al, 2005). Além disso, o exercício de carga exerce um efeito intrínseco importante aumentando a proliferação celular, promovendo a síntese protéica e aumentando o colágeno da MEC (Kjaer, 2004). Assim, o treinamento físico intenso pode controlar o metabolismo do colágeno (Langeberg et al, 1999). Estudos mostram que o colágeno tipo I é sintetizado e degradado no espaço peritendíneo do tendão calcâneo de homens depois de 4 a 11 semanas de treinamento físico intenso (Langberg, Rosendal, Kjaer, 2001). Um fato curioso é que o conteúdo de OH-pro nos tendões de animais sedentários apresentaram maior concentração justamente nas regiões onde há maior quantidade de células. Apesar dos fibroblastos sintetizarem o colágeno, o fato é que estas células ocupam um espaço local considerável e mesmo com a presença dessas células o conteúdo de colágeno foi maior. Uma possível explicação seria a presença de fibras mais compactadas e maior conteúdo de colágeno por área. Porém, essa hipótese precisa ser investigada como por meio de microscopia de luz polarizada para observação da birrefringência. Outra hipótese seria que as regiões que possuem maior expressão de colágeno tipo III também apresentem maior concentração de OH-pro de acordo com a expressão gênica do manuscrito seguinte.

Com relação à administração de EAA ou a combinação de exercício de carga e EAA, nossos dados mostram que houve, em algumas regiões, a diminuição do conteúdo de OH, indicando que EAA exerce um efeito negativo sobre o metabolismo do colágeno. Alguns

estudos relatam que os EAA podem inibir a síntese de colágeno tanto em tendões quanto em ligamentos, e induzir mudanças no arranjo das fibrilas de colágeno acarretando alterações críticas da plasticidade tendínea (Karpakka, Pesola, Takala, 1992; Evans, Bowrey, Newman, 1998).

Conclui-se que a região de cada tendão difere morfológicamente entre si de acordo com a função e a carga aplicada alterando: a Vv% e a forma das células, a celularidade da camada peritendínea da área interna e por fim o conteúdo de colágeno. Este trabalho mostra alterações morfológicas significativas que refletem os efeitos adaptativos promovidos pelo exercício de carga tais como o aumento da Vv% de vasos, células da camada peritendínea e da área interna, além da ativação de fibroblastos. Por outro lado a administração de EAA isolada apresentou pequenas alterações sobre a morfologia dos tendões. Porém, a combinação de exercício de carga e EAA mostraram alterações morfológicas negativas que o exercício não conseguiu reverter. Estas alterações podem acarretar danos ou lesões futuras por comprometer não só o remodelamento e o reparo tecidual, mas também as propriedades biomecânicas dos tendões.

Figura 1

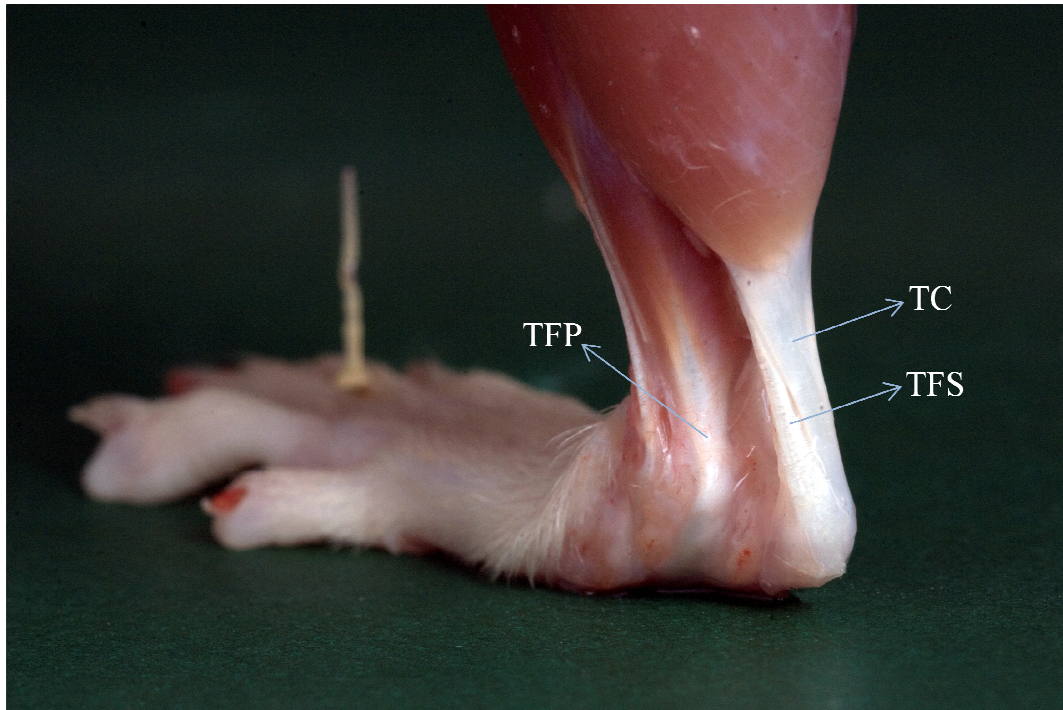


Figura 1. Localização anatômica do tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) do membro posterior de ratos (vista póstero-medial).

Figura 2

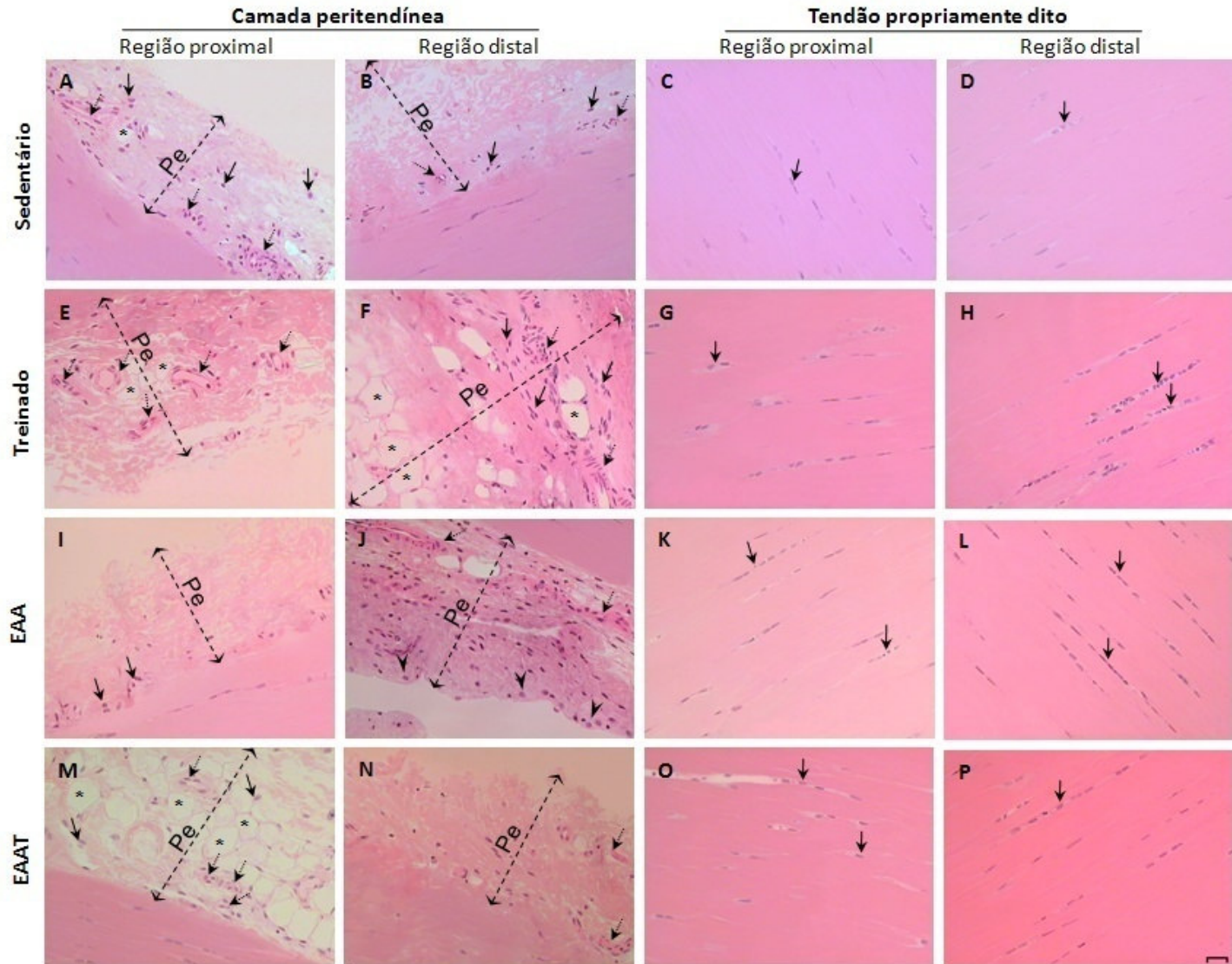


Figura 2. Cortes longitudinais das regiões proximal e distal do tendão calcâneo de rato (TC) corados com hematoxilina-eosina. Grupo Sedentário: Camada peritendínea (Pe) da região proximal e células adiposas (asterisco) (A) e região distal (B) apresentaram vasos sanguíneos (seta tracejada) e células (seta compacta). Tendão propriamente dito da região proximal (C) e distal (D) mostrando a organização das fibras de colágeno e detalhes dos fibroblastos (setas). Grupo Treinado: Camada Pe da região proximal (E) e distal (F) mostrando os vasos sanguíneos (seta tracejada), células (seta compacta) e células adiposas (asterisco). Tendão propriamente dito da região proximal (G) e distal (H). A região distal (H) apontando fibrocondrócitos (seta compacta) que corresponde sítios de fibrocartilagem. Grupo EAA: Região proximal (I) e distal (J) mostrando as diferentes componentes da camada Pe. Região proximal (I) apontando algumas células (seta compacta), em contrapartida, a região distal (J) mostrando células secretoras ao redor da camada peritendínea (cabeça de seta), vasos sanguíneos (seta tracejada) e muitas células distribuídas todos os pontos da camada Pe (seta compacta). Tendão propriamente dito da região proximal (K), e região distal (L) mostrando fibroblastos alongados (seta compacta). EAAT grupo: A camada Pe da região proximal (M) com células adiposas (asterisco), células (seta compacta) e vasos sanguíneos (seta tracejada); região distal (N) com alguns vasos sanguíneos (seta tracejada). Tendão propriamente dito da região proximal (O) apresentando fibroblastos menos alinhados (seta compacta) que na região distal (N) com fibroblastos em formato oval e alinhados com os feixes de colágeno. Barra = 30 μm .

Figura 3

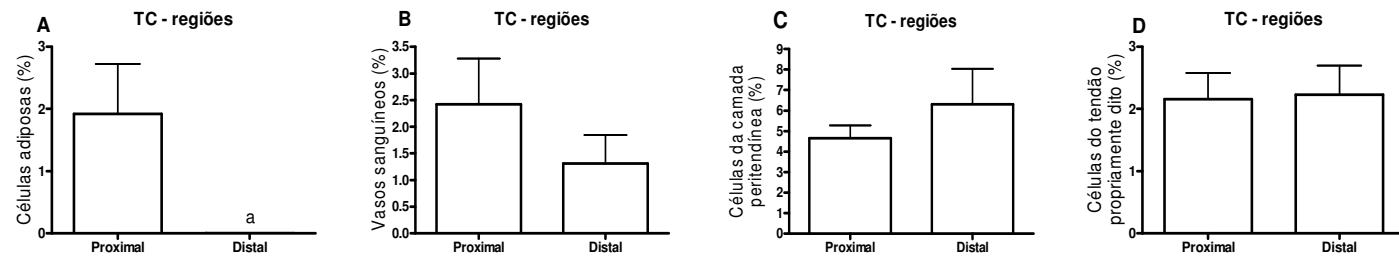


Figura 3. Comparação entre a densidade de volumes (Vv%) de elementos estruturais encontrados nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo (TC) nos animais sedentários.

Figura 4

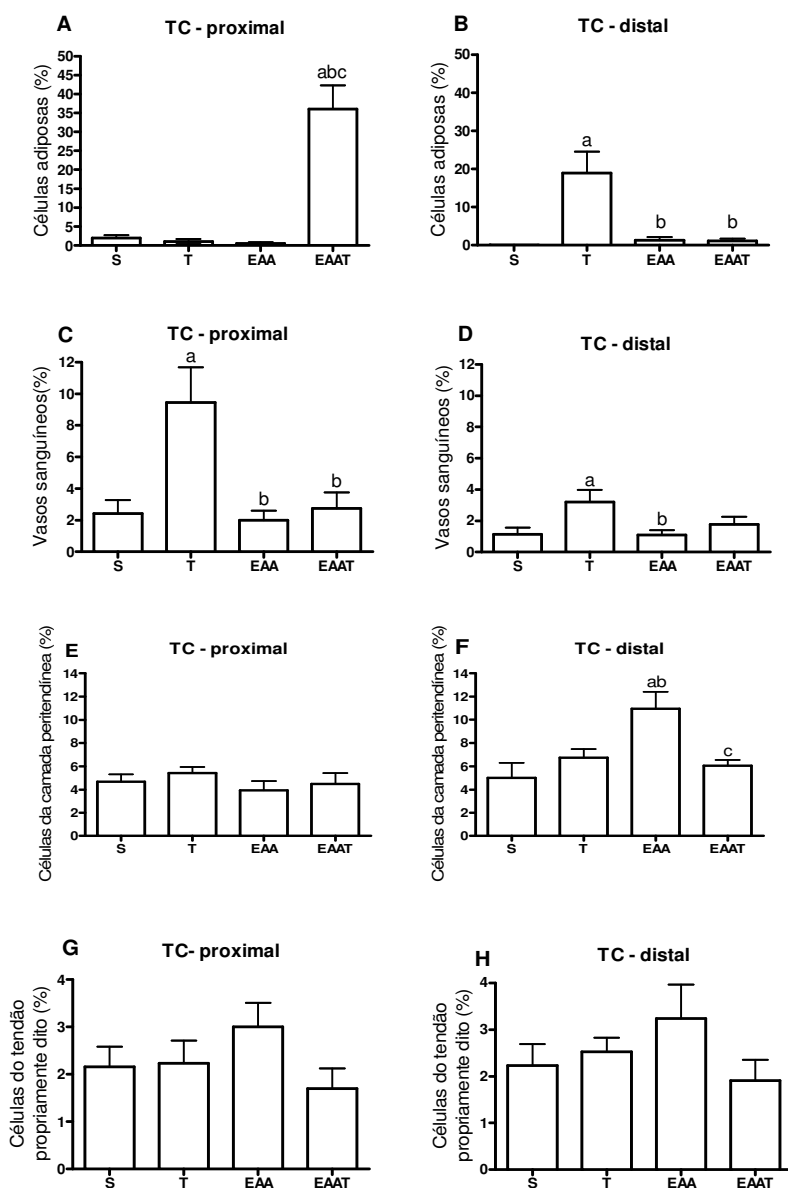


Figura 4. Variação na densidade de volumes (Vv%) de elementos estruturais encontrados nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo (TC) nos diferentes grupos experimentais.

Figura 5

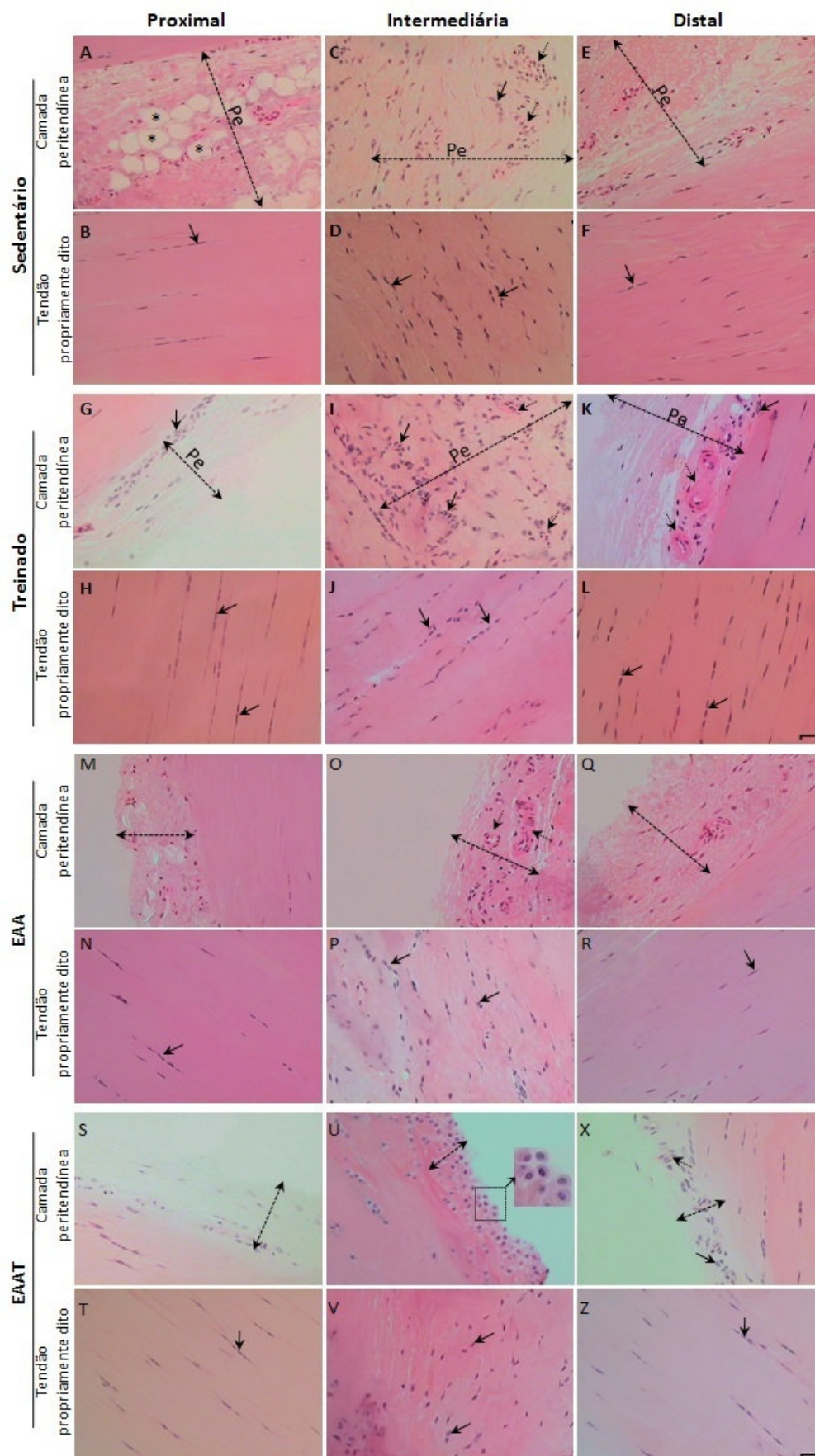


Figura 5. Cortes longitudinais das regiões proximal, intermediária e distal do tendão flexor superficial (TFS) corados com hematoxilina-eosina. **Grupo Sedentário:** Camada peritendínea (Pe) da região proximal (A) apresentando células adiposas (asterisco); região intermediária (C) indicando vasos sanguíneos (seta tracejada) e células (seta compacta) e região distal (E). O tendão propriamente dito da região intermediária (D) mostrou fibroblastos não-alinhados (seta compacta) enquanto no tendão propriamente dito da região proximal (B) e distal (F) os fibroblastos aparecem alinhados e alongados (seta compacta). **Grupo treinado:** camada Pe da região proximal (G) apontando células (seta compacta); região intermediária (I) mostrando muitas células (fibrocondrócitos) redondas e não alinhadas (seta compacta) e vasos sanguíneos (seta tracejada) e por fim a região distal (K) indicando células (seta compacta) e vasos sanguíneos (seta tracejada). O tendão propriamente dito da região proximal (H) e região distal (L) apontando fibroblastos bem alinhados (seta compacta) e a região intermediária (J) apresentando uma distribuição ondulada dos feixes de colágeno e células (seta compacta). **Grupo EAA:** Camada Pe da região proximal (M); região intermediária (O) apontando células (seta compacta) e vasos sanguíneos (seta tracejada) e região distal (Q). No tendão propriamente dito da região intermediária (P) fibroblastos e fibras colágenas aparecem de forma não-alinhada (seta compacta) quando comparado com as demais regiões proximal (N) e região distal (R) apontando os fibroblastos (seta compacta). **Grupo EAAT:** A camada Pe da região proximal (S), intermediária (U) mostrando uma concentração de células de formato redondo, prováveis células secretoras (região em destaque) e da região distal (X) apontando células (seta compacta) e vasos sanguíneos (seta tracejada). Tendão propriamente dito da região proximal (T) e região distal (Z) apontando os fibroblastos alinhados (seta compacta) e região intermediária (V) com fibroblastos de não alinhados (seta compacta). Barra = 30 μ m

Figura 6

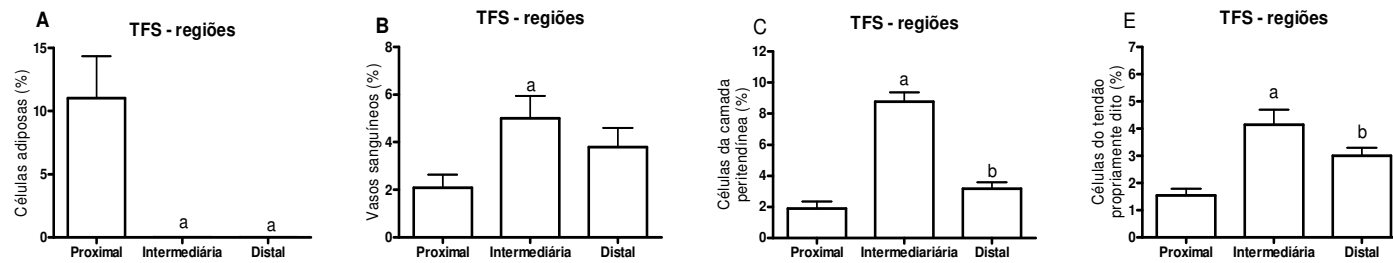


Figura 6. Comparação entre a densidade de volumes (Vv%) de elementos estruturais encontrados nas regiões proximal e distal do tendão flexor superficial (TFS) nos animais sedentários.

Figura 7

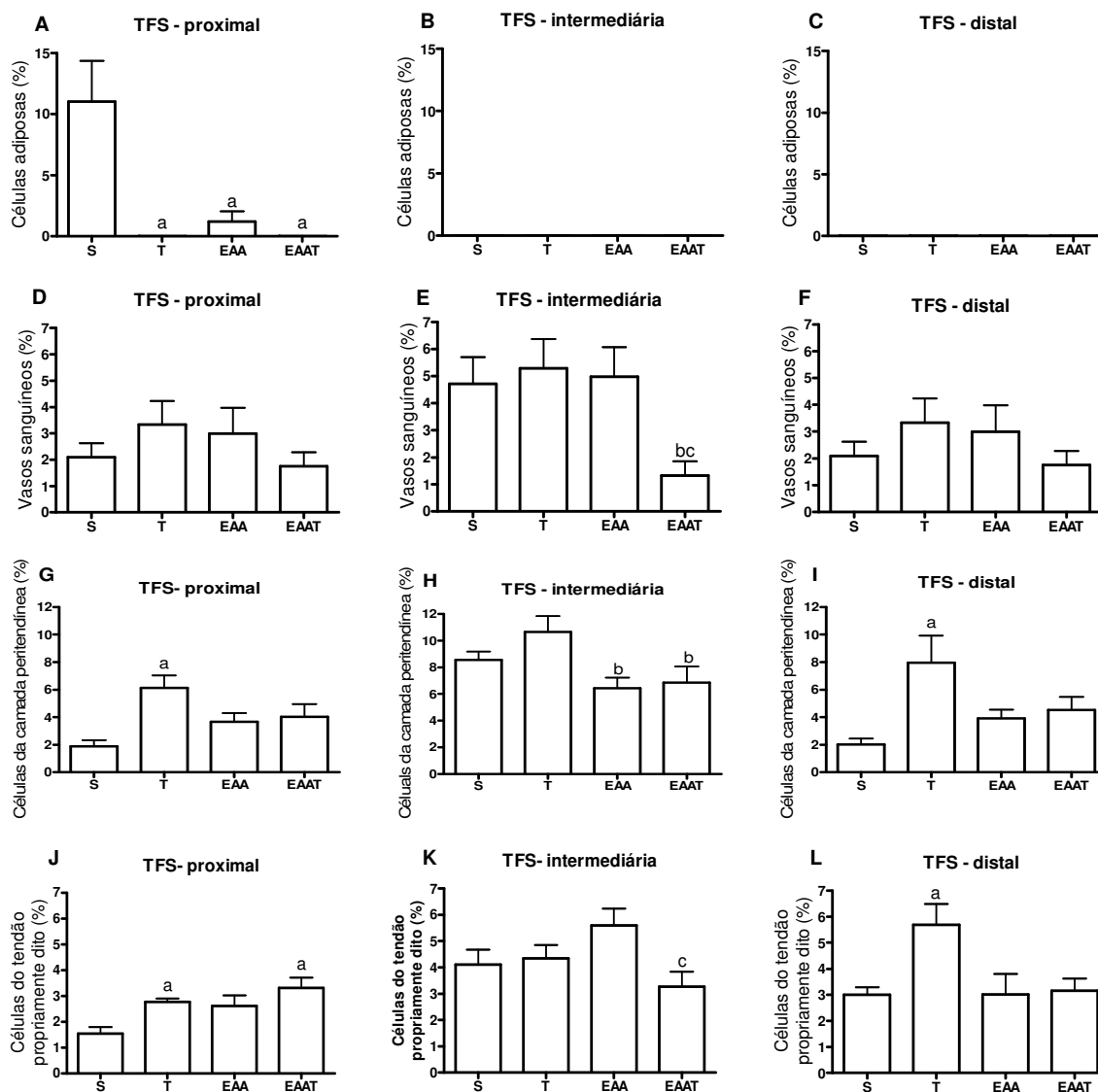


Figura 7. Variação na densidade de volumes (Vv%) de elementos estruturais encontrados nas regiões proximal e distal do tendão flexor superficial (TFS) nos diferentes grupos experimentais.

Figura 8

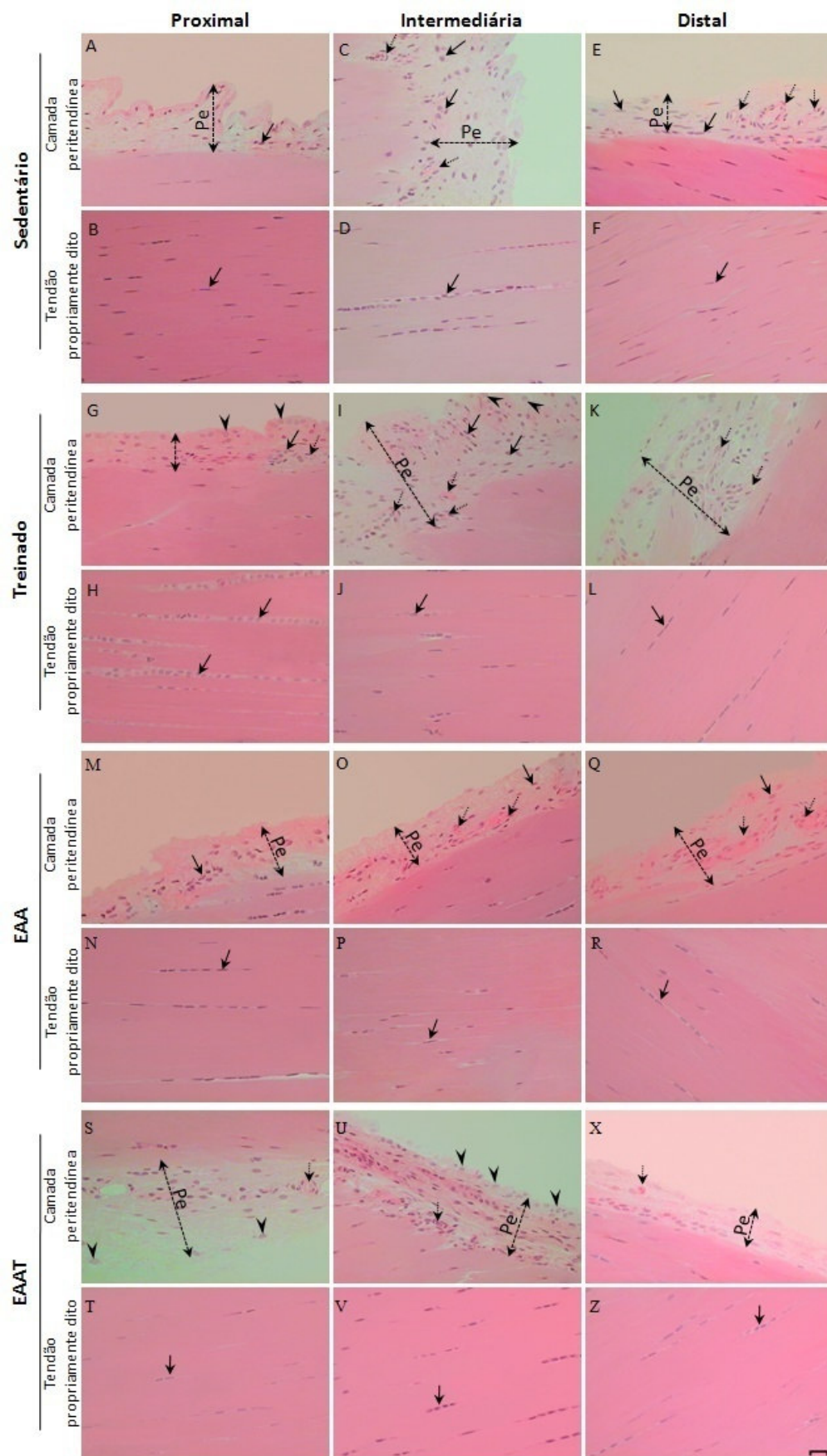


Figura 8. Cortes longitudinais das regiões proximal, intermediária e distal do tendão flexor profundo (TFP) corados com hematoxilina-eosina. Grupo Sedentário: Camada peritendínea (Pe) da região proximal (A) células (seta compacta); região intermediária (C) e região distal (E) ambas indicando vasos sanguíneos (seta tracejada) e células (seta compacta). O tendão propriamente dito da região intermediária (D) mostrou fibroblastos de formato redondo (seta compacta) enquanto No tendão propriamente dito da região proximal (B) e distal (F) os fibroblastos aparecem alongados (seta compacta). Grupo treinado: camada Pe da região proximal (G) e região intermediária (I) ambas apontado células (seta compacta), vasos sanguíneos (seta tracejada) e células secretórias alinhadas ao redor da Pe (cabeça de seta); e da região distal (K) indicando vasos sanguíneos (seta tracejada). Tendão propriamente dito da região proximal (H) mostrando células redondas bem alinhadas e com ampla matriz pericelular (seta compacta); região intermediária (J) com células similares às da região proximal (seta compacta) e a região distal (L) mostrando fibroblastos alinhados e alongados (seta compacta). Grupo EAA: Camada Pe da região proximal (M) apontando fibroblastos (seta compacta); região intermediária (O) e região distal (Q) ambas apontando células (seta compacta) e vasos sanguíneos (seta tracejada). No tendão propriamente dito a região proximal (N) e distal (R) ambas com fibroblastos alinhados e alongados (seta compacta) e a região intermediária (P) com fibroblastos de formato oval (seta compacta). Grupo EAAT: camada Pe da região proximal (S) e região intermediária (U) ambas apontado células (seta compacta), vasos sanguíneos (seta tracejada) e células secretórias alinhadas ao redor da Pe (cabeça de seta); região distal (X) apontando vasos sanguíneos (seta tracejada). No tendão propriamente dito as três regiões proximal (T), intermediária (V) e distal (Z) apontando fibroblastos (seta compacta). Barra = 30 μm

Figura 9

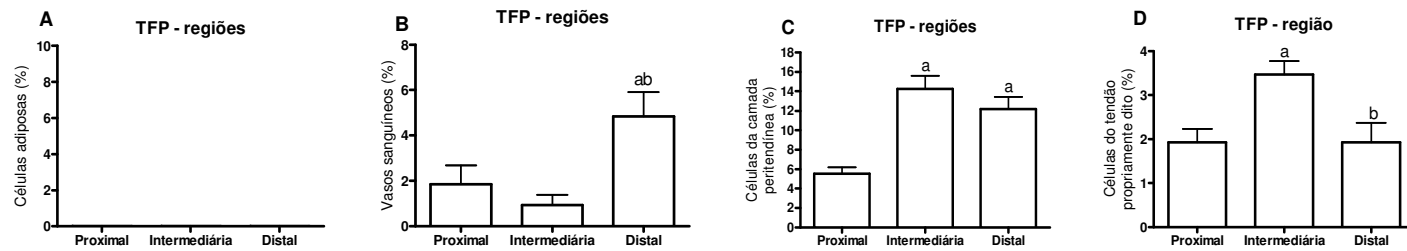


Figura 9. Comparação entre a densidade de volumes (Vv%) de elementos estruturais encontrados nas regiões proximal e distal do tendão flexor profundo (TFP) nos animais sedentários.

Figura 10

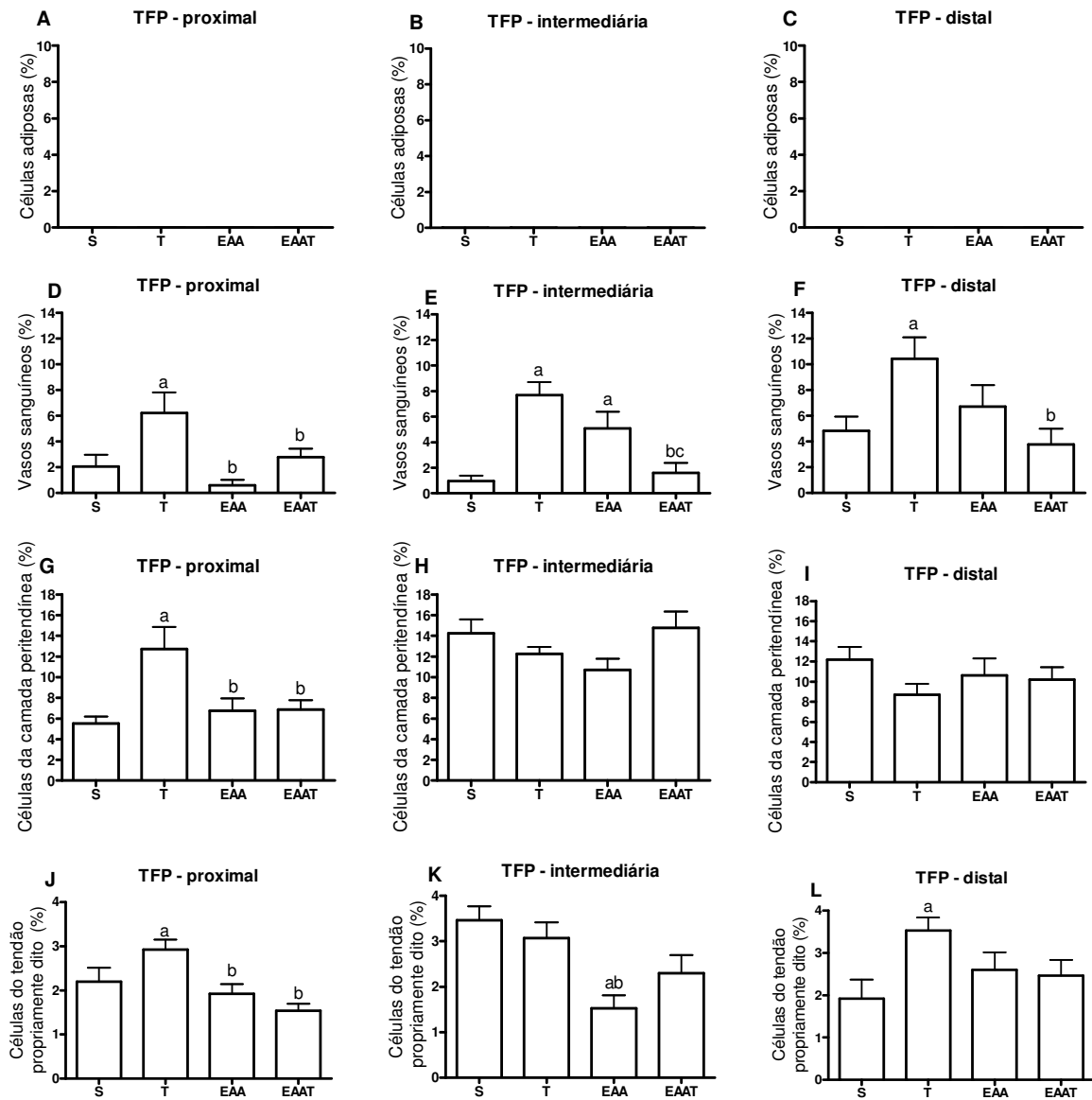


Figura 10. Variação na densidade de volumes (Vv%) de elementos estruturais encontrados nas regiões proximal e distal do tendão flexor profundo (TFP) nos diferentes grupos experimentais.

Figura 11

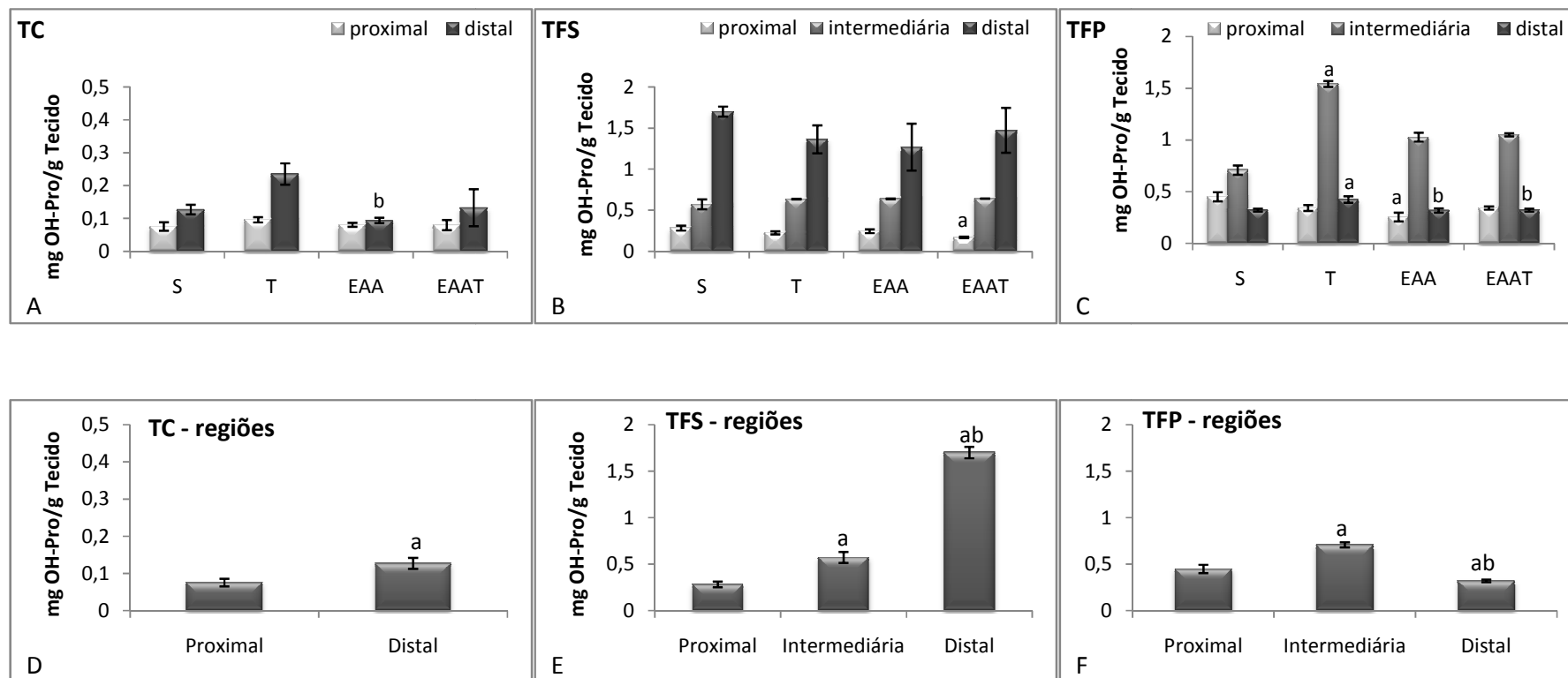


Figura 11. Concentração de hidroxiprolina (OH-Pró) (mg/g de tecido) nas diferentes regiões de cada grupo experimental (A – C) e comparação entre as regiões de animais sedentários (D –F)

Referências

- Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Tendon healing in vivo. An experimental model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 23: 199-205, 1989.
- Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A, McLafferty CL, Urban RJ. Mechanical load increases muscle IGF-1 and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol* 280: 383 - 390, 2001.
- Battista V, Combs J, Warne WJ. Asynchronous bilateral Achilles tendon ruptures and androstenediol use. *Am. J. Sports Med* 31: 1007–1009, 2003.
- Benjamim M; Kaiser, E e Milz, S. Structure-function relationships in tendons: a review. *J. Anat.* 212: 211–228, 2008.
- Bergman I, Loxley R. New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates. *Anal Chem* 42: 702 – 6,1970.
- Birch HL, Worboys S, Eissa S, Jackson B, Strassburg S, Clegg PD. Matrix metabolism rate differs in functionally distinct tendons. *Matrix Biol* 27: 182-9, 2008.
- Carvalho HF, Felisbino SL, Covizi DZ, Della Colleta HH, Gomes L. Structure and proteoglycan composition of specialized regions of the elastic tendon of the chicken wing. *Cell Tissue Res* 300: 435–446, 2000.
- Carvalho HF, Felisbino SL, Keene DR, Vogel KG Identification, content, and distribution of type VI collagen in bovine tendons. *Cell Tissue Res* 325:315-324, 2006.
- Carvalho HF. Understanding The Biomechanics Of Tendon Fibrocartilages. *Journal of Theoretical Biology* 172: 293 – 297, 1995a.
- Carvalho HF, Vidal BC The Elastic system of a pressure bearing tendon of the bullfrog. *Ann Anat* 177: 297 – 404, 1995b.
- Chang J, Most D, Thunder R, Mehrara B, Longaker MT, Lineaweaver WC. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. *J Hand Surg* 23A: 1052–1058, 1998.
- Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 911-920, 2009.

- Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* 18: 417-426, 1999.
- Clegg PD, Strassburg S, Smith RK. Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *Int J Exp Pathol* 88: 227-35, 2007.
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF. Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell* 33: 483-490, 2001.
- Felisbino SL, Carvalho HF. Identification and distribution of type VI collagen in tendon fibrocartilages. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31:187–195, 1999.
- Franchi M, Trirè A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *The Scientific World Journal* 7: 404-420, 2007.
- Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 34: 513-554, 2004.
- Khan U, Edwards JC, McGrouther DA. Patterns of cellular activation after tendon injury. *J Hand Surg* 21B: 813– 820, 1996.
- Kjaer M, Langberg H, Miller BF, Boushel R, Crameri R, Koskinen S, Heinemeier K, Olesen JL, Døssing S, Hansen M, Pedersen SG, Rennie MJ, Magnusson P. Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 5: 41-52, 2005.
- Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84: 649-698, 2004.
- Kjær M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to Mechanical loading. *Physiol Rev* 84: 49-698, 2004.
- Langberg H, Rosendal L, Kjaer M. Training induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 534: 397-402, 2001.
- Langberg H, Skovgaard D, Petersen LJ, Bulow J & Kjaer M Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 521: 299–306, 1999.

- Leite CM, Gomes MG, Vassallo DV, Mill JG. Changes in collagen content in the residual myocardium surviving after infarction in rats. Influence of propranolol or hydralazine therapy. *Arch Med Res* 26:79-84, 1995.
- Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand. J. Med Sci Sports* 13: 211-223, 2003.
- Malheiro OCM, Giacomini CT, Justilin LA, Delella FK, Dal-Pai-Silva M, Felisbino SL. Calcaneal tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running. *Anat Rec* 292: 1656-1662, 2009.
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicol Lett* 158:167-175, 2005.
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chrigger RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am. J. Sport Med* 34: 1274-1280, 2006.
- Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol*.104:1087-93, 2008.
- Newsham-West R, Nicholson H, Walton M, Milburn P. Long-term morphology of a healing bone-tendon interface: a histological observation in the sheep model. *J Anat.* 210: 318-27, 2007.
- Perez-Castro AV, Vogel KG. In situ expression of collagen and proteoglycan genes during development of fibrocartilage in bovine deep flexor tendon. *J Orthop Res.* 17: 139-48, 1999.
- Paschoal M, de Cássia Marqueti R, Perez S, Selistre-de-Araujo HS. Nandrolone inhibits VEGF mRNA in rat muscle. *Int J Sports Med* 30: 775-778, 2009.
- Petersen W, Bobka T, Stein V, Tillmann B. Blood supply of the peroneal tendons: injection and immunohistochemical studies of cadaver tendons. *Acta Orthop Scand* 71, 168-174, 2000.

- Petersen W, Hohmann G, Stein V, Tillmann B The blood supply of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg [Br]* 84, 141–144, 2002.
- Petersen W, Pufe T, Zantop T, Paulsen F Blood supply of the flexor hallucis longus tendon with regard to dancer's tendinitis: injection and immunohistochemical studies of cadaver tendons. *Foot Ankle Int* 24, 591–596, 2003.
- Provezano PP, Vanderby R Jr. Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol* 2: 71-84, 2006.
- Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 23: 1355–1390, 2001.
- Shaw HM, Benjamin M. Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise. *Scand J Med Sci Sports*. 17: 303-15, 2007.
- Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech* 36:1529 - 1553, 2003.
- Vogel KG, Koob TJ. Structural specialization in tendon under compression. *Int Rev Cytol* 115: 267-293, 1989.
- Waggett AD et al. Characterization of collagen and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16: 457-470, 1998.
- Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 39: 1563-1582, 2006.
- Weibel E R. Stereologica principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Rev. Cytol* 26: 235-302, 1969.
- Woo SL, Ritter MA, Amiel D, Sandres TM, Gomez MA, Kuei SC, Garfin SR, Akeson WH. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons - long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect Tissue Res* 7: 177-183, 1980.

8 MANUSCRITO V - em fase de redação



Bispebjerg Hospital – Copenhagen - Dinamarca

**EXPRESSÃO GÊNICA EM DIFERENTES REGIÕES DE TENDÕES DE RATOS
SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE CARGA ASSOCIADO À ADMINISTRAÇÃO DE
DECANOATO DE NANDROLONA**

¹Marqueti RC, ¹Perez SEA, ¹Durigan JLQ, ³Heinemeier KM, ³Schjerling P, ³Kjaer M,
²Carvalho HF, ¹Selistre-de-Araujo HS.

¹Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar),
São Paulo; ²Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), São Paulo, Brasil; ³Institute of Sports Medicine Copenhagen (ISMC),
Bispebjerg Hospital, Copenhagen, Dinamarca.

Resumo

O uso de esteróides anabolizantes (EAA) está associado às incidências de rupturas em tendões, por alterar suas propriedades biomecânicas e ultraestruturais, porém pouco se sabe sobre o efeito dos EAA na expressão gênica desse tecido. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão dos principais genes que atuam no remodelamento do tendão nas regiões proximal e distal do TC, intermediária e distal do TFS e proximal, intermediária e distal do TFP, no exercício de carga e associação com EAA. Ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos experimentais: sedentário (S), treinados (T), animais sedentários tratados com EAA (5 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana) (EAA) e animais tratados com EAA e treinados (EAAT). A expressão dos genes COL1A1, COL3A1, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, IGF-I, GAPDH, CTGF e TGF- β foi avaliada por real-time PCR. Nossos resultados indicaram que o treinamento não alterou a expressão dos genes COL1A1, COL3A1 e MMP-2, porém, a administração de EAA ou a sua associação com o treinamento diminuíram a expressão dos mesmos. A expressão do IGF-Ia foi aumentada com o exercício de carga, enquanto o EAA ou EAA associado ao treinamento diminuíram a sua expressão. As diferentes regiões dos tendões nos animais sedentários apresentaram uma variada expressão dos genes estudados. Conclui-se, portanto, que o exercício modula diferentemente a expressão de genes relacionados com o remodelamento da MEC no tendão. Já as alterações na expressão desses genes causadas pela administração de EAA e associação com o exercício indicam a possibilidade de um remodelamento deficiente na ECM do tendão que pode estar relacionado com a ocorrência de lesões tendíneas.

Palavras chave: tendão, esteróide anabólico androgênico, expressão gênica, exercício de salto.

Introdução

Vários estudos mostraram que as respostas adaptativas do tecido conjuntivo, tanto em músculo esquelético quanto em tendões, envolvem o aumento da síntese de colágeno tipos I e III, os mais abundantes nos tendões, além de outras proteínas da matriz extracelular (MEC). Essas alterações podem ser promovidas por estímulos mecânicos como o exercício físico e estão diretamente relacionadas à liberação de fatores de crescimento (Koskinen et al., 2001; Olesen et al., 2006b; Heinemeier et al., 2007a; Heinemeier et al., 2008). O colágeno dos tendões e músculos e outros componentes do tecido conjuntivo respondem de acordo com os níveis da atividade física (Kovanen, Suominen, Peltonen, 1987; Kovanen, 1989; Stetler-Stevenson, 1996). A conexão física entre a MEC e o citoesqueleto através da superfície celular, via integrinas em sítios de adesão, permite que forças mecânicas se propaguem pelo interior da célula (Sarasa-Renedo, Chiquet, 2005, Chiquet et al., 2009). Estes sinais mecânicos se traduzem em informações químicas e poderão influenciar uma série de respostas celulares como a morfologia, organização do citoesqueleto, sobrevivência, diferenciação e expressão gênica celular (Sarasa-Renedo, Chiquet, 2005).

O tecido conjuntivo tem uma importante função na transmissão de força e o arranjo fibrilar dos tendões permite absorção de energia e carga (Kjaer et al., 2005). Os sinais mecânicos inerentes da atividade física promovem uma resposta adaptativa do tecido conjuntivo, acarretando um aumento da síntese de várias proteínas da MEC, dentre elas o colágeno (Kjaer et al., 2009). Os colágenos fibrilares, tipo I e tipo III, são predominantes nos tendões (Kjaer et al., 2009). Estudos demonstraram que o aumento e a diminuição da carga mecânica podem aumentar e diminuir a síntese de colágeno, respectivamente (Kovanen, 1989).

A degradação do colágeno, bem como de outros componentes da MEC é iniciada pelas metalopeptidases de matriz (MMPs) (Kjær, 2004). As MMPs possuem um importante papel na promoção do *turnover* da MEC de tecidos ricos em colágeno como os tendões (Koskinen et al., 2004), cuja atividade proteolítica é essencial para promover o crescimento, manutenção, adaptação e reparo tecidual (Visse, Nagase, 2003). A família das MMPs é formada pelo menos por vinte e cinco membros encontrados em humanos, que exibem similaridades estruturais e funcionais e estão divididos em várias classes: colagenases (MMP-1, 8, e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), stromelisinases (MMP-3 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26) e MMPs tipo-membrana (MMP-14 à 17 e 24) (Zhang et al., 2009). A MMP-2 e MMP-9 degradam fragmentos de colágeno (Pasternak, Aspenberg, 2009).

A atividade das MMPs é regulada por inibidores teciduais de metalopeptidases (TIMPs). O TIMP-1 e o TIMP-2 são capazes de inibir a atividade de todas as MMPs conhecidas, no entanto o TIMP-2 é conhecido por se ligar mais efetivamente à MMP-2 enquanto que o TIMP-1 possui maior afinidade pela MMP-9 (Gomez, et al., 1997).

É importante destacar que a indução da síntese da matriz extracelular (MEC) em resposta a carga mecânica pode ser: 1) efeito imediato da sinalização de fatores de transcrição, 2) efeito secundário induzido pelo aumento da expressão de fatores de transcrição, 3) ou o efeito indireto relacionado com a expressão, mecanicamente induzida, de fatores de crescimento, liberados de forma autócrina e parácrina induzindo a síntese de proteínas da MEC (Sarasa-Renedo, Chiquet, 2005). O aumento da expressão de colágeno pode ser induzido pelo fator de crescimento transformante β -1 (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF-Ia), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (Hishikawa, Oemar, Nakaki, 2001; Heinemeier et al., 2007a; Heinemeier et al., 2007b; Heinemeier et al., 2009).

O TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) funciona como um mediador mecânico induzindo a expressão de colágeno tipo I sintetizado pelos fibroblastos em vários tipos de células (Gutierrez, Perr, 1999; Nakatani et al., 2002; Kim et al., 2002; Yang et al., 2004), incluindo os fibroblastos do tendão (Yang et al., 2004). Os efeitos do TGF- β 1 podem ser mediados por um complexo de proteínas denominadas *Smad*, o qual são ativadas pela ligação do TGF- β 1 extracelular ao complexo receptor-TGF- β 1. Quando ativadas, as *Smad* regulam a expressão gênica no núcleo celular (Attisano, Wrana, 2000). A ativação da via das *Smad* pode induzir também a expressão do CTGF (Zhang et al., 2000; Chen et al., 2000; Roberts et al., 2001). O CTGF é uma proteína secretada por células endoteliais e induz síntese de colágeno *in vivo* e *in vitro* (Frazier et al., 1996). Em fibroblastos, o CTGF é induzido pelo TGF- β 1 e parecer ser, pelo menos em parte, responsável pela síntese de colágeno induzindo ações do TGF- β 1 (Frazier et al., 1996).

Fundamentado nestes achados, a hipótese deste trabalho é de que o exercício de carga possa ser capaz de modular e adaptar a expressão de genes envolvidos no remodelamento do TC, TFS e TFP. Por outro lado, acreditamos que essa adaptação celular possa ser prejudicada pelo uso de esteróides anabolizantes. De acordo com Maravelias (2005) o uso abusivo de esteróides aumenta o risco de lesões no sistema musculotendíneo. Experimentos em modelos animais sugerem que os esteróides alteram as propriedades biomecânicas e ultraestruturais dos tendões (Evans et al., 1998) e que a diminuição da sua força pode ser decorrente da displasia das fibras de colágeno (Michna, 1987; Laseter, Russel, 1991; Miles et al., 1992). Estudos prévios tem demonstrado ainda que a administração de EAA prejudicam o remodelamento do tendão por inibir a atividade das MMPs (Marqueti et al., 2006; Marqueti et al., 2008). Porém, os efeitos dos esteróides anabólicos androgênicos sobre o metabolismo do colágeno, ainda são pouco estudados,

apesar disso, podem estar associados à disfunção dos tendões e fibrose tecidual (Pärssinen et al., 2000).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a regulação dos principais genes que atuam no remodelamento do tecido tendíneo, nas regiões proximal e distal do TC, intermediária e distal do TFS e proximal, intermediária e distal TFP, quando aplicado exercício de carga progressivo e/ou a associação do esteróide anabólico decanoato de nandrolona.

Material e Métodos

Animais: Vinte ratos (*Wistar norvegicus albinus*, pesando aproximadamente ± 200 g, no início dos experimentos) foram agrupados em 4 gaiolas de plástico, à temperatura ambiente com luz controlada em ciclo de 12 h (claro escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o guia de pesquisa para o cuidado e utilização de animais de laboratório (National Research Council, 1996). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, processo nº. 002/2006, parecer 004/2006.

Grupos experimentais: Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (5 animais/grupo), na seguinte ordem: sedentários sem suplementação de EAA (S), sedentário com suplementação de EAA (EAA), treinado sem suplementação de EAA (T), e exercitado com suplementação de EAA (EAAT). Animais dos grupos exercitados foram submetidos a um programa de exercício (saltos) em um tubo de plástico 25 centímetros de diâmetro, contendo uma quantidade de água equivalente ao dobro do comprimento do corpo do animal, com temperatura constante de 30 ± 2 ° C. Após a semana

de adaptação os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento que consistiu de 7 semanas (5-d/semana).

Administração de EAA: Os animais receberam Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil). Doses de 5 mg/kg de massa corporal (dose suprafisiológica) foram injetadas por via subcutânea na região dorsal dos animais duas vezes por semana. Esta dosagem foi análoga à dosagem frequentemente utilizada por atletas (Pope, 1988). Os grupos experimentais que não tiveram administração de EAA (S e T) receberam um veículo apenas com óleo de amendoim e álcool benzílico. O decanoato de nandrolona foi administrado durante 7 semanas com início na primeira semana de treinamento, após a semana de adaptação.

Protocolo de treinamento: Para reduzir o estresse, os animais foram adaptados à água na semana pré-treinamento (semana de adaptação). Esta adaptação consistiu de sessões de levantamento de peso (50% da carga de peso corporal), uma vez por dia durante 5 dias em água a 30 ± 2 ° C. A sobrecarga foi fixada no peito do animal, usando um colete adequado que permitia a execução dos saltos sem que a vestimenta caísse do corpo do mesmo. O número de séries (2-4) e repetições (5-10) foi ajustado diariamente e aumentado gradualmente. Todas as sessões foram realizadas no período da tarde, após as 16:00 horas. Após a semana de adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento de saltos, com sobrecarga ajustada de acordo com o peso corporal do animal, como descrito anteriormente (Cunha et al., 2005; Marqueti et al., 2006). O protocolo de saltos consistiu de uma primeira semana de treinamento, em que o animal executou 4 séries de 10 saltos, um período de descanso de 30 segundos entre as séries e sobrecarga de 50% do peso corporal. Durante as seis semanas restantes, o treinamento foi executado com o mesmo número de séries (4) e saltos (10) e intervalos de descanso (30 segundos entre as séries), porém, com uma

sobrecarga adicional de 5%/semana, chegando a 80% do peso corporal na última semana. Todos os animais foram pesados três vezes/semana.

Preparação do tecido: Após sete semanas os animais foram eutanasiados e o tendão calcâneo (TC), tendão flexor superficial (TFS) e tendão flexor profundo (TFP) foram imediatamente dissecados e tratados com o reagente estabilizador RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acordo com o manual do fabricante e armazenadas a -20 °C. Esses tendões foram divididos em regiões proximal e distal (para o TC) e proximal, intermediária e distal (região para o TFS e TFP).

Extração de RNA: As regiões dos tendões foram transferidas em gelo seco para uma câmara refrigerada com temperatura mantida a -20 C onde foram pesadas e cortadas para melhor homogeneização. A extração de RNA total de cada região foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Gibco) pelo método descrito por Chomczynski and Sacchi (1987). Após o isolamento da fase aquosa, o RNA foi precipitado usando isopropanol. O *pellet* foi lavado em etanol e subsequentemente dissolvido em 10 µl de água livre de RNases. A concentração de RNA em cada região dos tendões foi determinada utilizando-se o reagente fluorescente *Ribogren* (Qiagen).

RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)

Um total de 40 ng de RNA de cada região dos tendões foram convertidos em cDNA (volume final 20 µl) usando o Sensiscript Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com o manual do fabricante. Foi preparado um único Master Mix para processar as 140 amostras contendo: 332 µl de tampão RT (transcrição reversa); 332 µl de dNTP (deoxynucleotide triphosphate); 332 µl de oligo dT (10 uM); 161 µl da enzima transcriptase reversa e 483 µl de água livre de RNase. Foram adicionados 10 µl de Master Mix em cada amostra. As

amostras foram incubadas a 37°C por 1 h e após foram incubadas por mais 15 minutos a 70 °C.

As reações foram efetuadas utilizando-se 5 µl de cDNA diluído em tampão TE e DNA de salmão (Sigma), para todos os genes avaliados, adicionados a uma reação contendo 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix, 100nM de cada *primer* e 7,45 µl de água livre de RNase, em uma solução com volume final de 25 µl.

Real Time-PCR

A amplificação em cadeia da Polimerase (PCR) foi monitorada em tempo real usando a máquina MX3000P real-time PCR (Stratagene, CA). As amostras foram distribuídas de forma aleatória e corridas em placas de 96 poços com uma curva padrão em duplicata feita de produtos de PCR clonados e especificamente confirmada pela curva de *melt* após a amplificação. A condição de ciclagem para todos os *primers* foram: Segmento 1: 10 minutos a 95 °C; Segmento 2: 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C e 1: 30 minutos a 63 °C; Segmento 3: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 55 °C e 30 segundos a 95 °C. Estes segmentos acima citados foram repetidos até completar um total de 50 ciclos. A tabela 1 mostra os a seqüência senso e antisense dos *primers* que foram utilizados. A seqüência dos *primers* COL1A1, COL3A1, TGF-1, CTGF, IGF-a, MGF, GAPDH, RPLP0 foram descritos por Heinemeier e colaboradores (2009) e a seqüência dos demais *primers*, MMP-2, TIMP-2, TIMP-1, foram descritos por Heinemeier e colaboradores (2007a). Os valores de Ct (*cycle threshold*) das amostras foram relacionados com a curva padrão. Os dados foram analisados usando o método de comparação absoluta por meio da curva padrão que possibilitou determinar a diferença entre os valores de Cts das amostras.

Normalização dos dados: O gene RPLP0 (*Ribossomal protein PO*) foi escolhido como controle interno, assumindo que o mRNA do RPLP0 tenha sido expresso constitutivamente

(Dheda et al. 2004). O GAPDH, outro gene constitutivo usado, foi mensurado e o RPLPO foi normalizado pelo GAPDH. No entanto, um estudo mostra que os genes constitutivos podem ser influenciados por alguns tipos de intervenções (Heinemeier et al. 2007b). No presente estudo observamos que tanto o RPLPO como o GAPDH mostraram alterações não apenas nas intervenções bem como nas diferentes regiões dos tendões de animais sedentários. Porém, a razão RPLPO/GAPDH variou menos que a razão GAPDH/RPLPO. Por esta razão, escolhemos o RPLPO como gene constitutivo. O grupo controle (sedentário) foi considerado igual a 1 como valor de referência.

Análise estatística: todos os dados foram transformados em valores logarítmicos (\log_{10}) antes da análise estatística e foram apresentados como média geométrica \pm SE. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade e, portanto, o teste ANOVA two way (treinamento X EAA) seguida de análise múltipla de Tukey pareada foi utilizado para comparações entre os tratamentos. Para as comparações entre as regiões proximal e distal do TC foi realizado teste t de student e para as comparações entre as regiões proximal, intermediária e distal do TFS e TFP foi usada ANOVA one way seguida de análise múltipla de Tukey pareada. Para todas as comparações, a significância estatística foi considerada um nível de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). O software utilizado foi Statistica 7.0 (Stat. Soft. Inc. Tusa, Ok, USA).

Resultados

A expressão dos genes descritos abaixo foi avaliada nas regiões proximal e distal do TC, proximal, intermediária e distal do TFP e apenas nas regiões intermediária e distal do TFS. Neste último, não foi possível incluir a região proximal pelo fato de não apresentar quantidade de RNA suficiente para a síntese de cDNA.

COL 1A1

Nas as regiões, proximal e distal do TC (Fig. 1A e B, respectivamente) e na região proximal do TFP (Fig. 1E) o tratamento com EAA reduziu significativamente a expressão gênica do COL1A1. No TFS e TFP, tanto o tratamento com EAA quanto a associação de EAA e exercício de carga também reduziram a expressão do COL1A1 nas regiões intermediária e distal (Fig. 1C e D; F e G, respectivamente).

COL 3A1

Os achados sobre a expressão gênica do colágeno tipo III (COL3A1) foram bastante similares aos descritos acima referentes ao COL1A1. O tratamento com EAA reduziu a expressão gênica COL3A1 na região distal do TC (Fig. 2B) e intermediária do TFP (Fig. 2F). A região proximal (Fig. 2A) não apresentou diferença entre os grupos. Nas regiões intermediária e distal do TFS (Fig. 2C e D, respectivamente) e proximal do TFP (Fig. 2E) tanto o tratamento com EAA quanto a associação de EAA e exercício de carga acarretaram a diminuição da expressão do COL3A1. O treinamento aumentou a expressão gênica do COL3A1 apenas na região distal do TFP (Fig. 2G).

TIMP-1

O treinamento aumentou a expressão do TIMP-1 na região proximal do TC (Fig. 3A) e região distal do TFP (Fig. 3G). O EAA também aumentou a expressão do TIMP-1 na região proximal do TC (Fig. 3A), porém a administração de EAA, bem como EAA associado ao exercício de carga diminuíram a expressão desse gene na região intermediária do TFS (Fig. 3C). As regiões: distal do TC (Fig. 3B), distal do TFS (Fig. 3D), proximal (Fig. 3E) e distal (Fig. 3F) do TFP não apresentaram diferenças na expressão de TIMP-1 entre os grupos.

TIMP-2

Com relação à expressão de TIMP-2, não houve diferenças significativas observadas entre as intervenções nas regiões proximal e distal do TC (Fig.4A e B, nesta ordem); região distal do TFS (Fig.4D) e região proximal, intermediária e distal do TFP (Fig.4E, F e G), com exceção da região intermediária do TFS onde o administração de EAA e EAA associado ao exercício de carga diminuíram a expressão de TIMP-2 (Fig. 4C).

MMP-2

O tratamento com EAA diminuiu a expressão do gene da MMP-2 nas regiões proximal e distal do TC (Fig. 5A e B, respectivamente) e região proximal do TFP (Fig.5 D). Além disso, a associação de EAA e exercício de carga reduziram a expressão da MMP-2 nas regiões distal do TC (Fig. 5B) e intermediária do TFP (Fig. 5E). Não foram observadas diferenças na expressão desse gene nas regiões intermediária do TFS (Fig. 5C) e distal do TFP (Fig. 5F).

IGF-Ia

O exercício de carga aumentou a expressão de IGF-Ia nas regiões proximal do TC (Fig. 6A), intermediária do TFS (Fig. 6C) e região distal do TFP (Fig. 6G). Por outro lado, a administração de EAA acarretou a diminuição da expressão do IGF-Ia nas regiões intermediária do TFS (Fig. 6C) e proximal do TFP (Fig. 6E). A associação de EAA e exercício de carga também reduziram a expressão do IGF-Ia na região intermediária do TFS (Fig. 6C).

GAPDH

O exercício de carga também promoveu aumento da expressão de GAPDH nas regiões proximal do TC (Fig.7A), distal do TFS (Fig.7D) e região distal do TFP (Fig.7G). A administração de EAA aumentou a expressão desse gene na região distal do TFS (Fig.7D) e

a associação de EAA e exercício de carga aumentou a expressão do GAPDH na região distal do TFS (Fig.7D) e proximal do TFP (Fig.7E) As regiões distal do TC (Fig. 7B), intermediária do TFS (Fig.7C) e intermediária (Fig.7F) não apresentaram diferenças entre os grupos.

TC – comparação entre as regiões proximal e distal de animais sedentários

No TC (Fig. 8A) o colágeno tipo I e a MMP-2 (Fig. 8E) foram mais expressos na região proximal. Já o colágeno tipo III (Fig. 8B) e o TIMP-1 (Fig. 8C) foram mais expressos na região distal. Os genes, TIMP-2 (Fig. 8D), IGF-Ia (Fig. 8F), TGF- β (Fig. 8G), CTGF (Fig. 8H) e o GAPDH (Fig. 8I) não apresentaram diferenças entre as duas regiões. Os genes TGF- β e CTGF permaneceram abaixo dos níveis de detecção da curva padrão nas diferentes intervenções e obtivemos resultados apenas nos animais sedentários (Fig. 8G e H, respectivamente).

TFS - comparação entre as regiões intermediária e distal de animais sedentários

Com relação ao TFS, os genes TIMP-1 (Fig. 9C), TGF- β (Fig. 9G) e CTGF (Fig. 9H) apresentaram maior expressão na região proximal. O GAPDH foi mais expresso na região distal (Fig. 9I). Os demais genes, COL1A1 (Fig. 9A), COL3A1 (Fig. 9B), TIMP-2 (Fig. 9D), MMP-2 (Fig. 9E) e IGF-Ia (Fig. 9F) não apresentaram diferenças significativas entre as regiões intermediária e distal. Os genes TGF- β e CTGF permaneceram abaixo dos níveis de detecção da curva padrão nas diferentes intervenções e obtivemos resultados apenas nos animais sedentários (Fig. 9G e H, respectivamente).

TFP - comparação entre as regiões intermediária e distal de animais sedentários

Os genes COL1A (Fig. 10A), TIMP-2 (Fig. 10D) e MMP-2 (Fig. 10E) foram mais expressos nas regiões intermediária e distal que na região proximal do TFP. Já os genes COL3A1 (Fig. 10B), TIMP-1 (Fig. 10C), TGF- β (Fig. 10G) e GAPDH (Fig. 10I) foram mais expressos nas regiões intermediária e proximal que na região distal do TFP. Apenas a região intermediária teve maior expressão do CTGF (Fig. 10H) e apenas o IGF-Ia não demonstrou diferenças entre as regiões do TFP (Fig. 10F). Os genes TGF- β e CTGF permaneceram abaixo dos níveis de detecção da curva padrão nas diferentes intervenções e obtivemos resultados apenas nos animais sedentários (Fig. 10G e H, respectivamente).

A concentração de RNA por mg/tecido nas diferentes regiões não mostrou diferença entre as regiões proximal e distal do TC (Fig. 8J). A região intermediária do TFS (Fig. 9J) e região proximal e distal do TFP (Fig. 10J) apresentaram maior concentração de RNA que a região proximal dos seus respectivos tendões.

Discussão

O presente estudo forneceu novas informações sobre os efeitos do exercício de carga, administração de EAA e a sua associação nos níveis de RNAm em diferentes regiões do tendão. A análise dos dados mostrou que o exercício modula diferentemente a expressão de genes relacionados com o remodelamento da MEC no tendão. No entanto, a administração de EAA e sua associação com o exercício demonstraram efeitos deletérios no remodelamento da ECM do tendão, o que pode estar relacionado com lesões tendíneas (Lasseter, Russell, 1991; Evans et al., 1998; Evans, 2004).

Tem sido demonstrado que o treinamento físico aumenta a síntese de colágeno tipo I no tecido conjuntivo peritendíneo em tendões de humanos (Kjaer, 2004; Heinemeier et al., 2003; Cramer et al., 2004; Olesen et al., 2006), porém há uma carência de estudos

publicados analisando a expressão de colágeno em tendões associando o exercício de carga em modelos animais. Nesse sentido, foi demonstrado que 11 semanas de exercício (alta frequência e baixa carga) aumentou os níveis RNAm do colágeno tipo III no tendão calcâneo em coelhos, porém não foram detectadas modificações no colágeno tipo I (Archambault et al., 2001). Além disso, Heinemeier e colaboradores (2007) descreveram que apenas 4 dias de treinamento concêntrico, excêntrico ou isométrico aumentaram a expressão de TGF- β -1 e do colágeno I e III no tendão calcâneo de ratas. No entanto, Legerlotz e colaboradores (2007) mostrou que o treinamento de alta intensidade durante 12 semanas, não alterou os níveis de RNAm do colágeno I e III no tendão calcâneo de ratos..

De acordo com os dados de Legerlotz et al., (2007) o presente estudo demonstrou que sete semanas de exercício de salto não alterou os níveis de RNAm do colágeno tipo I e III em todos os tendões analisados (exceto para o COLA 3A1 na região distal do TFP). Provavelmente, essas discrepâncias podem ser atribuídas às diferenças metodológicas entre os estudos, como o protocolo de treinamento e o modo que os tendões foram avaliados. Embora os estudos de Archambault et al., (2001) e Heinemeier et al., (2007) induziram a contração muscular por meio de estimulação elétrica, o protocolo usado nesse estudo foi um exercício de salto na água, que diminui a força de impacto e reduz o esforço do sistema músculo-esquelético (Irmischer et al., 2004; Tanaka, 2009, Triplett et al., 2009). Além disso, nesses estudos o padrão de recrutamento muscular foi diferente do estudo atual, como por exemplo, o número de contrações e a carga do exercício. É importante ainda ressaltar que foram analisadas diferentes regiões dos tendões (CT, TFS e TFP), enquanto esses estudos prévios (Archambault et al., 2001; Heinemeier et al., 2007) analisaram o tendão inteiro.

A ausência de alterações no colágeno I e III, também pode ser atribuída ao exercício de longa duração utilizado no presente estudo (7 semanas) e por Legerlotz et al., (12 semanas), já que Heinemeier et al., (2007) demonstraram que o exercício de curta duração (4

dias) aumentou os níveis de RNAm do colágeno tipo I e III no tendão calcâneo de ratos. Além disso, Miller e colaboradores (2005) mensuraram o colágeno do tendão patelar e a síntese de colágeno do músculo quadríceps em humanos e mostraram que o colágeno aumentou de forma acentuada e rápida (pico de 24 h, e aos poucos diminuiu para valores iniciais após 72 h) após o exercício (extensão de joelho a 67% da carga máxima). Coletivamente, estes resultados sugerem que as diferenças entre os protocolos de treinamento desempenham um importante papel na expressão de colágenos tipo I e III.

Foi demonstrado que o exercício de carga pode regular a expressão de fatores de crescimento capazes de estimular a síntese de colágeno, como o TGF- β -1, CTGF e IGF-1 (Chiquet et al., 2003). Nesse sentido, Heinemeier et al., (2007) revelaram um importante mecanismo molecular pelo qual o TGF- β -1 induz o aumento da expressão gênica do colágeno tipo I e III durante o treinamento físico no tecido tendíneo. No presente trabalho os níveis de RNAm do TGF- β -1 e do CTGF ficaram abaixo do nível de detecção da curva padrão nos grupos T, EAA e EAAT. Portanto, não foi possível comparar nossos resultados com estudos anteriores.

Em relação à expressão gênica do IGF-1, foi observado um aumento no CT (região proximal), TFS (região intermediária) e TFP (região distal) nos grupos treinados. É possível especular que essa alteração esteja relacionada com a tentativa do IGF-Ia em estimular a produção de colágeno durante o exercício de carga (Hishikawa et al., 2001; Heinemeier et al., 2007; Heinemeier et al., 2009). No entanto, de maneira diferente da síntese de colágeno, o IGF-Ia é regulado tanto no treinamento agudo, como no crônico (Frystyk, 2010). Como não foi observada modificação na expressão gênica dos colágenos tipos I e III nos grupos treinados, é possível sugerir que o exercício de salto na água utilizado neste estudo não foi suficiente para sobrecarregar os tendões, e como resultado, não induziu a síntese de colágeno mediada pelo IGF-1. Além disso, é interessante observar que o protocolo de

treinamento altera a expressão do IGF-1 apenas em algumas regiões tendíneas. É possível que diferentes regiões do mesmo tendão respondam de maneira diferente ao exercício de carga, uma vez que estas regiões apresentam aspectos distintos na sua morfologia e bioquímica (Covizi et al., 2001; Marqueti et al., 2008). No entanto, não foram observadas diferenças na expressão do IGF-1 em todas as regiões nos tendões de animais sedentários. Isto sugere que as diferenças regionais na expressão do IGF-1 estão relacionadas ao exercício de carga. Além disso, esse foi o primeiro estudo que analisou os efeitos do treinamento e do EAA nos marcadores moleculares em diferentes regiões dos tendões. Embora seja complexo discutir e comparar nossos resultados em relação à expressão dos fatores de crescimento (IGF-1, CTG-F e TGF- β) devido à escassez de artigos, outros estudos serão importantes avaliar a expressão gênica de diferentes regiões do tendão para futuras comparações.

As gelatinases (MMP-2 e 9) degradam fragmentos de colágeno liberados durante a atividade das colagenases (Visse, Nagase, 2009). Nesse estudo, não foi observada alteração na MMP-2 nos animais treinados. Este fato está de acordo com estudos anteriores, que descreveram que 12 semanas de treinamento de força não modificou a expressão gênica da MMP-2 e do TIMP1 no tendão calcâneo de ratos (Legerlotz et al., 2007).

Além disso, em um estudo anterior, utilizando o mesmo modelo experimental, Marqueti et al. (2008) demonstraram que o treinamento alterou a concentração total de MMP-2 e % da forma ativa em algumas regiões tendíneas dos três tendões avaliados (TC, TFS e TFP). Apesar da complexa regulação das MMPs e da dificuldade para inferir detalhes de um padrão espacial e temporal da expressão do seu RNAm e da sua atividade (Page McCaw et al., 2007), é possível sugerir que a ausência da modificação do conteúdo de RNAm na MMP-2 pode estar relacionado com a não alteração do conteúdo proteico da MMP-2 (Carmeli et al., 2004; Page McCaw et al., 2007), como observado no estudo anterior

do nosso grupo de pesquisa por meio de zimografia (Marqueti et al., 2008). Coletivamente, estes dados sugerem que os níveis de expressão gênica da MMP podem não corresponder com o conteúdo de MMP tecidual. Mais estudos são necessários para esclarecer essas diferenças e a utilização de outras técnicas como zimografia *in situ* ou citometria de fluxo que são ferramentas úteis para analisar essa questão.

O presente estudo mostrou que o EAA, bem como sua associação com o treinamento físico reduziram os níveis de RNAm do colágeno I e III, na maioria dos tendões analisados. Clinicamente, esses achados são importantes para a compreensão de como a expressão do gene do colágeno é regulada pela administração dos EEA.

Previamente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que o EAA associado ao exercício de carga reduz a atividade da MMP-2 e aumenta os valores séricos de corticosterona (Marqueti et al., 2006). Parece que os EAA, em concentrações elevadas, podem se ligar aos receptores de corticóides (Rogol, Yesalis, 1992; Haupt, 1993). Neste sentido, Oikarinen et al., (1992) constataram que, durante o tratamento com corticosteróides, os níveis séricos do pró-peptídeo carboxiterminal de colágeno tipo I e pró-peptídeo aminoterminal de colágeno tipo III diminuíram, sugerindo que os corticosteróides suprimem a síntese de colágeno tipo I e III. Dessa forma, essa hipótese poderia explicar nossos resultados, entretanto, outras análises, como os microarranjos de cDNA e análises *in vitro* focando a interação entre receptores de corticóides e EAA em células do tendão são necessários para esclarecer esta hipótese.

É interessante notar que a administração de EAA reduziu os níveis de RNAm do IGF-1 nos grupos EAA e EAAT, em algumas regiões do tendão, predominantemente na região intermediária do TFS, em comparação com o grupo treinado. A redução do IGF-1 por meio da administração de EAA pode proporcionar redução na tradução e produção de

colágeno (Hishikawa et al., 2001; Heinemeier et al., 2007; Heinemeier et al., 2009), e este fato pode estar relacionado à redução dos níveis de RNAm do colágeno I e III inerente ao tratamento com EAA observado no presente estudo.

Para entender a ação dos EAA sobre a expressão de IGF-Ia é importante ressaltar que estudos em músculo esquelético demonstraram que a sua perfusão intravenosa estimulou a síntese protéica (Fryburg, 1994). Foi demonstrado que os andrógenos são necessários para a produção local de IGF-Ia no músculo esquelético independentemente do IGF-Ia sistêmico, bem como dos níveis de produção de hormônio do crescimento (GH) (Fryburg, 1994). Assim, Mauras et al., (1998) relataram que o hipogonadismo resultou em redução dos níveis de RNAm do IGF-Ia no músculo esquelético de homens jovens saudáveis. Esta informação corrobora os nossos achados, uma vez que o decanoato de nandrolona é um esteróide predominantemente anabólico e com baixa taxa androgênica, isso gera comumente deficiência androgênica e supressão da função testicular (Kutscher et al., 2002).

O tratamento com EAA também diminuiu a expressão de MMP-2 na região proximal e distal do CT e na região proximal da TFP, e também na região distal do CT e da região intermediária da TFP quando o treinamento foi associado com o EAA. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que relatam que a EAA e o exercício de carga inibiram a atividade MMP-2 avaliada por zimografia em distintas regiões no tendão de ratos (Marqueti et al. 2006; Marqueti et al., 2008). Está bem descrito que a expressão gênica da MMP-2 é regulada por vários fatores, dentre eles os ésteres de forbol, sinalização por integrinas, proteínas extracelulares e mudanças na forma celular (Kheradmand et al., 1998; Sternlicht Werb, 2001). Apesar desse fato, a inter-relação entre as vias de sinalização que regulam a expressão da MMP-2 não são totalmente conhecidas (Sternlicht Werb, 2001; Page-McCaw et al., 2007).

Nesse sentido, foi demonstrado que os receptores de glicocorticóides se ligam ao complexo de proteínas AP-1, e desta maneira evitam a ativação de genes que contém o AP-1 no sítio de ligação do seu promotor. A MMP-1 e MMP-9 possuem um sítio de ligação para o AP-1 em seus promotores e a sua expressão pode ser regulada por meio dele (Barnes, 1998). Além disso, a dexametasona (um esteróide sintético) pode bloquear a indução da MMP-9 e retarda a indução de MMP-2 no endotendão ou em células da bainha do tendão (Ritty, Herzog, 2003). Parece que o fator nuclear de transcrição kappa-B (NF-kB) induz um mecanismo de controle alternativo para a MMP-2. Em células endoteliais, a expressão da MMP-2 é mediada pela ativação de NF-kB (Kim et al., 2000) e nos macrófagos alveolares, a ativação do NF-kB resultou no aumento da expressão da MMP-2 e MMP-9 (Yoshida et al. 2001). Além disso, a NF-kB é conhecida por ser inibida por receptores de glicocorticóides (Barnes, 1998) e este pode ser o mecanismo pelo qual a dexametasona reduz a MMP-2 nas células do endotendão. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Nos grupos EAA e EAAT, a expressão do TIMP-1 e 2 demonstraram valores opostos quando comparado com aos níveis de RNAm da MMP-2 na maioria das regiões dos tendões. Provavelmente, essa alteração fisiológica foi uma tentativa de inibir a expressão da MMP-2, uma vez que alterações dos níveis dos TIMPs são consideradas importantes, pois afetam diretamente a atividade das MMPs (Visse, Nagase, 2003). Além disso, alguns efeitos dos TIMPs nos processos biológicos não podem ser explicados apenas pela inibição da atividade das MMPs (Brinckerhoff, Matrisian, 2002). Dessa forma, a sinalização induzida pelos TIMPs durante o exercício físico tem que ser investigada com mais detalhes (Suhr et al., 2009).

Além disso, foi observado um aumento nos níveis de RNAm de GAPDH nos grupos T, EAA e suas associações, na maioria das regiões tendíneas, o que poderia estar

relacionado a uma resposta metabólica no tendão iniciada por estas intervenções. A natureza desta resposta em relação à GAPDH é difícil de especular, já que esta enzima parece ter outras funções, além de sua função metabólica, incluindo o envolvimento nos mecanismos moleculares da iniciação apoptótica (Tarze et al., 2007).

Este estudo foi pioneiro em avaliar a expressão gênica em diferentes regiões do TC, TFS e TFP em animais sedentários, porém nenhum estudo foi encontrado que descrevesse a expressão gênica em diferentes regiões de tendões, o que limita a comparação e discussão dos nossos resultados. Além disso, outro fator limitante nesse estudo foi a ausência da região intermediária e distal do TFS por motivos já descritos anteriormente, fato que limitou a discussão sobre a expressão gênica no TFS.

Foi observado que a maioria dos genes analisados teve sua expressão alterada de acordo com cada região. O colágeno tipo I foi mais expresso na região proximal do TC, enquanto o colágeno tipo III foi mais expresso na região distal. A região proximal e distal do TC também são denominadas regiões de tensão e compressão, respectivamente (Vidal, Carvalho, 1990; Covizi et al., 2001). É possível que a região proximal do TC, por ser mais tensional, expresse mais colágeno tipo I, já que o principal papel deste é resistir à tensão (Benjamin, Kaiser, Milz, 2008). Já o colágeno tipo III foi mais expresso na região de compressão. Este possui um papel fundamental na fibrilogênese do colágeno tipo I (Franchi, et al, 2001) e pode regular o diâmetro das fibrilas de colágeno I (Waggett et al., 1998). Assim, Carvalho e colaboradores (2000) descreveram que as fibras de colágeno da região de fibrocartilagem de tendão de aves (região de compressão) são muito espessas sob luz polarizada, essa informação pode ajudar a compreender o papel do colágeno III na região distal do TC.

Interessantemente, os níveis de RNAm do colágeno I e III nas 3 regiões no TFP foram diferentes com relação as regiões do TC, enquanto o TFS não mostrou diferença entre as regiões analisadas. Neste contexto, é importante entender que as regiões dos três tendões possuem uma morfologia e composição diferente (Benjamin, Ralphs, 1998). Enquanto as regiões proximais dos três tendões e distais do TFS e TFP são praticamente fibrosas e resistem às forças tensionais, as regiões intermediárias do TFP e TFS e região distal do TC estão sujeitas a diferentes níveis de forças de compressão e fricção (Covizi et al., 2001). O mecanismo pelo qual o colágeno I e III é expresso nas diferentes as regiões não está claro e mais estudos são necessários para investigar esses achados.

Os genes TIMP-1, TIMP-2 e MMP-2, também são expressos distintamente em cada região dos tendões. No TC a expressão de MMP-2 foi similar a do colágeno tipo I (maior na região proximal) e com o TIMP-1 ocorreu o inverso (expressão maior na região distal). Neste caso, a expressão de MMP-2 pode estar relacionada com a atividade inibitória dos TIMPs, ou seja, está mais expressa na região onde o TIMP-1 foi menos expresso. De acordo com Bramono e colaboradores (2004) o equilíbrio entre as atividades das MMPs e TIMPs é responsável pela regulação remodelamento do tendão normal. Porém em condições normais, as MMPs são encontradas em pequenos níveis, apresentando baixa expressão e atividade (Mott, Werb, 2004; Page-McCaw, Ewald, Werb, 2007).

Entretanto, o processo da regulação das MMPs pelos TIMPs não é simples, pois, embora os TIMPs sejam inibidores eficazes *in vitro*, *in vivo* também podem ativar as MMPs (Caterina et al., 2000; Wang, Juttermann, Soloway, 2000). Além disso, os TIMPs não são os únicos responsáveis pelo controle da atividade das MMPs, que possuem outros inibidores tais como a α 2-macroglobulina e os *Recks* (proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínio Kazal), uma glicoproteína que pode inibir MMP-2, 9 e 14 (Noda et al., 2003). Assim, sugere-se que a expressão da MMP-2 possa ser alterada por outros fatores, e não

somente pela regulação dos TIMPs. Talvez o TFP seja um bom exemplo para demonstrar que o TIMP-1 e TIMP-2 não exercem muita influência sobre a atividade da MMP-2, já que possuem expressões divergentes.

Em relação aos fatores de crescimento, não houve diferença na expressão do IGF-1 entre as regiões dos tendões. Além disso, foi observado que ambas as regiões intermediárias (TFS e TFP) aumentaram a expressão gênica do TGF- β e CTGF. É possível especular que a expressão desse gene esteja relacionada com as propriedades morfológicas locais, uma vez que o TGF- β está envolvido no processo de diferenciação das regiões do tendão submetidas à compressão, regulando a síntese de proteoglicanos e também de outras proteínas da MEC (Kjaer, 2004; Cawston, Young, 2009), bem como na proliferação de fibroblastos (Kjaer, 2004). O TGF- β , ainda pode estimular a expressão e a síntese de CTGF. Neste estudo, o CTGF pareceu acompanhar o padrão de expressão do TGF- β . Além disso, estudos recentes mostram que há uma relação direta entre o TGF- β 1 e o CTGF, sendo que o aumento da expressão de CTGF por mioblastos e miotubos *in vitro* promoveu o aumento da expressão de TGF- β 1 (Obreo et al., 2004; Maeda et al., 2005).

O GAPDH, também mostrou uma expressão variada, no TC sem alterações, e as regiões de maior expressão foram para o TFS a região distal e para o TFP a região proximal e intermediária. Assim, o GAPDH pode não ser um bom gene *housekeeping* para o tendão, pois varia também de acordo com cada tendão e em diferentes regiões.

Além da expressão gênica, a concentração de RNA também foi avaliada nas diferentes regiões. Observou-se que há uma relação entre a contração de RNA com a densidade de volume de células nas regiões estudadas (dados não publicados). Regiões com maior densidade de volume de células apresentaram também maior concentração de RNA.

Em conclusão, este estudo indicou que o exercício de salto na água não alterou a expressão de colágeno e de alguns fatores de crescimento em diferentes regiões do tendão de ratos. Porém, a administração de EAA e sua associação com o exercício demonstrou efeitos deletérios no remodelamento da MEC do tendão. Além disso, os níveis de expressão gênica nas diferentes regiões dos animais sedentários foram distintos entre si indicando que não só ocorrerem modificações estruturais e bioquímicas mas também na expressão dos principais genes responsáveis pelo remodelamento. Apesar do exercício de carga na água não ter estimulado a expressão dos principais genes avaliados o exercício de carga quando associado ao EAA resultou em efeitos negativos sobre a expressão desses mesmos comprometendo o remodelamento tecidual.

Legendas das Figuras

Fig. 1. Expressão do COL1A1 nos diferentes tratamentos considerando as regiões proximal e distal do TC (A, B), regiões intermediária e distal do TFS (C, D) e regiões proximal, intermediária e distal do TFP (E, F e G). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente do grupo sedentário; b = diferente do grupo treinado; c = diferente do grupo EAA.

Fig. 2. Expressão do COL3A1 nos diferentes tratamentos considerando as regiões proximal e distal do TC (A, B), regiões intermediária e distal do TFS (C, D) e regiões proximal, intermediária e distal do TFP (E, F e G). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente do grupo sedentário; b = diferente do grupo treinado; c = diferente do grupo EAA.

Fig. 3. Expressão do 1 TIMP-1 nos diferentes tratamentos considerando as regiões proximal e distal do TC (A, B), regiões intermediária e distal do TFS (C, D) e regiões proximal, intermediária e distal do TFP (E, F e G). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente do grupo sedentário; b = diferente do grupo treinado; c = diferente do grupo EAA.

Fig. 4. Expressão do TIMP-2 nos diferentes tratamentos considerando as regiões proximal e distal do TC (A, B), regiões intermediária e distal do TFS (C, D) e regiões proximal, intermediária e distal do TFP (E, F e G). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como

sendo: a = diferente do grupo sedentário; b = diferente do grupo treinado; c = diferente do grupo EAA.

Fig. 5. Expressão da MMP-2 nos diferentes tratamentos considerando as regiões proximal e distal do TC (A, B), regiões intermediária e distal do TFS (C, D) e regiões proximal, intermediária e distal do TFP (E, F e G). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente do grupo sedentário; b = diferente do grupo treinado; c = diferente do grupo EAA.

Fig. 6. Expressão do IGF-Ia nos diferentes tratamentos considerando as regiões proximal e distal do TC (A, B), regiões intermediária e distal do TFS (C, D) e regiões proximal, intermediária e distal do TFP (E, F e G). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente do grupo sedentário; b = diferente do grupo treinado; c = diferente do grupo EAA.

Fig. 7. Expressão do GAPDH nos diferentes tratamentos considerando as regiões proximal e distal do TC (A, B), regiões intermediária e distal do TFS (C, D) e regiões proximal, intermediária e distal do TFP (E, F e G). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente do grupo sedentário; b = diferente do grupo treinado; c = diferente do grupo EAA.

Fig. 8. Expressão dos genes: COL1A1, COL3A1, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, IGF-I, TGF- β 1 e CTGF comparando apenas as regiões proximal e distal do TC (A-I). Concentração de RNA/mg de tecido (J). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As

diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente da região proximal.

Fig. 9. Expressão dos genes: COL1A1, COL3A1, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, IGF-I, TGF- β 1 e CTGF comparando apenas as regiões intermediária e distal do TFS (A-I). Concentração de RNA/mg de tecido (J). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente da região proximal.

Fig. 10. Expressão dos genes: COL1A1, COL3A1, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, IGF-I, TGF- β 1 e CTGF comparando apenas as regiões proximal, intermediária e distal do TFP (A-I). Concentração de RNA/mg de tecido (J). Os valores foram expressos como médias geométricas \pm SE. As diferenças relevantes entre os grupos foram demonstradas como sendo: a = diferente da região proximal, b = diferente da região intermediária.

Tabela 1 *Primers* utilizados no *Real-Time PCR*

RNA _m	<i>Primer</i> Senso	<i>Primer</i> Antisenso
COL1A1	ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA	CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG
COL3A1	TGATGGGATCCAATGAGGGAGA	GAGTCTCATGGCCTTGCGTGTTT
TGF- β 1	CCCCTGGAAAGGGCTCAACAC	TCCAACCCAGGTCCTTCCTAAAGTC
CTGF	CAGGCTGGAGAAGCAGAGTCGT	CTGGTGCAGCCAGAAAGCTCAA
IGF-I	GGAGGCTGGAGATGTACTGTGCT	TGTGTTCTTCAAGTGTACTTCCTTCTG
MMP-2	CTGGGTTTACCCCTGATGTCC	AACCGGGGTCCATTTTCTTCTTT
TIMP-2	GGACACGCTTAGCATCACCCAGA	GTCCATCCAGAGGCACTCATCC
TIMP-1	ATAGTGCTGGCTGTGGGGTGTG	TGATCGCTCTGGTAGCCCTTCTC
GAPDH	CCATTCTTCCACCTTTGATGCT	TGTTGCTGTAGCCATATTCATTGT
RPLP0	AGGGTCCTGGCTTTGTCTGTGG	AGCTGCAGGAGCAGCAGTGG

COL1A1 e COL3A1 colágeno tipo I e colágeno tipo III, respectivamente; TGF- β 1, fator de crescimento transformante β 1; CTGF, fator de crescimento do tecido conjuntivo; IGF-I; fator de crescimento semelhante à insulina I; MGF, fator de crescimento mecânico; MMP-2, metalopeptidase de matriz – tipo 2; TIMP 2 e TIMP-1, inibidor tecidual de metalopeptidase tipo 2 e 1, respectivamente; GAPDH, gliceraldeído 3-fosfato hidrogenase; RPLP0, Proteína ribossomal grande - P0.

Figura 1

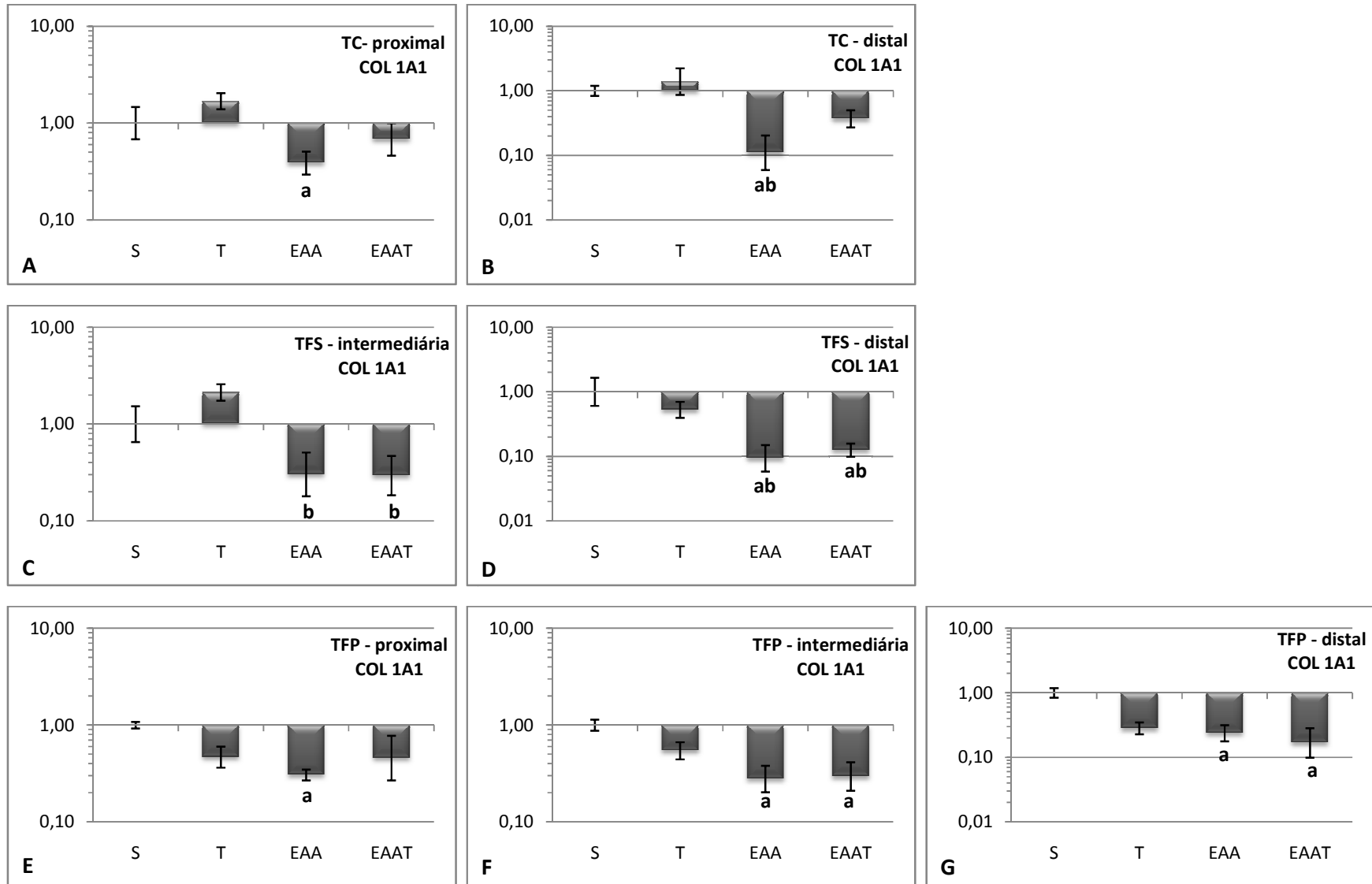


Figura 2

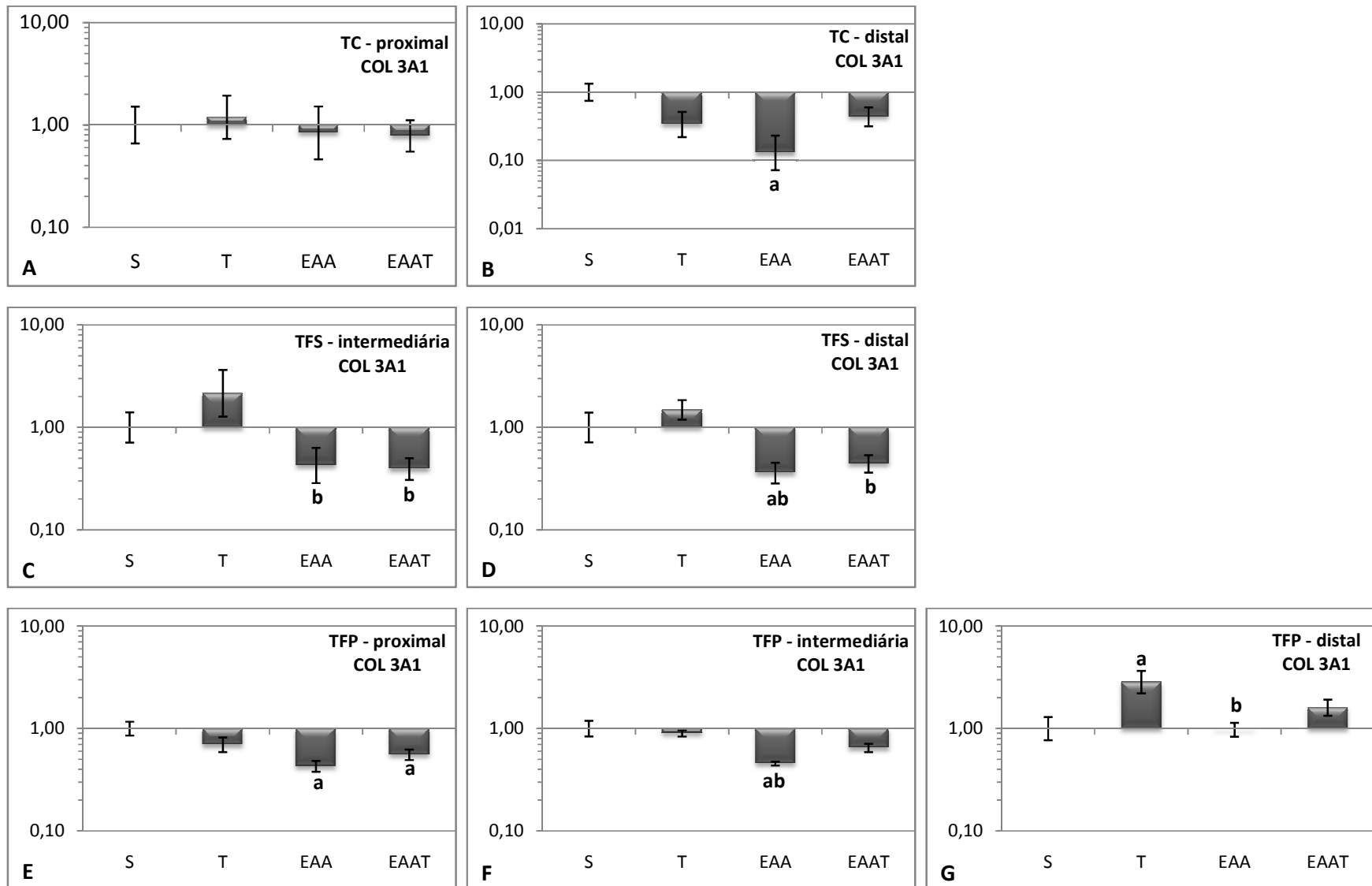


Figura 3

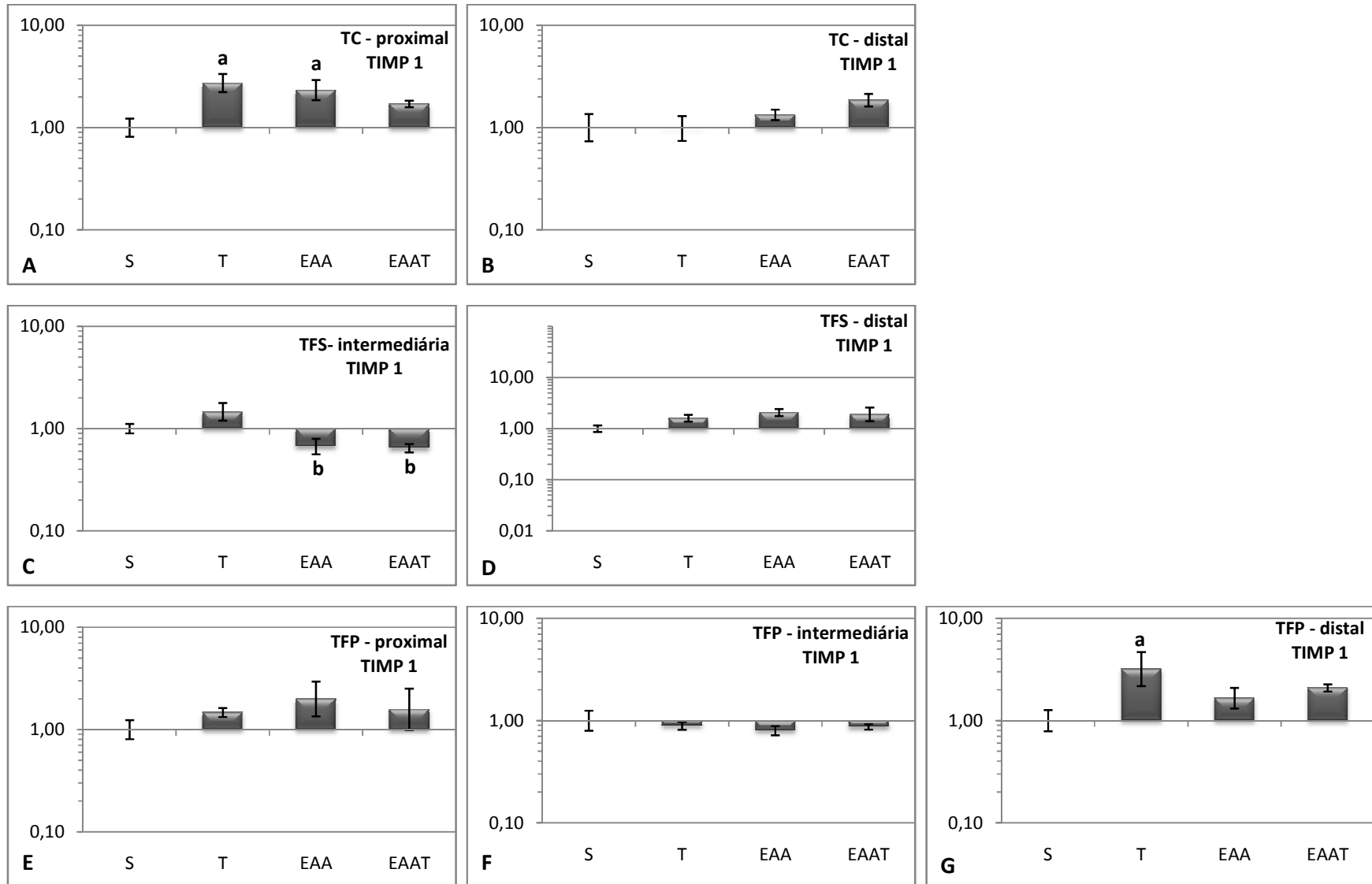


Figura 4

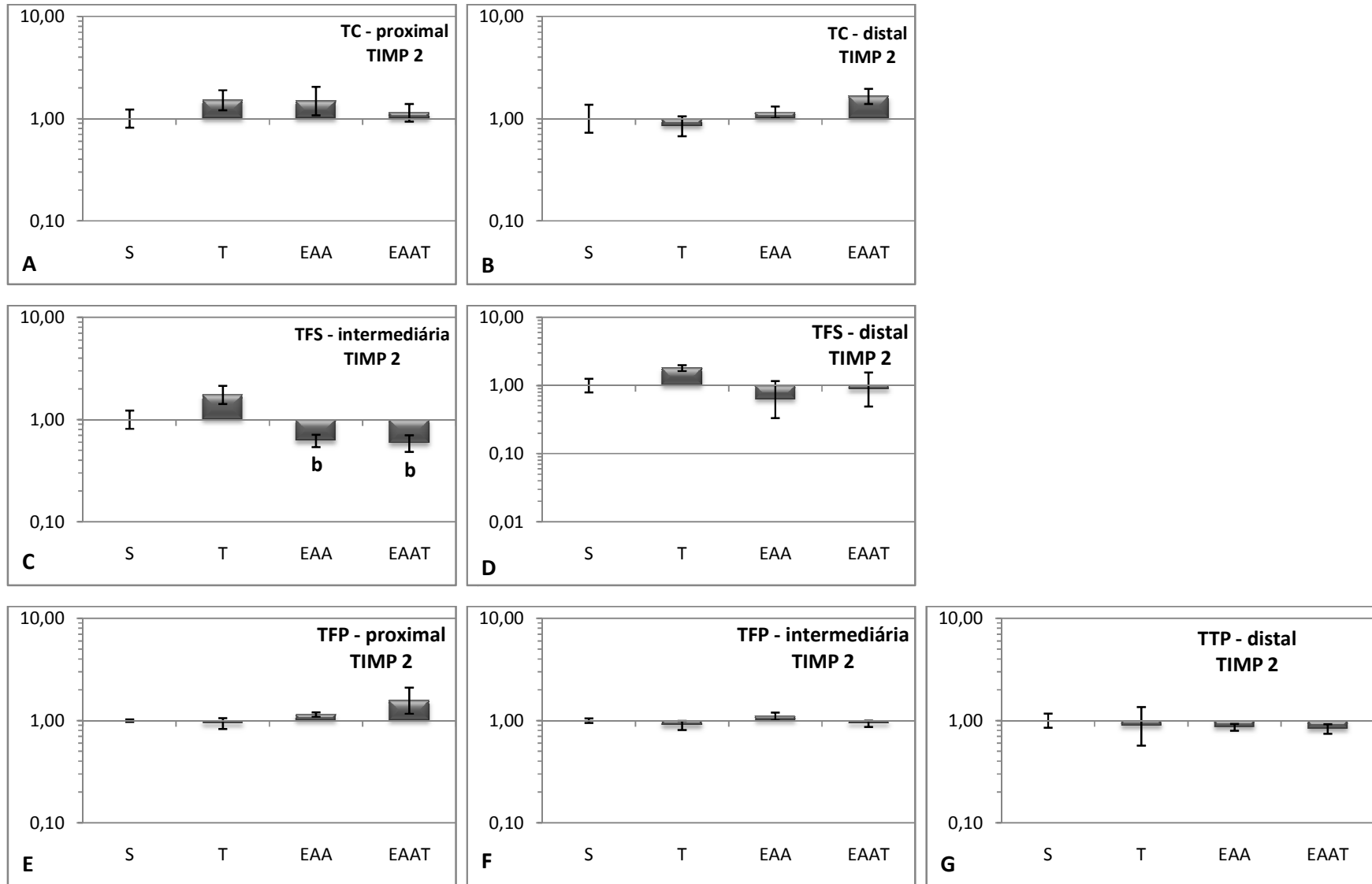


Figura 5

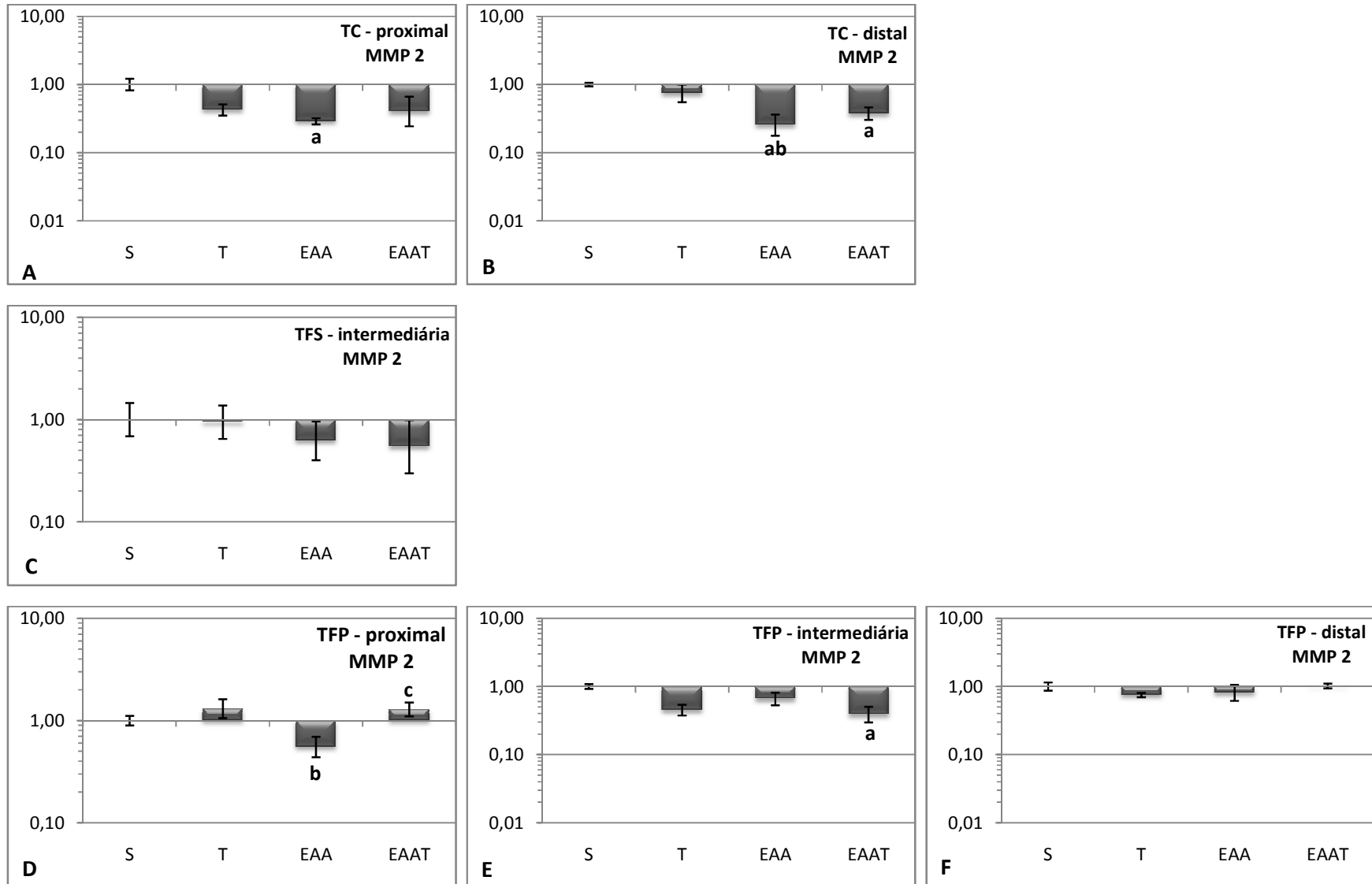


Figura 6

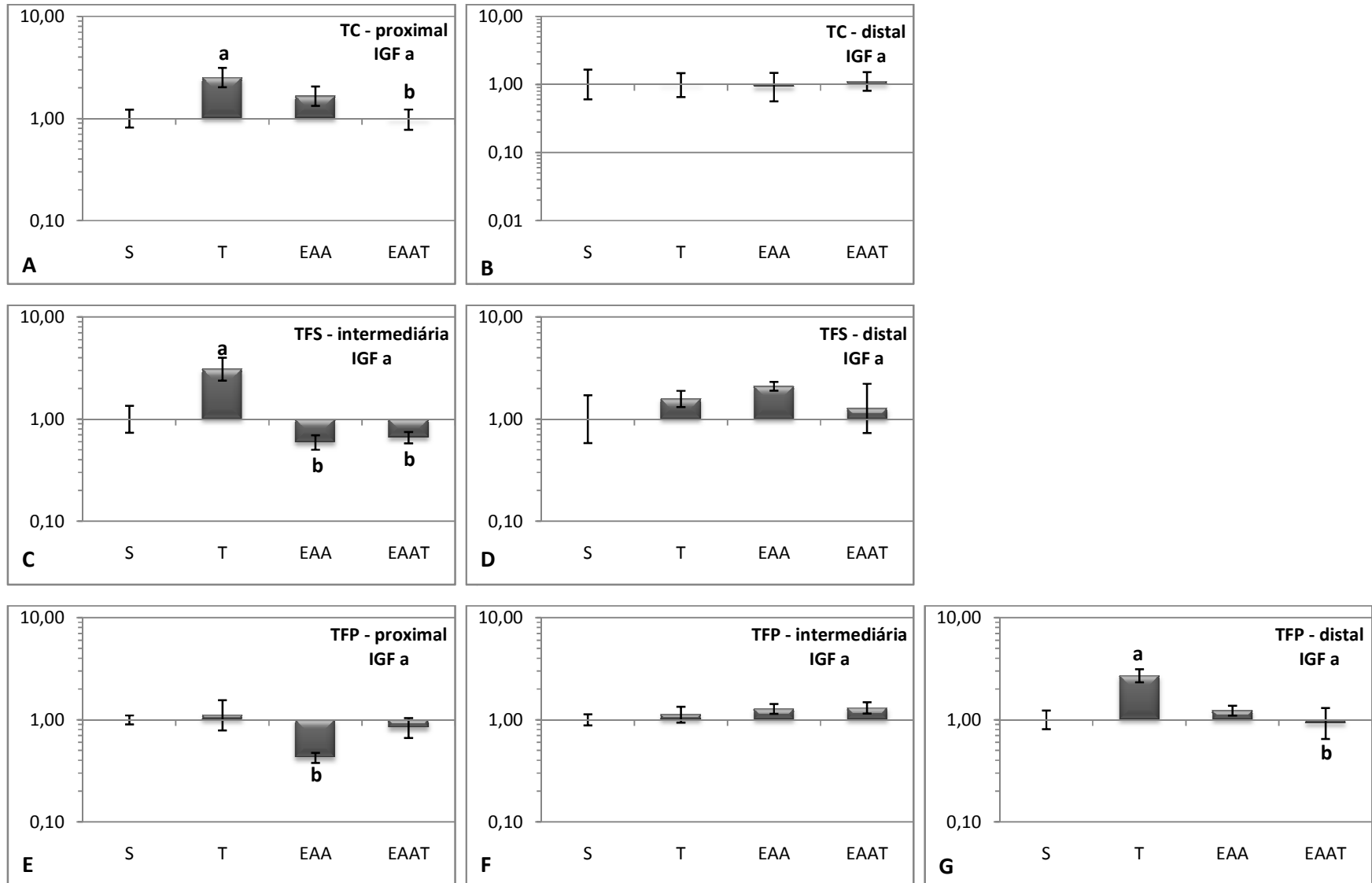


Figura 7

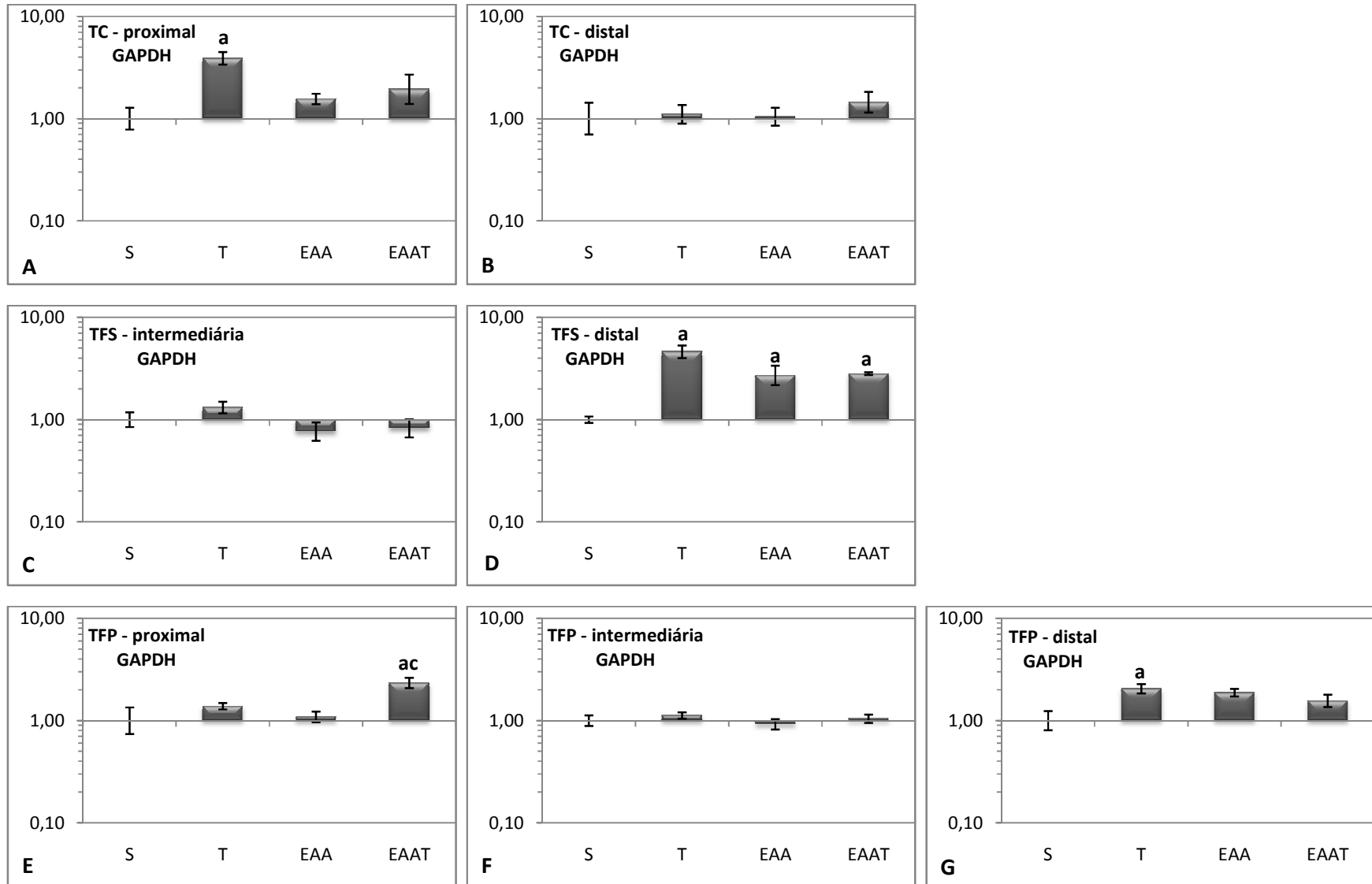


Figura 8

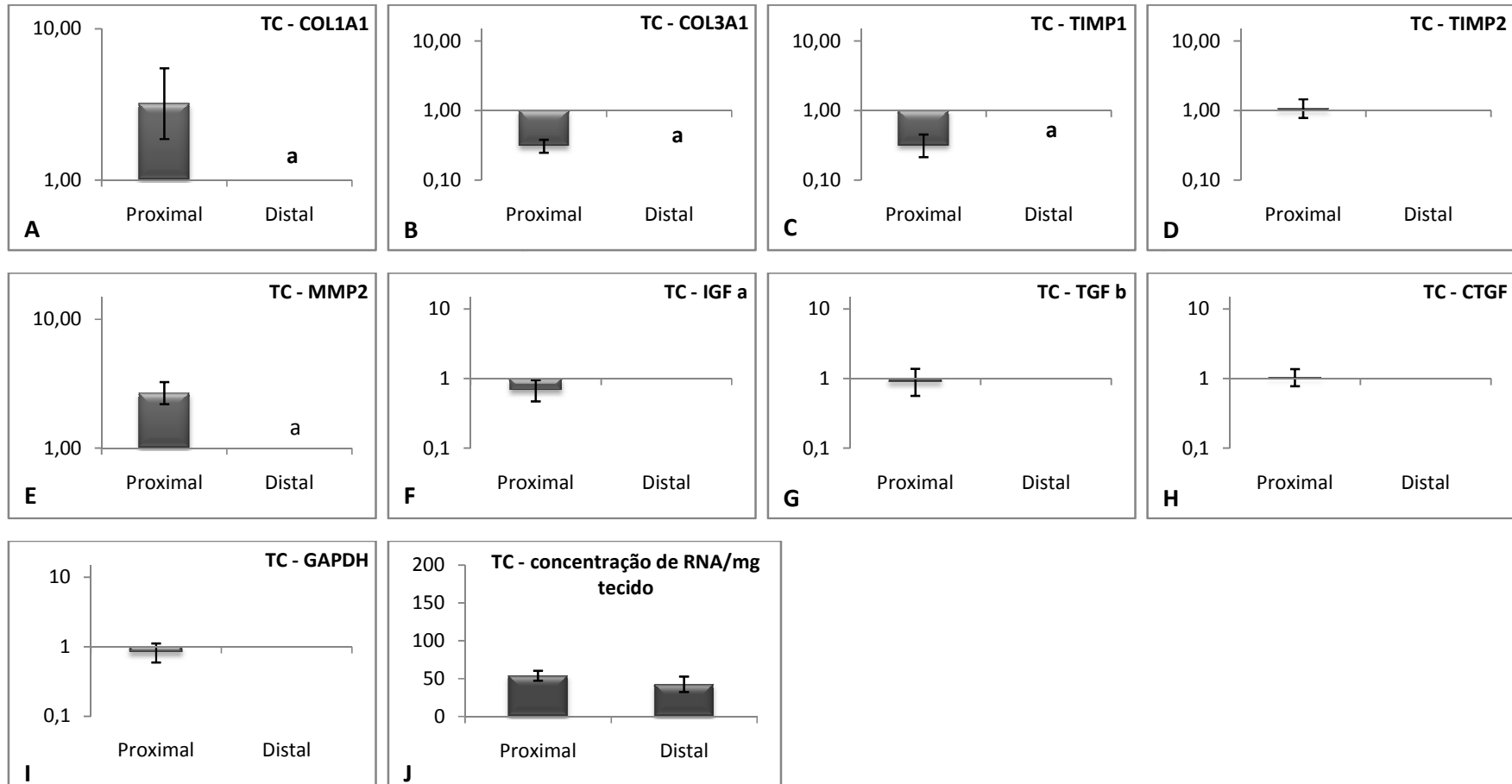


Figura 9

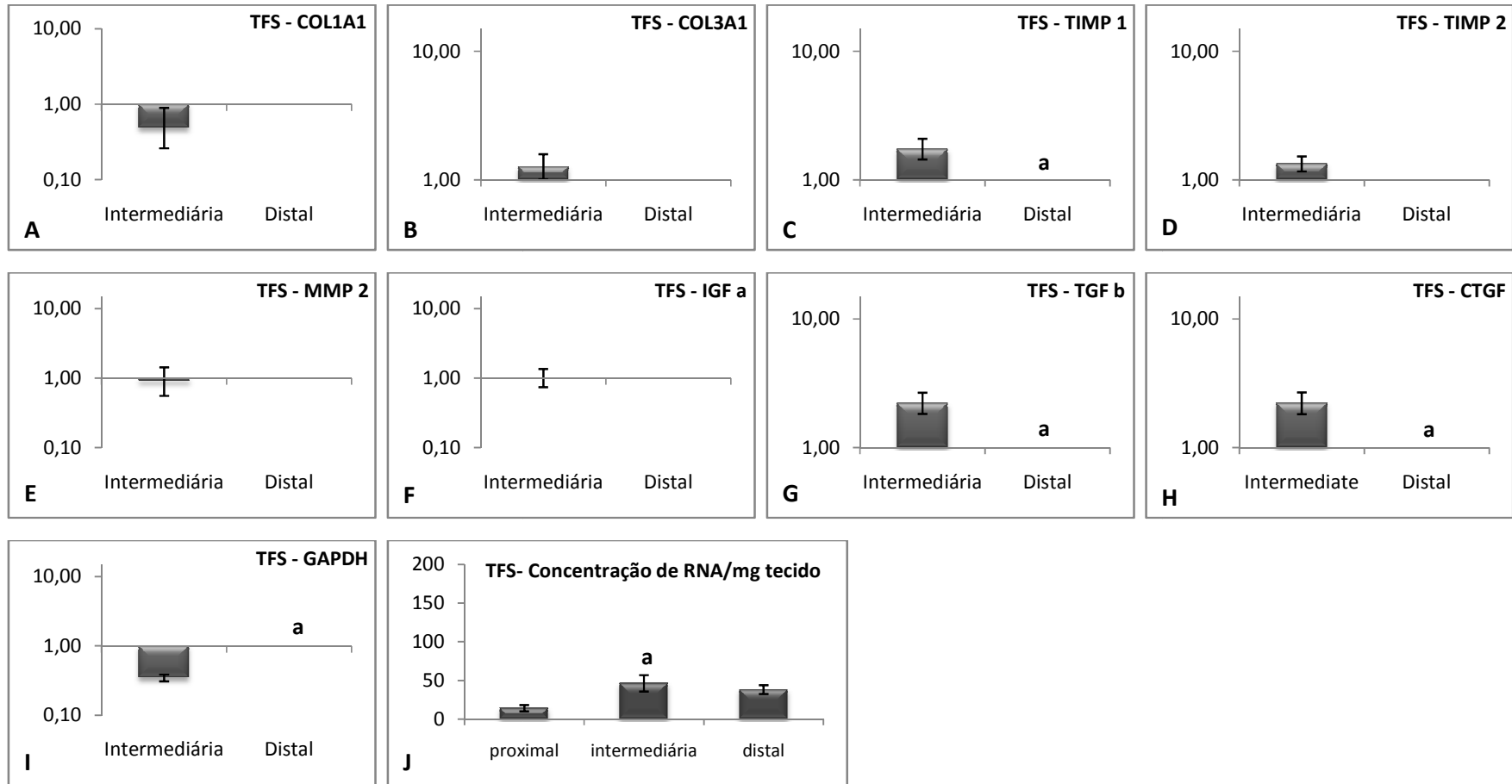
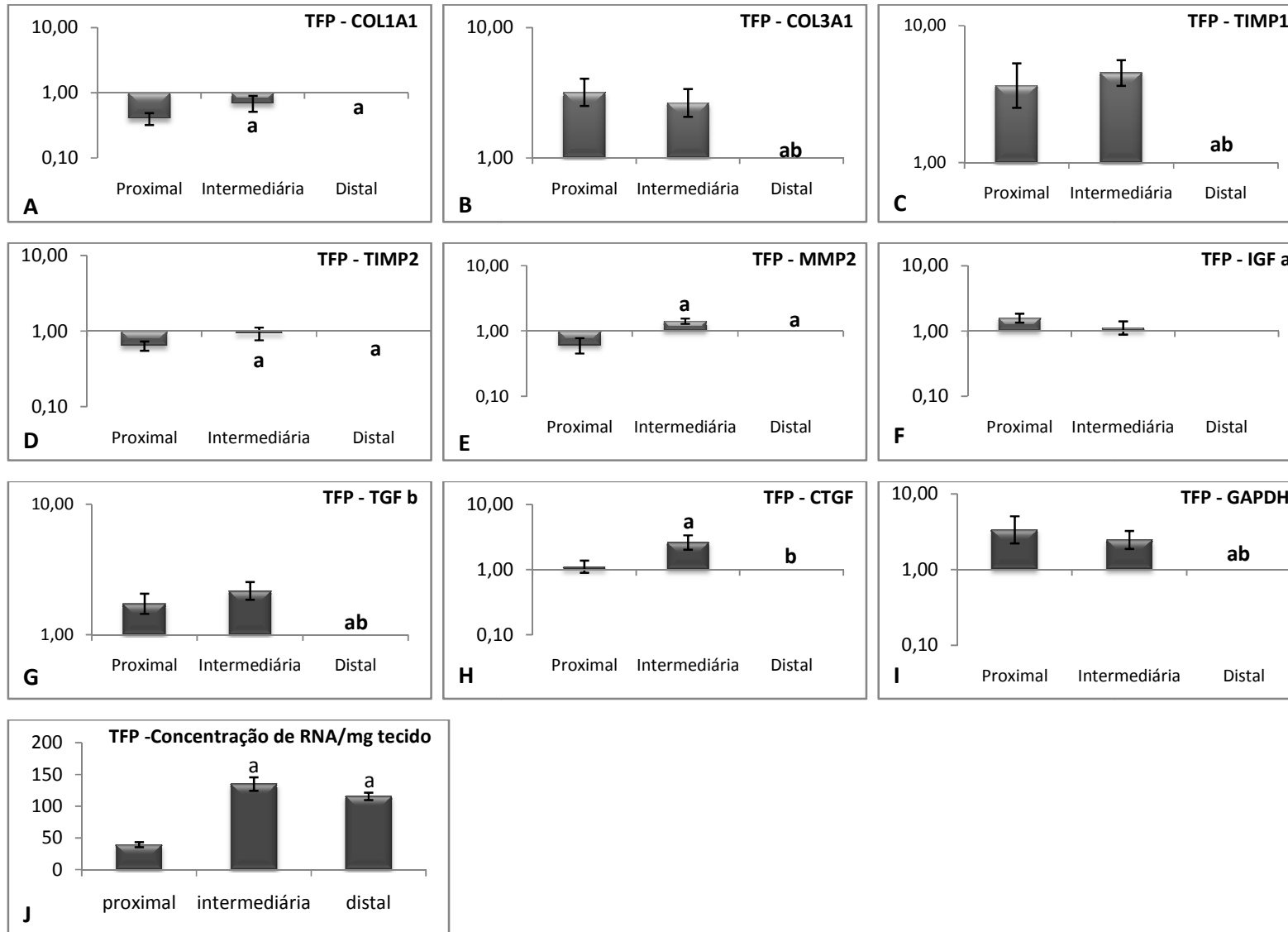


Figura 10



Referências

- Archambault JM, Hart DA, Herzog W. Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res* 42: 13–23, 2001.
- Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12: 235–243, 2000.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci* 94: 557–72, 1998.
- Benjamin M; Kaiser, E, Milz, S. Structure-function relationships in tendons: a review. *J. Anat.* 212: 211–228, 2008.
- Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat.* 193: 481-94, 1998.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 207-214, 2002.
- Carmeli E, Moas, M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 29: 191-197, 2004.
- Carvalho HF, Felisbino SL, Covizi DZ, Della Colleta HH, Gomes L. Structure and proteoglycan composition of specialized regions of the elastic tendon of the chicken wing. *Cell Tissue Res* 300: 435–446, 2000
- Caterina JJ, Yamada S, Caterina NC, Longenecker G, Holmback K, Shi J, et al. Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *J Biol Chem* 275: 26416-2622, 2000.
- Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol Ther* 70: 163-182, 1996.
- Chen SJ, Yuan W, Lo S, Trojanowska M, Varga J. Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2 (I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol* 183: 381-392, 2000.
- Chiquet M, Renedo AS, Huber F and Fluck M. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* 22: 73-80, 2003.

- Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 911-920, 2009.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159, 1987.
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cell* 33: 483–490, 2001.
- Crameri RM, Langberg H, Teisner B, Magnusson P, Schroder HD, Olesen JL, Jensen CH, Koskinen S, Suetta C, Kjaer M Enhanced procollagen processing in skeletal muscle after a single bout of eccentric loading in humans. *Matrix Biol* 23: 259–264, 2004.
- Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. Influence of high-intensity training and anabolic steroids treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sciences*, 77: 1030 – 1043, 2005.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37: 112–119, 2004.
- Evans NA Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sport Med* 32: 534-538, 2004.
- Evans NA, Bowrey DJ, Newman GR. Ultrastructural analysis of ruptured tendon from anabolic steroid users. *Injury* 29: 769–773, 1998.
- Franchi M, Trirè A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *The Scientific World Journal* 7: 404-420, 2007
- Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107: 404-411, 1996.
- Fryburg DA. Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol* 267:E331–E336, 1994.
- Frystyk J. Exercise and the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Med Sci Sports Exerc.* 42: 58-66, 2010.

- Gomez DE, Alanso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111–122, 1997.
- Gutierrez JA, Perr HA. Mechanical stretch modulates TGF-beta1 and alpha1(I) collagen expression in fetal human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 277: G1074-80, 1999.
- Haupt HA, Rovere GD. Anabolic steroids: a review of the literature. *Am J Sports Med* 12: 469-484, 1984.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, Schjerling P. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol* 582: 1303–1316, 2007a.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM, Kjaer M. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol* 102: 573–581, 2007b.
- Heinemeier K, Langberg H, & Kjaer M. Exercise-induced changes in circulating levels of transforming growth factor-beta-1 in humans: methodological considerations. *Eur J Appl Physiol* 90, 171-177, 2003.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Schjerling P, Baldwin KM, Kjaer M. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J Appl Physiol* 106: 178–186, 2009.
- Hishikawa K, Oemar BS, Nakaki T. Static pressure regulates connective tissue growth factor expression in human mesangial cells. *J Biol Chem* 276: 16797–16803, 2001.
- Irmischer BS, Harris C, Pfeiffer RP, DeBeliso MA, Adams KJ, Shea KG. Effects of a knee ligament injury prevention exercise program on impact forces in women. *J Strength Cond Res* 18: 703–7, 2004.
- Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280: 898-902, 1998.
- Kim SG, Kim HJ, Choi SH, Ryu JY. Inhibition of lipopolysaccharide-induced I-kappaB degradation and tumor necrosis factor-alpha expression by dimethyl-4,4'-dimethoxy-

- 5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB): minor role in hepatic detoxifying enzyme expression. *Liver* 20: 319-29, 2000.
- Kim SG, Akaike T, Sasagaw T, Atomi Y & Kurosawa H. Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struct Funct* 27, 139–144, 2002.
- Kjaer M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Muscle Skeletal to Mechanical Loading. *Physiological Review* 84: 649 – 698, 2004.
- Kjaer M., Langberg H., Miller BF., Boushel R., Crameri R., Koskinen S., Heinemeier K., Olesen JL., Døssing S., Hansen M., Pedersen SG., Rennie MJ., Magnusson P. Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5: 41-52, 2005.
- Kjaer M. The secrets of matrix mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports* 19:455-6, 2009.
- Koskinen SO, Wang W, Ahtikoski AM, Kjaer M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V, Takala TE. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: 1292-300, 2001.
- Koskinen SOA, Heinemeier KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M. Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Phys* 96: 861-864, 2004.
- Kovanen V, Suominen H, Peltonen L. Effects of aging and life-long physical training on collagen in slow and fast skeletal muscle in rats. A morphometric and immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 248: 247-255, 1987.
- Kovanen V. Effects of ageing and physical training on rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 135: 1–56, 1989.
- Kutscher EC, Lund BC, Perry PJ. Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports Med* 32: 285-96, 2002.
- Laseter JT, Russel JA. Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 23: 1-3, 1991.

- Laseter JT, Russel JA. Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 23:1-3, 1991.
- Legerlotz K, Schjerling P, Langberg H, Bruggemann GP, Niehoff A. The effect of running, strength, and vibration strength training on the mechanical, morphological, and biochemical properties of the Achilles tendon in rats. *J Appl Physiol* 102, 564–572, 2007.
- Maeda N, Kanda F, Okuda S, Ishihara H, Chihara K. Transforming growth factor-beta enhances connective tissue growth factor expression in L6 rat skeletal myotubes. *Neuromuscul Disord* 15: 790-3, 2005.
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicol Lett* 158:167-175, 2005.
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chrigger RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am. J. Sport Med* 34: 1274-1280, 2006.
- Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF, et al. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol*.104:1087-93, 2008.
- Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M, Veldhuis JD, Urban RJ. Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1886–1892, 1998.
- Michna H. Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int Orthop* 11: 157-162, 1987.
- Miles JW, Grana WA, Egle D, et al. The effect of anabolic steroids on the biochemical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint SurgAm* 74: 411-422, 1992.
- Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16:558-564, 2004.
- Nakatani T, Marui T, Hitora T, Doita M, Nishida K & Kurosaka M. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor- β 1. *J Orthop Res* 20, 1380–1386, 2004.

- National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 1996.
- Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling *Cancer Metastasis Rev* 22: 167-75, 2003.
- Obreo J, Díez-Marques L, Lamas S, Düwell A, Eleno N, Bernabéu C, Pandiella A, López-Nova JM, Rodríguez-Barbero A. Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* 14: 301-10. 2004.
- Oikarinen A, Autio P, Vuori J, Väänänen K, Risteli L, Kiistala U, Risteli J. Systemic glucocorticoid treatment decreases serum concentrations of carboxyterminal propeptide of type I procollagen and aminoterminal propeptide of type III procollagen. *Br J Dermatol* 126: 172-8, 1992.
- Olesen JL, Heinemeier KM, Haddad F, Langberg H, Flyvbjerg A, Kjaer M & Baldwin KM. Expression of insulinlike growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, and collagen mRNA in mechanically loaded plantaris tendon. *J Appl Physiol* 101, 183–188, 2006.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221-233, 2007,
- Pärssinen M, Karila T, Kovanen V, Seppälä T. The effect of supraphysiological doses of anabolic androgenic steroids on collagen metabolism. *Int J Sports Med* 21:406-41, 2000.
- Pasternak B, Aspenberg P. Metalloproteinases and their inhibitors—diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics. *Acta Orthopaedica* 80: 693–703, 2009.
- Pope HG Jr, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroids use. *Am J Psychiatry* 145:487-490, 1988.
- Ritty TM, Herzog J. Tendon cells produce gelatinases in response to type I collagen attachment. *J Orthopaed Res* 21:442-450, 2003.
- Roberts AB, Piek E, Bottinger EP, Ashcroft G, Mitchell JB, Flanders KC. Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 120: 43- 47, 2001.

- Rogol AD, Yesalis CE. Clinical review 31: Anabolic-androgenic steroids and athletes: what are the issues? *J Clin Endocrinol Metab* 74: 465-9, 1992.
- Sarasa-Renedo A, Chiquet M. Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand J Med Sci Sports* 15: 223-230, 2005.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516, 2001.
- Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathological remodelling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 148: 1345-1350, 1996.
- Suhr F, Brixius K, Bloch W. Angiogenic and vascular modulation by extracellular matrix cleavage products. *Curr Pharm Des*; 15:389-410, 2009.
- Tanaka H. Swimming exercise: impact of aquatic exercise on cardiovascular health. *Sports Med* 39: 377-87, 2009.
- Tarze A, Deniaud A, Le BM, Maillier E, Molle D, Larochette N, Zamzami N, Jan G, Kroemer G, Brenner C. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 26: 2606–2620, 2007.
- Triplett NT, Colado JC, Benavent J, Alakhdar Y, Madera J, Gonzalez LM, Tella V. Concentric and impact forces of single-leg jumps in an aquatic environment versus on land. *Med Sci Sports Exerc* 41: 1790-1796, 2009.
- Vidal BC, Carvalho HF. Aggregation state e molecular order of tendons as a function of age. *Matrix* 10: 48-57, 1990.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839, 2003.
- Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagen and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 16: 457-470, 1998.
- Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 275: 26411–26415, 2000.

- Yang G, Crawford RC, Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J Biomech* 37: 1543-1550. 2004.
- Yoshida M, Korfhagen TR, Whitsett JA. Surfactant protein d regulates nf-kappa band matrix metalloproteinase production in alveolar macrophages via oxidant-sensitive pathways. *J Immunol*;166:7514-9, 2001.
- Zhang J, Yang L, Tang Z, Xue R, Wang Y, Luo Z, Huang W, Sung KL. Expression of MMPs and TIMPs family in human ACL and MCL fibroblasts. *Connect Tissue Res* 50:7-13, 2009.
- Zhang W, Ou J, Inagaki Y, Greenwel P, Ramirez F Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2(I)-collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* 275: 39237-39245, 2000.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS



Botanisk Have - Copenhagen - Dinamarca

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

- Os tendões dos animais sedentários apresentaram características bioquímicas, celulares, mecânicas, moleculares e anatômicas variáveis em cada região, exceto as propriedades mecânicas, pois avaliamos o tendão inteiro. Essas peculiaridades revelaram que os tendões possuem uma grande capacidade de se organizar, adaptar e resistir ao estresse das forças mecânicas diárias bem como as derivadas de um exercício com carga.
- O exercício de carga promoveu adaptações e/ou pelo menos manutenção das propriedades tendíneas citadas acima respondendo positivamente ao estímulo mecânico. Deste modo, os tendões apresentaram capacidade de se remodelar de acordo com as forças tensionais, compressivas e friccionais aplicadas.
- A administração suprafisiológica de EAA afetou negativamente muitas propriedades tendíneas descritas anteriormente, comprometendo o remodelamento tecidual predispondo risco de lesões aos tendões levando à perda da funcionalidade. No entanto, a associação do EAA ao exercício de carga foi mais prejudicial do que a administração de EAA isolado.

Algumas limitações desse estudo valem a pena ser comentadas. No início desse projeto não levamos em consideração a avaliação dos respectivos músculos (gastrocnêmio, sóleo, flexor digital profundo e flexor digital superficial) que conectam os tendões estudados aos ossos. Depois de um tempo, percebemos o quanto seria interessante analisar as variáveis estudadas em conjunto com estes músculos, como por exemplo, a expressão de genes (da via hipertrófica, colágenos, fatores de crescimento, entre outros) a histologia e zimografia dos mesmos. Talvez, essa avaliação mais completa nos fornecesse informações adicionais sobre a magnitude do exercício ou significância do modelo experimental utilizado (salto vertical na água), bem como dos efeitos dos esteróides anabolizantes nesse tecido. Mecanicamente,

poderíamos avaliar a razão força músculo/tendão para saber o quanto os tendões realmente foram afetados pelo salto vertical e/ou pelo EAA. Dessa forma, essas considerações servirão de exemplo e estímulos para nortear os próximos estudos.