

**Efeitos do destreinamento e da interrupção do uso de esteroides anabólicos androgênicos  
sobre as propriedades morfológicas do tendão calcâneo de ratos**

**Livia Larissa Batista e Silva**

**Orientador(a): Profa. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan**

**Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde**

**Faculdade de Ceilândia**

**Universidade de Brasília**

**Efeitos do destreinamento e da interrupção do uso de esteroides anabólicos androgênicos sobre as propriedades morfológicas do tendão calcâneo de ratos**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.**

**Brasília, 2016**

**Banca examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan (Presidente) – UnB/FCE

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira (Examinador Interno) - UnB/FCE

Prof. Dr. Guilherme Borges Pereira (Examinador Externo) - UCB

Prof<sup>a</sup>. Dra. Jamila Reis de Oliveira (Suplente) – UnB/FCE

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1 Morfologia Tendínea .....	8
1.2 Treinamento.....	12
1.3 Esteroides Anabólicos Androgênicos.....	14
1.4 Destreinamento.....	17
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	19
2.1 Objetivos Específicos.....	19
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Procedimento experimental.....	19
3.3 Análise das Imagens.....	21
3.4 Análise Estatística.....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	22
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização Hierárquica do tendão

Figura 2: Feixes de fibras de colágeno e fibroblastos

Figura. 3: Curvas tensão 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)

Figura 4: Organograma do desenho experimental

Figura 5: Anova two way- Imediatamente após

Figura 6: Histologia- Imediatamente após

Figura 7: Anova two way- 6 semanas após

Figura 8: Histologia- 6 semanas após

Figura 9: Teste T não pareado- Análise temporal do grupo S

Figura 10: Teste T não pareado- Análise temporal do grupo T

Figura 11: Teste T não pareado- Análise temporal do grupo EAA

Figura 12: Teste T não pareado- Análise temporal do grupo EAAT

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

TC: Tendão calcâneo

MMPs: Metaloproteinases de matriz

MEC: Matriz extracelular

TIMPs: Inibidor de MMPs

TGF1: Fator de Crescimento  $\beta$ 1

CTGF: Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

TFS: Tendão Flexor Superficial

TFP: Tendão Flexor Profundo

UnB: Universidade de Brasília

UCB: Universidade Católica de Brasília

Ufscar: Universidade Federal de São Carlos

$\mu$ m- Micrômetro

IB- Instituto de Biologia

HE- Hematoxilina/Eosina

MMP-2: Metaloproteinases de matriz 2

PG: Proteoglicano

GAG: Glicosaminoglicano

EAA: Esteroide Anabólico Androgênico

EAAT: Esteroide Anabólico Androgênico Associado ao Treinamento

S: Sedentário

T: Treinado

EPM: Erro Padrão da Média

Vv%: Densidade de volume

Pe: Camada Peritendínea

6S: 6 semanas

IA: Imediatamente após

PICP: Pró-colágeno tipo I

RNAm: RNA mensageiro

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

PBS: Tampão salina fosfato

## RESUMO

**Introdução:** A combinação dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) com o exercício pode induzir alterações patológicas em tendões, porém pouco se sabe sobre os efeitos do destreinamento e da interrupção da administração dos EAA sobre os tendões. **Objetivo:** Analisar os efeitos do destreinamento e da interrupção do uso de decanoato de nandrolona sobre as propriedades morfológicas do tendão calcâneo (TC) de ratos, imediatamente e 6 semanas após a administração. **Material e métodos:** Ratos *Wistar* foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 10/grupo): sedentário (S), treinados (T), tratados com EAA (Deca-Durabolin 5 mg/kg de peso corporal, duas vezes por semana) (EAA) e animais tratados com EAA e treinados (EAAT). O protocolo de treinamento consistiu em 1 semana de adaptação (2-4 series, 5-10 saltos, 30s de descanso e 50% de sobrecarga) e 7 de treinamento (4 series de 10 saltos, 30s de descanso e um aumento na sobrecarga de 5%/semana chegando a 80%). **Resultados:** Os principais achados sugerem que o treinamento aumentou a vascularização e celularidade da camada peritendínea (Pe). O uso de EAA aumentou a Vv% de células do tendão propriamente dito (TPD) e redução na Vv% de células adiposas e comparado ao grupo T também mostrou uma redução na vascularização e celularidade da camada externa. O grupo EAAT mostrou uma redução na adiposidade, comparado ao T, além de redução na vascularização e celularidade da camada Pe. O grupo destreinado (T) não apresentou alterações. O grupo em que foi interrompida a administração de (EAA) mostrou um aumento na adiposidade e redução na celularidade das camadas interna e externa. O grupo interrupção associado ao destreinamento (EAAT) mostrou uma redução na adiposidade comparado ao EAA, redução na vascularização e celularidade da camada Pe, comparados ao grupo T e redução de células do TPD. A análise temporal mostrou que o destreinamento foi representado por um aumento na adiposidade e células internas, além de redução na vascularização. A interrupção da administração de EAA foi representado por aumento na adiposidade e de células da camada Pe, além de redução na celularidade do TPD. A associação da interrupção da administração com o destreinamento mostrou um aumento em todas as variáveis na região distal e redução na celularidade do TPD, na região proximal. **Conclusão:** Os benefícios do treinamento permanecem mesmo após 6 semanas de destreino, porém isso só é observado quando ocorre a interrupção da administração de EAA.

**Palavras Chaves:** tendão, esteróides anabólico-androgênicos (EAA), exercício de carga, morfologia.

## ABSTRACT

**Introduction:** The combination of anabolic-androgenic steroids (AAS) with exercise can induce pathological changes in tendons, but little is known about the effects of detraining and discontinuation of the EAA on the tendons. **Objective:** To analyze the effects of detraining and discontinuing the use of nandrolone decanoate on the morphological properties of the Achilles tendon (CT) mice immediately and 6 weeks after administration. **Methods:** Wistar rats were divided into four experimental groups (n = 10 / group): sedentary (S) trained (T), treated with AAS (Deca-Durabolin 5 mg / kg of body weight twice per week) (EAA) and animals treated with AAS and trained (EAAT). The training protocol consisted of one week of adaptation (2-4 series, 5-10 jumps, 30s rest and 50% overload) and 7 training (4 series of 10 jumps, 30 seconds of rest and an increase in overhead 5% / week reaching 80%). **Results:** The main findings suggest that training increased vascularization and cellularity Peritendinous layer (Pe). The use of EAA increased Vv% tendon cell itself (TPD) and Vv% reduction in fat cells and compared to the T group also showed a decrease in cellularity and vascularity of the outer layer. The EAAT group showed a decrease in adiposity, compared to T, and reduction in vascularization and cellularity Fr layer. The untrained group (T) had no change. The group that was interrupted administration of (EAA) showed an increase in adiposity and reduced cellularity of the inner and outer layers. The interruption group associated with detraining (EAAT) showed a reduction in adiposity compared to the EAA, reduced vascularization and cellularity Pe layer, compared to the T group and reducing TPD cells. The temporal analysis showed that the detraining was represented by an increase in adiposity and internal cells, and decrease in vascularization. Discontinuation of EAA administration was represented by an increase in adiposity and Pe layer of cells, and reduced cellularity of TPD. The administration of termination of association with detraining showed an increase in all variables in the distal region and reduced cellularity of the TPD in the proximal region. **Conclusion:** The training benefits remain even after 6 weeks of detraining, but this is only observed when the interruption occurs EAA administration.

**Keywords:** tendon, anabolic-androgenic steroids (AAS), load exercise, morphology.



## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 Morfologia Tendínea

Anatomicamente, o tendão calcâneo (TC) se origina a partir dos músculos gastrocnêmio e sóleo e se insere no osso calcâneo. Os tendões têm a função de dissipar as forças de tração produzidas pelos músculos para a unidade subsequente, determinando, dessa forma, o grau de movimento articular produzido (Wang, 2006; Benjamin *et al.*, 2008). Além disso, são 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).

Em relação a sua composição, por se tratar de um tecido conjuntivo, a divisão acontece entre o meio celular e a matriz extracelular (MEC) (Wang, 2006). Em relação ao meio celular, os fibroblastos (tenoblastos e tenócitos) compreendem 90-95% dos elementos, juntamente com células endoteliais e mastócitos (Kannus, 2000; Kjaer, 2004; Wang, 2006) que se distribuem entre os feixes de fibras colágenas, ao longo do eixo de força, na direção do estresse fisiológico. Essas células monitoram continuamente a magnitude e a direção desta força, conectando-se umas às outras através de junções do tipo *gap* (Wang, 2006) e sintetizam vários elementos da MEC, incluindo colágeno, proteoglicanos (PGs) e outras proteínas (Magnusson *et al.*, 2003)

A ligação entre os fibroblastos e a MEC ocorre por meio das integrinas (receptores de superfície celular de adesão) através de um processo conhecido como mecanotransdução, que conecta o citoesqueleto intracelular à matriz, permitindo a propagação de sinais mecânicos de fora para dentro e de dentro para fora (bidirecional) (Franchi *et al.*, 2007). Através desse mecanismo o estresse mecânico age sobre as células iniciando processos de sinalizações intracelulares, promovendo, em alguns casos o crescimento celular, alteração morfológica e na arquitetura de diversos tipos celulares, além de influenciar em respostas metabólicas (Kjaer, 2004; Chiquet-Ehrismann, Tucker, 2004; Chiquet *et al.*, 2009).

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). A MEC tendínea é formada aproximadamente por 70% de água, com boa parte associada aos

glicosaminoglicanos (GAGs), além de PGs, glicoproteínas de adesão, proteínas não colagenosas e proteínas fibrosas (colágeno e elastina) (Wang, 2006).

Os tendões são compostos por cerca de 60-85% de colágeno (predominantemente do tipo I) arranjado em fibras resistentes à tensão, além 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 alinhamento do colágeno tipo I garante a integridade estrutural dos tendões (Yoon, Halper, 2005).

A formação do colágeno se dá por meio do tropocolágeno, três cadeias peptídicas helicoidais e espiralada. A grande quantidade de ligações cruzadas, existente na sua molécula, torna essa estrutura altamente resistente a forças de tensões. O colágeno tipo I é constituído por duas cadeias polipeptídicas  $\alpha 1$  e uma  $\alpha 2$  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, é o segundo colágeno mais comumente encontrado, 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 (Waggtett et al., 1998). A associação de colágeno tipo I e III é essencial para a fibrilogênese nos tendões (Banos et al., 2008).

A arquitetura tendínea é considerada uma estrutura altamente organizada hierarquicamente de forma a controlar as cargas tensionais unidirecionais (Kjaer, 2004). As moléculas de tropocolágeno são organizadas e agrupadas em microfibrilas e, posteriormente, em fibrilas. Esses feixes primários unem-se para a formação dos fascículos (menores unidades funcionais do tendão). Abrangendo os fascículos, encontra-se o endotendão, uma camada de tecido conjuntivo, com estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. Agrupando os endotendões de forma organizacional, encontra-se o epitendão, que é uma rede relativamente densa de colágeno fibrilar responsável por envolver o tendão propriamente dito. Por fim, chegamos ao paratendão, camada de tecido conjuntivo frouxo constituído principalmente de colágeno I e III e fibras elásticas, mais vascularizada que pode se tornar uma camada dupla, preenchida por líquido sinovial (produzido pela membrana sinovial) em tendões sujeitos à fricção (Kannus, 2000; Sharma e Maffulli, 2005) (Fig1).

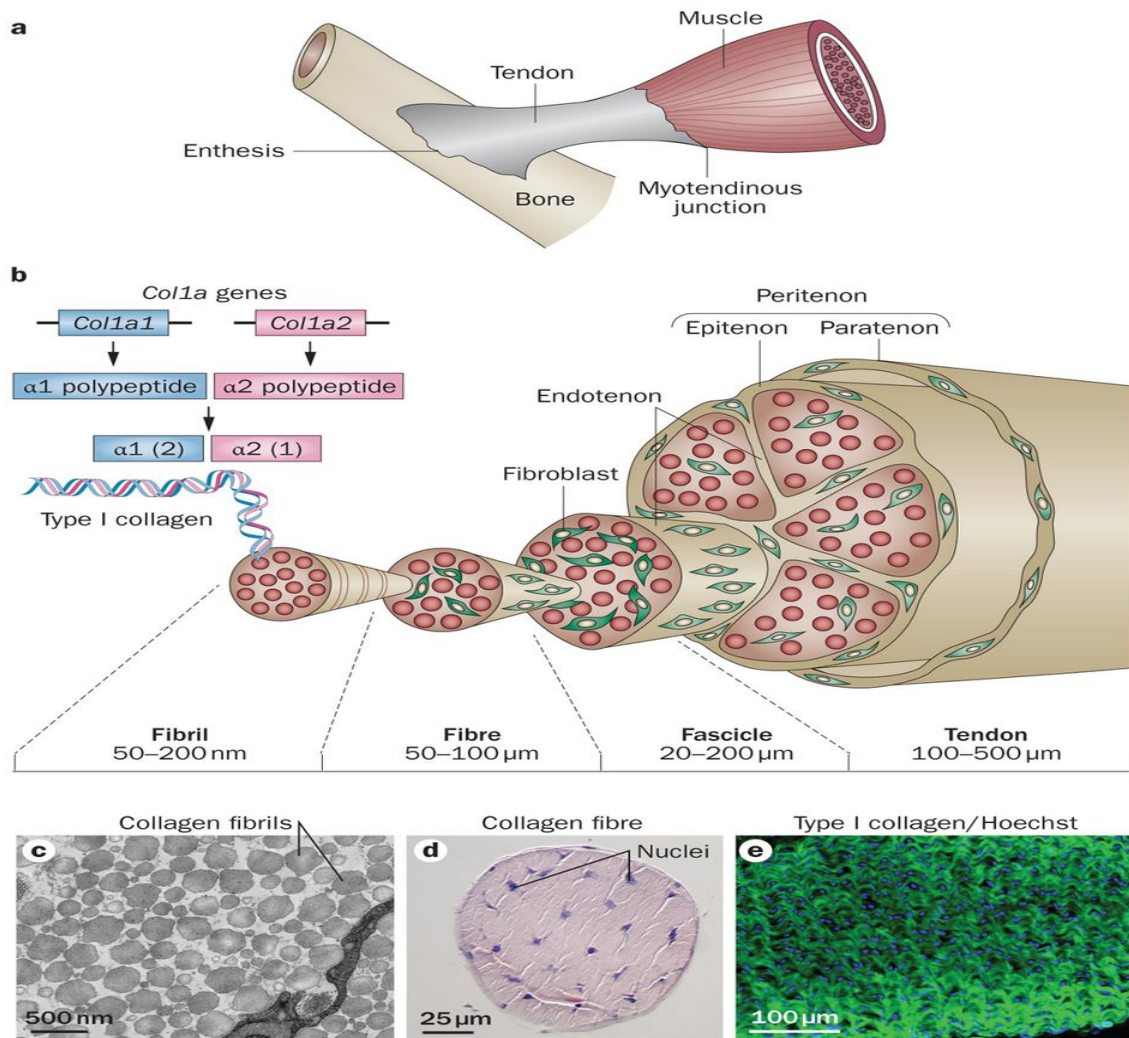


Fig1. Organização Hierárquica do tendão (Nourissat et al., 2015)

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, cuja característica garante a integridade estrutural e biomecânica do tecido, sendo suplementado por várias PGs e outras proteínas não colagenosas (Ritty, Herzog, 2003). 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).

As fibras colágenas por possuírem ondulações, denominadas de conformação *crimp*, quando uma pequena força tênsil é aplicada permite que o tendão seja alongado facilmente e se comporte como um bom material elástico. Embora as fibras sejam inelásticas, o tendão pode responder de modo elástico pelo recuo e elasticidade do tecido conjuntivo (Fig.2) (Marqueti et al, 2013).

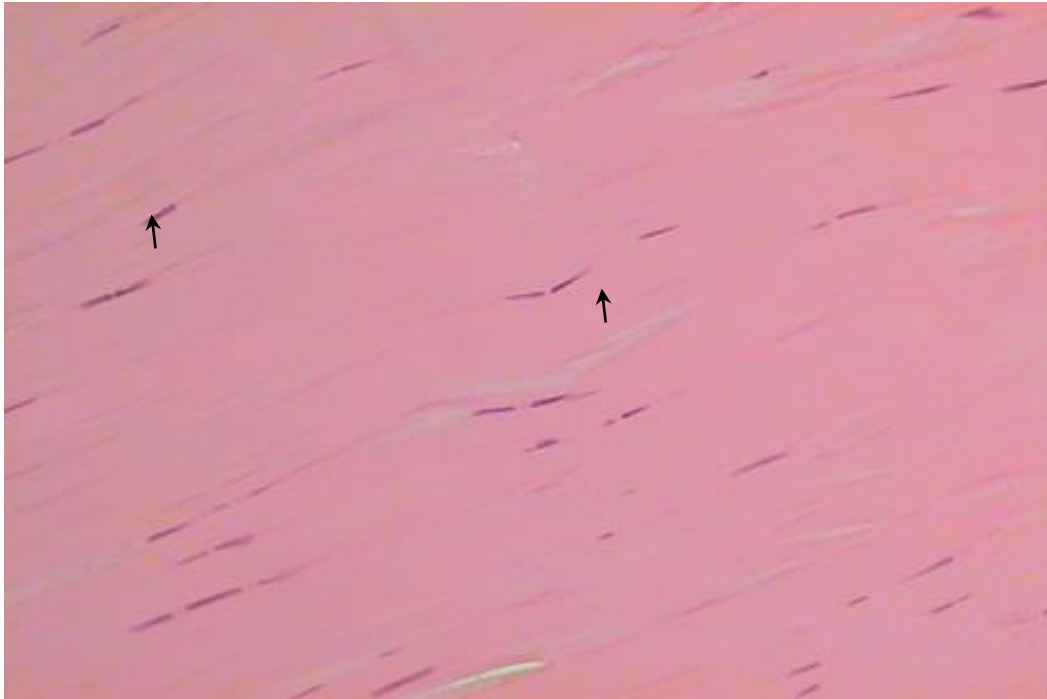


Fig.2 Secção longitudinal de tendão flexor superficial eosina mostrando as ondulações dos feixes de fibras de colágeno e os fibroblastos (Marqueti *et al.*, 2013).

Em relação às proteínas não colagenosas, os PGs e glicoproteínas são essenciais para garantir a ligação entre as fibras de colágeno, a difusão de moléculas de água, a fibrilogênese do colágeno e para manter a estrutura da matriz (Rees *et al.*, 2000; Sharma e Maffulli, 2005).

Dentre as glicoproteínas, a tenascina-C atua na estabilidade e estruturação da MEC e sua expressão é maior em tecidos onde o volume de turnover da MEC está mais ativo, já a fibronectina serve de ponte entre as células e a MEC (Hynes, 1999; Jarvinen *et al.*, 1999).

A maior parte desses elementos já citados são renovados dentro da MEC por meio de processos moleculares, realizados pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). As MMPs são enzimas proteolíticas, responsáveis pela degradação do colágeno, PGs, elastina e outros componentes da MEC, além disso atua na recuperação do tecido após a lesão e ampliação da atividade metabólica, apresentando um papel fundamental no *turnover* da MEC (Kjaer, 2004; Marqueti *et al.*, 2006; Marqueti *et al.*, 2008). Sendo assim, os TIMPs têm o objetivo de controlar a degradação excessiva desses componentes, prevenir alterações exacerbadas e regular as atividades das MMPs e, conseqüentemente, da MEC (Del Buono *et al.*, 2013). Todo esse mecanismo desencadeia o remodelamento tendíneo.

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).

## 1.2 Treinamento

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). Tem sido bem demonstrado que o exercício físico aumenta a síntese de colágeno tipo I no tecido conjuntivo peritendíneo do tendão calcâneo (TC) em humanos (Kjær, 2004; Koskinen et al., 2004). Trabalhos prévios mostraram aumento do número de fibroblastos na região peritendínea e da atividade de 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). Essas alterações também 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). Foi demonstrado que o exercício de carga pode regular a expressão de fatores de crescimento capazes de estimular a síntese de colágeno, como o fatores de crescimento  $\beta$ 1(TGF-1), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e fator de crescimento semelhante a insulina tipo-I (Chiquet et al., 2003).

Os tendões apresentam um aumento da área transversal e resistência à tração, bem como aumento da síntese de colágeno tipo I em resposta ao treinamento físico, resultando em hipertrofia do tendão (Woo et al., 1980; Kjaer et al., 2005; Wang, 2006; Nakagaki et al., 2007). 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 TC 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 TC 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 com o treinamento de longa duração (Buchanan, Marsh, 2002; Koongsgaard et al., 2007; Couppé et al., 2008).

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 no tecido. Esta estratégia deve incluir o aumento no remodelamento do tecido.

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. A atividade da MMP-2 é encontrada em tecidos sob constante remodelamento, e um aumento desta atividade é geralmente indicativo de degradação da MEC e aumento do remodelamento tecidual, fator fundamental para permitir o crescimento do tecido. O exercício de carga aumentou significativamente a atividade da MMP-2 no TC e nos músculos gastrocnêmio e sóleo, sugerindo que o remodelamento tecidual foi provavelmente aumentado para permitir a adaptação do tendão em resposta à demanda mecânica e conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento da força muscular (Marqueti et al., 2006). O *turnover* da MEC 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 MMPs em resposta à carga mecânica (Buchaman, Marsh 2001; Marqueti et al., 2008).

Os tendões, são 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). 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 et al., 2009 analisaram o TC 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, além disso 1 e 4 dias após os exercícios de salto e corrida houve aumento também da celularidade. 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 o exercício de carga aumenta a celularidade na região peritendínea e que isso está relacionado com o metabolismo tecidual local, pois, essa região também apresentou maior densidade de volume (Vv%) de vasos sanguíneos (Marqueti et al, 2008).

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 (Birch et al., 2008). Marqueti et al., 2008, em estudo envolvendo treinamento de salto vertical na água, concluiu 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.

### **1.3 Esteroides Anabólicos Androgênicos (EAA)**

Os EAA são hormônios sexuais masculinos, responsáveis pelas características associadas à masculinidade e ao *status* anabólico dos tecidos somáticos. Eles incluem a testosterona e seus derivados. (Junior, 2013; Abrahin et al., 2013). Os derivados sintéticos da testosterona foram desenvolvidos com o objetivo de minimizar os efeitos masculinizantes (androgênicos), maximizando assim os efeitos sobre a síntese proteica e o crescimento muscular (anabólico) (Graceli et al., 2010). Porém, o uso dos EAA a longo prazo traz um alto risco no desenvolvimento de doenças somáticas e efeitos psicológicos adversos. Alguns efeitos relatados foram: necrose avascular da cabeça do fêmur e aumento de lesões músculo-tendíneas (Marqueti et al., 2013).

Os EAA têm uma grande variedade de efeitos nos tecidos corporais. Suas ações fisiológicas ocorrem similarmente à ligação dos hormônios esteroidais a 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 e 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 esteroide usado.

Com relação às dosagens suprafisiológicas, 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.

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 suprafisiológicas 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 (Michna, 1987; Miles et al., 1992; Motram, George, 2000; Bahrke, Yesalis, 2004) bem como mudanças da morfologia da junção músculo-tendínea (Lasetter, Russell, 1990). 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). EAA e exercício quando combinados induzem a um aumento na área da secção transversal do tendão e rigidez. Há relatos ainda de que EAA induzem displasia de colágeno, inflamação e fibrose sendo que esses efeitos têm sido associados ao ângulo *crimp* e *toe region* da fibrila de colágeno, na curva de carga-deformação do tendão (Seynnes et al., 2012).

Demonstrou-se 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 ligar-se aos receptores de corticóides (Rogol, Yesalis, 1992). No estudo desenvolvido por Marqueti et al; 2013, observou-se a redução nos níveis de RNAm do IGF-1 nos grupos em que foi administrado apenas o EAA bem como no que o EAA foi associado ao treinamento, 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, mais importante ainda, a administração de EAA reverteu o efeito do treinamento no TC. Além disso, constatou-se que EAA pode induzir lesões no tendão e prejudicar o remodelamento tecidual por meio da inibição da atividade da MMP-2.

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 MEC do tendão, o que pode estar relacionado com lesões tendíneas (Lasetter, Russell, 1991; Evans et al., 1998; Evans, 2004). Experimentos em modelos animais sugerem que os EAA 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; Lasetter, Russel, 1991; Miles et al., 1992).

Com relação a avaliação biomecânica, observou-se 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.

Foi observado que a associação do EAA ao exercício de carga acarreta uma maior rigidez nos 3 tendões avaliados (Fig.3) (Marqueti et al, 2011).

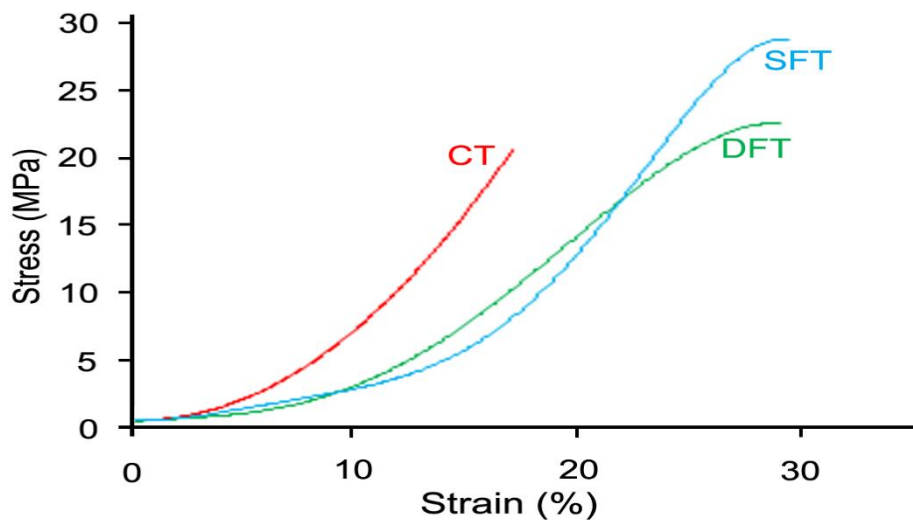


Fig3. Curvas tensão obtidas para TC (A), tendão flexor superficial (TFS) (B) e tendão flexor profundo (TFP) (C) em resposta ao exercício de carga (T), administração de EAA (EAA), e da associação de EAA e exercício de carga (EAAT) (Marqueti et al., 2011).

Desse modo, pode haver uma forte correlação entre os achados morfológicos com os biomecânicos os quais sinalizam, dentre efeitos adversos provocados pelos EAA, uma maior rigidez capaz de predispor lesões e ocasionar futuras rupturas no tendão tanto com relação à administração de EAA ou a combinação de exercício de carga e EAA. 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).

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 (Marqueti et al, 2013). 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.

O treinamento associado à administração de EAA interferiu negativamente nas propriedades morfológicas dos tendões, principalmente com relação à vascularização (Marqueti et al; 2013). 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 mais potencializado que a administração de EAA isolados (Bamman et al., 2001). Sabendo-se que os tendões não acompanham o aumento de força dos músculos, portanto a maior intensidade e frequência de treinamento podem predispor lesões e rupturas (Shahidi, 2001; Battista, Combs, Warne, 2003; Maravelias et al, 2005).

O efeito dos EAA sobre a Vv% de vasos sanguíneos, ainda não está clara, mas um estudo realizado por Paschoal et al., 2009 em músculo sóleo de ratos, mostrou que o treinamento de salto com carga aumentou a expressão de fator de crescimento endotelial vascular (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 seu crescimento, com um forte efeito anti-proliferativo, 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).

Marqueti et al., 2008, mostraram ainda que a combinação de exercício de carga com o EAA acarretou o aparecimento de células adiposas na região proximal do TC, que pode determinar uma resposta não funcional ao tendão. 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 TC lesionado de humanos.

#### **1.4 Destreinamento**

Se por um lado a prática de exercícios físicos acarreta benefícios fisiológicos e funcionais, o tempo necessário para que esses benefícios sejam mantidos após a interrupção no treinamento permanece controverso. Essa interrupção, também conhecida como destreinamento, gera a perda parcial ou completa das adaptações anatômicas, fisiológicas e de desempenho induzidas pelo treinamento e variam quantitativa e qualitativamente dependendo do período de pausa (Michelin, 2008).

Estudo concluiu que a atividade física moderada prolongada exerce um efeito protetor sobre a estrutura e morfologia do tendão e induz um aumento dos PGs. Interromper essa atividade tem efeitos opostos e em curto prazo perturba a morfologia intra-tendínea, mostrando que ambos tanto o conteúdo de PG quanto a organização das fibras de colágeno foi significativamente menor nos animais não treinados e destreinados que nos treinados, foi demonstrado ainda que a interrupção do treinamento causa um rearranjo na disposição das fibras de colágeno, redução na atividade de síntese dos tenócitos e apesar disso as MMPs sintetizadas durante a fase de treinamento permanecem ativas auxiliando no remodelamento tecidual. (Frizziero et al., 2011).

Estudos com corredores de longa distância destreinados mostraram diminuição na vascularização muscular após 15 dias de interrupção do exercício, além disso foi demonstrado que um destreino de 12 semanas resultou numa redução de 17% na força e 19% na resistência à fadiga. Além disso, a gordura intramuscular aumentou 14% em comparação ao período anterior ao destreino. Foi demonstrado também que o exercício aumentou o número e a atividade de mitocôndrias em adipócitos, medida por aumento na atividade de marcadores mitocondriais e que 4 semanas de treino em ratos mostrou a reversão total do efeito do treinamento sobre a adiposidade, aumentando a capacidade lipogênica em relação ao grupo treinado, o destreino ainda pode ter estimulado o processo adipogênico e eventos apoptóticos que contribuem para recuperar rapidamente a massa adiposa (Sertie et al., 2013).

Recentemente foi realizada uma revisão sistemática mostrando o efeito do destreino em tendões e observou-se que em curto prazo (2-4 semanas) ocorre uma alteração na síntese de tenócitos, celularidade, vascularização e na atividade metabólica relacionada ao propeptídeo terminal-C, colágeno tipo I e III, fibronectina, agrecanas, tenascina-C, interleucina-1b e metaloproteinase I e III. Esses resultados indicam que os tenócitos não se limitam a um papel passivo mas desempenham uma função importante durante o destreino. Além disso, estudos mostraram alterações na morfologia tendínea e nas enteses envolvendo conteúdo de PGs, organização das fibras de colágeno com aumento de colágeno III e redução do tipo I, redução da resistência a tensão, aumento da rigidez e do risco de ruptura (Frizziero et al; 2016).

Dessa forma, a hipótese desse trabalho é de que o uso de EAA, associado ou não ao treinamento, possa acarretar efeitos adversos imediatos no tendão calcâneo (TC), e que poderão não ser revertidos 6 semanas após a interrupção da administração da droga. Os efeitos negativos causados pelos EAA incluem alterações celulares, estruturais e funcionais. Por outro lado, a

demanda mecânica inerente ao exercício poderá acarretar benefícios celulares e estruturais imediatos, porém poderão não permanecer com o destreino de 6 semanas.

## **2.0 OBJETIVO GERAL**

Analisar os efeitos do destreino e da interrupção do uso de esteroides anabólicos androgênicos sobre as propriedades morfológicas do tendão calcâneo (TC) de ratos.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Avaliar a morfometria da região proximal e distal do TC considerando as seguintes variáveis: densidade de volume (Vv%) de tecido adiposo, vasos sanguíneos, células da camada peritendínea e células do tendão propriamente dito de ratos submetidos ao treinamento de salto vertical na água.

## **3.0 METODOLOGIA**

### **3.1 Animais**

Quarenta ratos (*Wistar norvegicus albinus*, pesando aproximadamente  $200 \pm 17$ g, no início do experimento) foram agrupados em 4 gaiolas de plástico. 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) e os procedimentos utilizados foram submetidos à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (nº 004/2006).

### **3.2 Procedimento experimental**

Os animais foram primeiramente distribuídos de forma aleatória em 4 grupos experimentais (10 animais/grupo), na seguinte ordem: sedentário sem administração de EAA (S), sedentário com administração de EAA (EAA), treinado sem administração de EAA (T), e exercitado com administração de EAA (EAAT). Após as 7 semanas de treinamento, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados aleatoriamente (compondo o grupo imediatamente após – IA). Os animais restantes (5 animais/grupo), iniciaram uma nova fase com interrupção do treinamento e da administração de EAA durante 6 semanas (compondo o grupo 6 semanas após – 6S) (Fig.4).

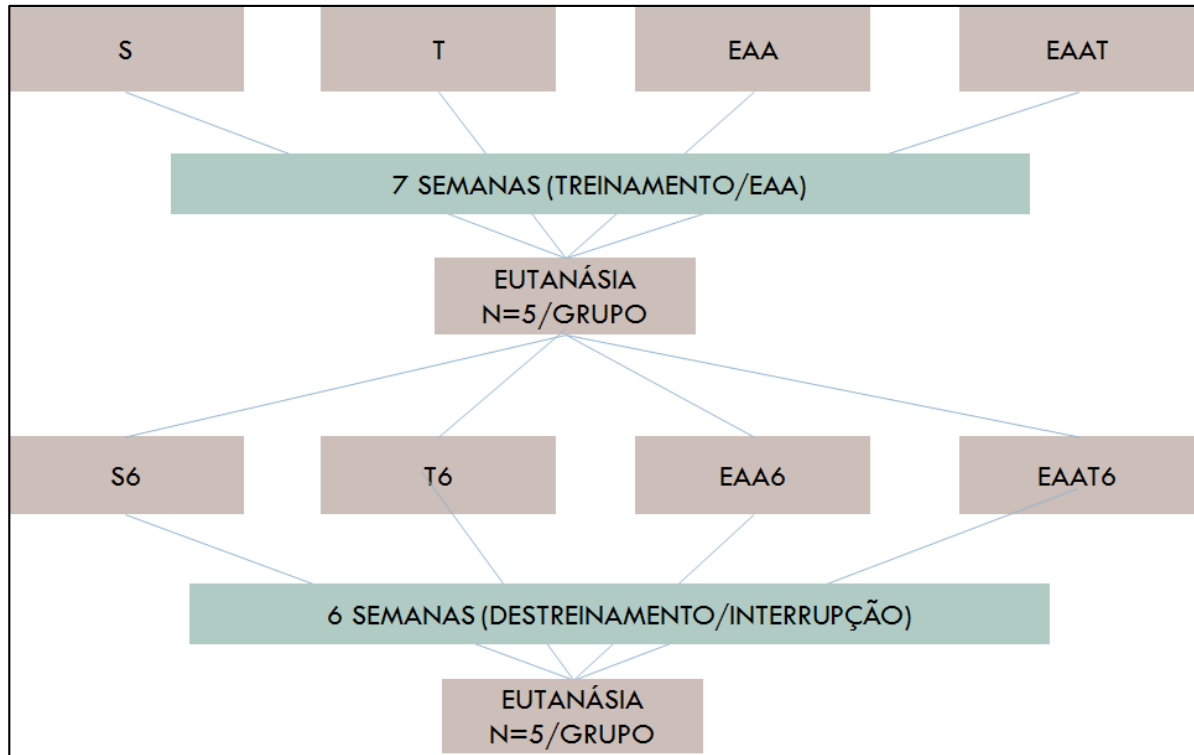


Fig4. Organograma do desenho experimental

Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a um programa de saltos verticais em um tubo de plástico, contendo uma quantidade de água equivalente ao dobro do comprimento do corpo do animal, com temperatura constante de  $30 \pm 2^\circ \text{C}$ . Após uma semana de adaptação, os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento que consistiu em 7 semanas (5-d/semana).

Os animais dos grupos EAA e EAAT receberam Deca-Durabolin (decanoato de nandrolona, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil). Doses de 5 mg/kg de massa corporal (dose supra-fisiológica) 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.

A semana de adaptação consistiu em sessões de levantamento de peso (sobrecarga de 50% do 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 permitiu a execução dos saltos sem que a vestimenta caia do corpo do mesmo. O número de séries (2-4) e repetições (5-10) foi ajustado diariamente e aumentado gradualmente (Cunha et al., 2005; Marqueti et al., 2006).

O protocolo de salto 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, saltos e intervalos de descanso, 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.

Após as sete semanas experimentais os animais do grupo imediatamente após foram eutanasiados. Nesse momento o treinamento e a administração de EAA foi interrompido no grupo 6 semanas, os animais desse último grupo foram eutanasiados após esse período respectivo, para assim avaliar os efeitos do destreinamento e da interrupção do uso de EAA. Os tendões calcâneos foram imediatamente dissecados das patas posteriores e divididos nas regiões proximal e distal. Cada região foi fixada por imersão em paraformaldeído 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). Foram obtidos cortes seriados longitudinais de 2  $\mu$ m e corados com HE (Nuclear, SP, Brasil) para a realização da análise morfológica. Os cortes foram examinados utilizando um microscópio Olympus BX51 equipado com uma câmera digital SV Micro Sound Vision (Preston South, Austrália) e as imagens capturadas em 20x de aumento.

### **3.3 Análise das imagens**

Todas as regiões de cada tendão foram analisadas levando em consideração duas partes: a camada peritendínea e a área interna. Dez imagens não-consecutivas foram adquiridas em cada uma das partes. 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 (Vv%) de células adiposas, vasos sanguíneos, células da camada peritendínea e do tendão propriamente dito, de acordo com o método de Weibel (1969).

A estereologia foi realizada contando as estruturas acima citadas quando estas coincidem 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.

### 3.4 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). Quando todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, portanto, a ANOVA *two way* seguida de análise múltipla de Tukey foi utilizada para comparações entre os grupos. Para as comparações entre os diferentes tempos utilizou-se o teste *t* não pareado. 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) e o software utilizado foi o Statistica® 7.0 (Stat. Soft. Inc. Tusa, Ok, USA).

## 4.0 RESULTADOS

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

### IA- comparação entre os grupos

Efeito do treinamento:

O exercício de carga acarretou um aumento na Vv% de vasos sanguíneos e células da camada peritendínea da região distal do TC (Fig.5F e G, Fig6.F)

Fibroblastos com citoplasma reduzido alinhados linearmente entre os feixes de colágeno dispostos longitudinalmente foram visualizados tendão propriamente dito da região proximal (Fig. 6 G). Na região distal os fibroblastos exibiram uma forma ovalada (Fig. 6H). 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 no tendão propriamente dito na região proximal (Fig. 5D). Por outro lado, causou redução na Vv% de células adiposas na região distal (Fig. 5E). Comparado ao grupo T, ocorreu uma redução na Vv% de vasos sanguíneos e células da camada peritendínea na região distal (Fig.5F e G). Ao redor da camada peritendínea da região distal, foram observadas células redondas e alinhadas sugerindo a presença de células

semelhantes às sinoviais (Fig. 6J) Na região distal do TC o tendão propriamente dito apresentou fibroblastos com forma alongada dispostos linearmente (Fig. 6L).

Efeito da associação EAAT:

Na região distal do TC a administração de EAA associada ao exercício de carga promoveu uma redução na Vv% de células adiposas (Fig. 5E, Fig. 6N) e comparado ao grupo T a mesma região apresentou uma diminuição na Vv% de vasos sanguíneos e de células da camada peritendínea (Fig. 5F e G, Fig. 6N).

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. 5F). Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais relativo à Vv% de células do tendão propriamente dito nas regiões proximal e distal do TC (Fig5. D e H, Fig6. O e P).

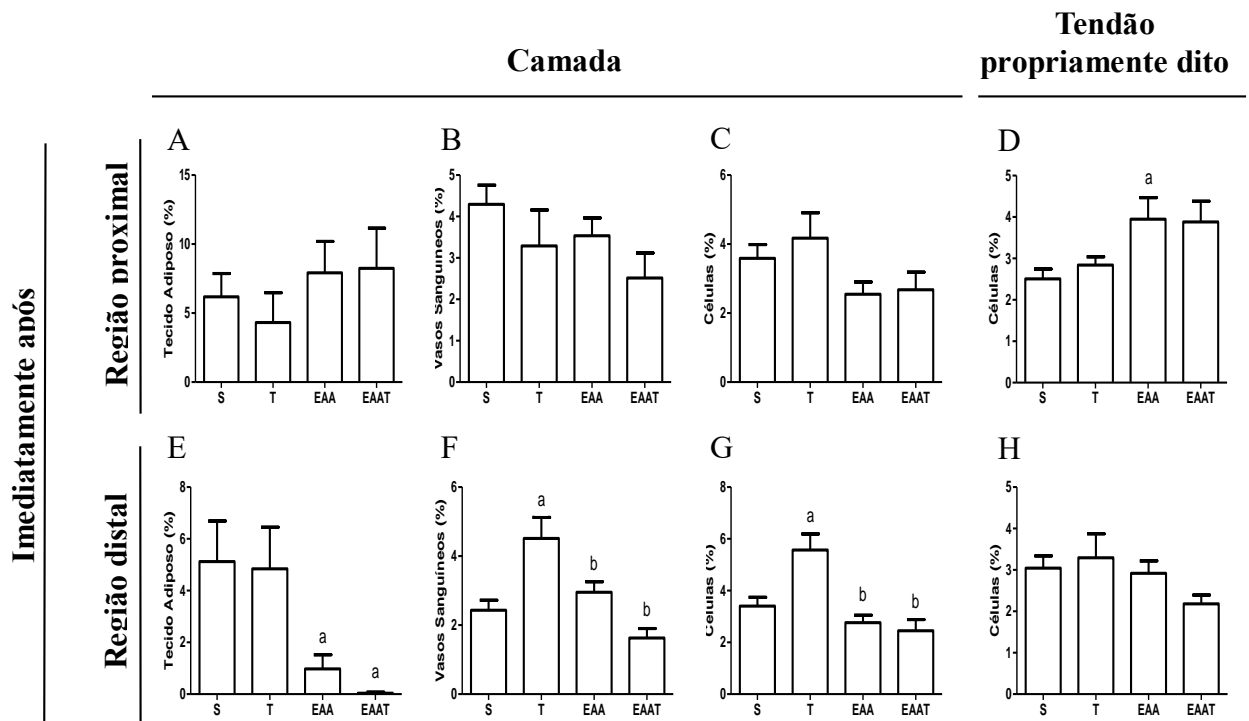


Fig 5. Anova two way- Imediatamente após



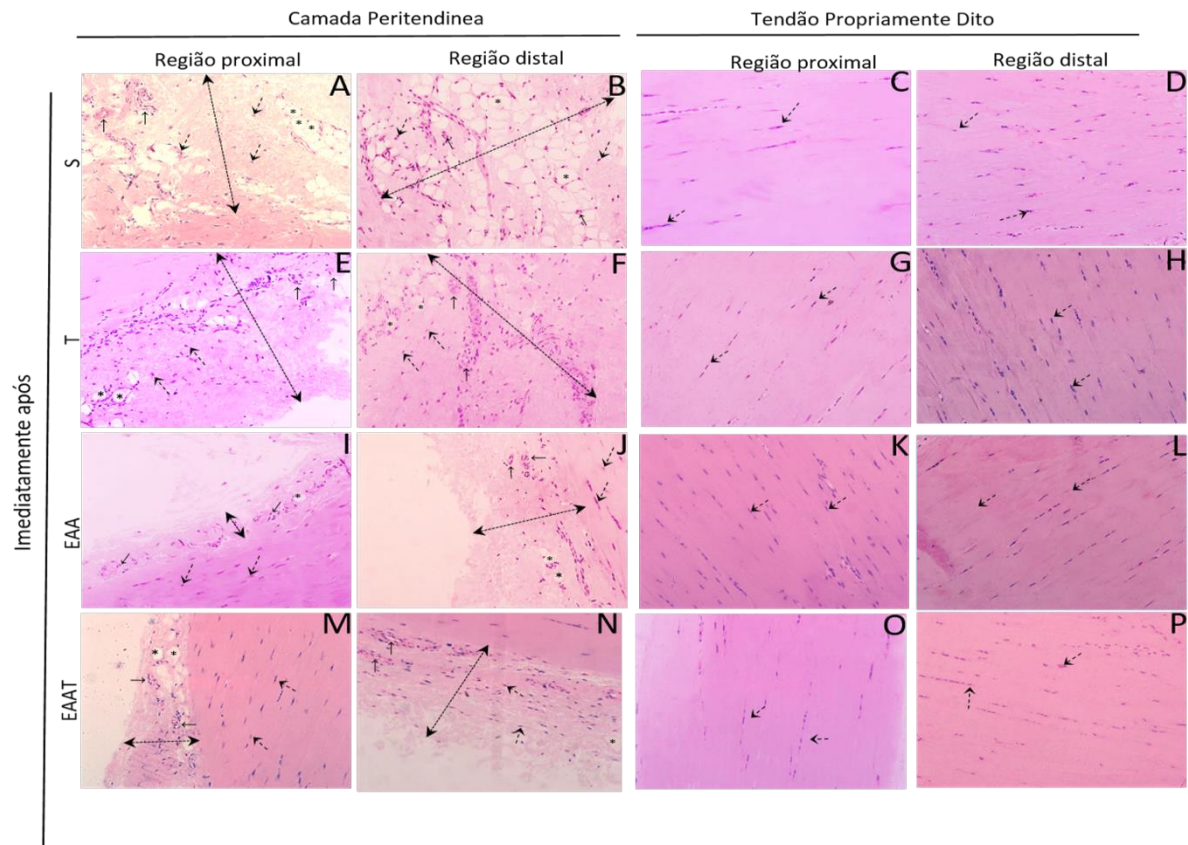


Fig 6. Cortes longitudinais das regiões proximal e distal do tendão calcâneo de rato (TC) corados com hematoxilina-eosina- Grupo imediatamente após. Grupo S, Grupo T, Grupo EAA e Grupo EAAT: Camada peritendínea (seta de ponta dupla), células adiposas (asterisco), vasos sanguíneos (seta contínua), células da camada peritendínea e tendão propriamente dito (seta tracejada).

## 6S- comparação entre os grupos

Efeitos do destreinoamento:

Esse grupo não apresentou alteração de nenhuma das variáveis relativas a Vv% de células adiposas, Vv% de vasos sanguíneos, Vv% de células da camada peritendínea e do tendão propriamente dito, nas regiões avaliadas (Fig7. A, B, C, D, E, F, G e H; Fig8. E, F, G e H).

Efeitos da interrupção uso de EAA:

Nesse grupo foi observado um aumento significativo na Vv% de células adiposas na região distal, tanto em comparação ao grupo S quanto ao grupo T. Foi verificado também, uma redução na Vv% de células da camada peritendínea e de células do tendão propriamente dito (Fig. 7 E, G e D). A interrupção da administração de EAA por 6S parece não ser capaz de reverter o efeito negativo do decanoato de nandrolona sobre o tendão (Fig. 8J e K).

Efeito do destreino associado a interrupção da administração de EAA:

A associação entre o destreino e a interrupção da administração de EAA após 6 semanas mostrou uma redução na Vv% de células adiposas, na região distal, quando comparado ao grupo EAA, indicando o efeito positivo do treinamento permanece mesmo após 6 semanas de destreino (Fig.7E, Fig.8N). Também foi observado uma redução na Vv% de vasos sanguíneos nas regiões proximal do TC comparada ao grupo T (Fig. 7B, Fig. 8M). Em relação à camada peritendínea, ocorreu uma redução na Vv% das células nas duas regiões, sendo que a região proximal também mostrou uma redução quando comparada ao grupo T (Fig.7C e G, Fig. 8 M e N).

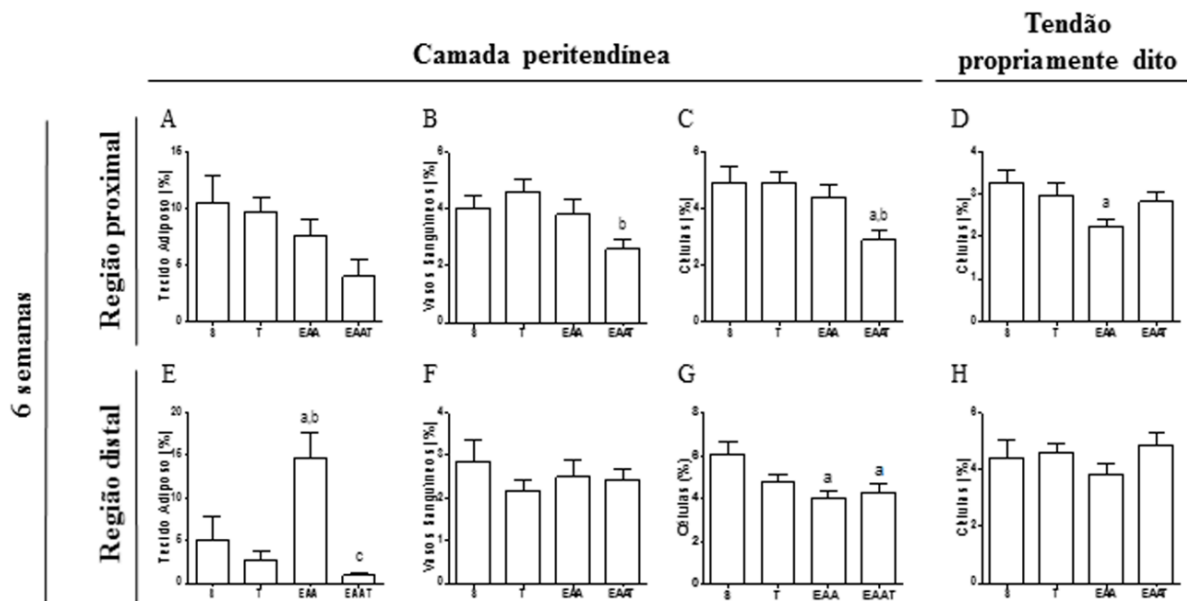


Fig 7. Anova two way- 6 semanas após

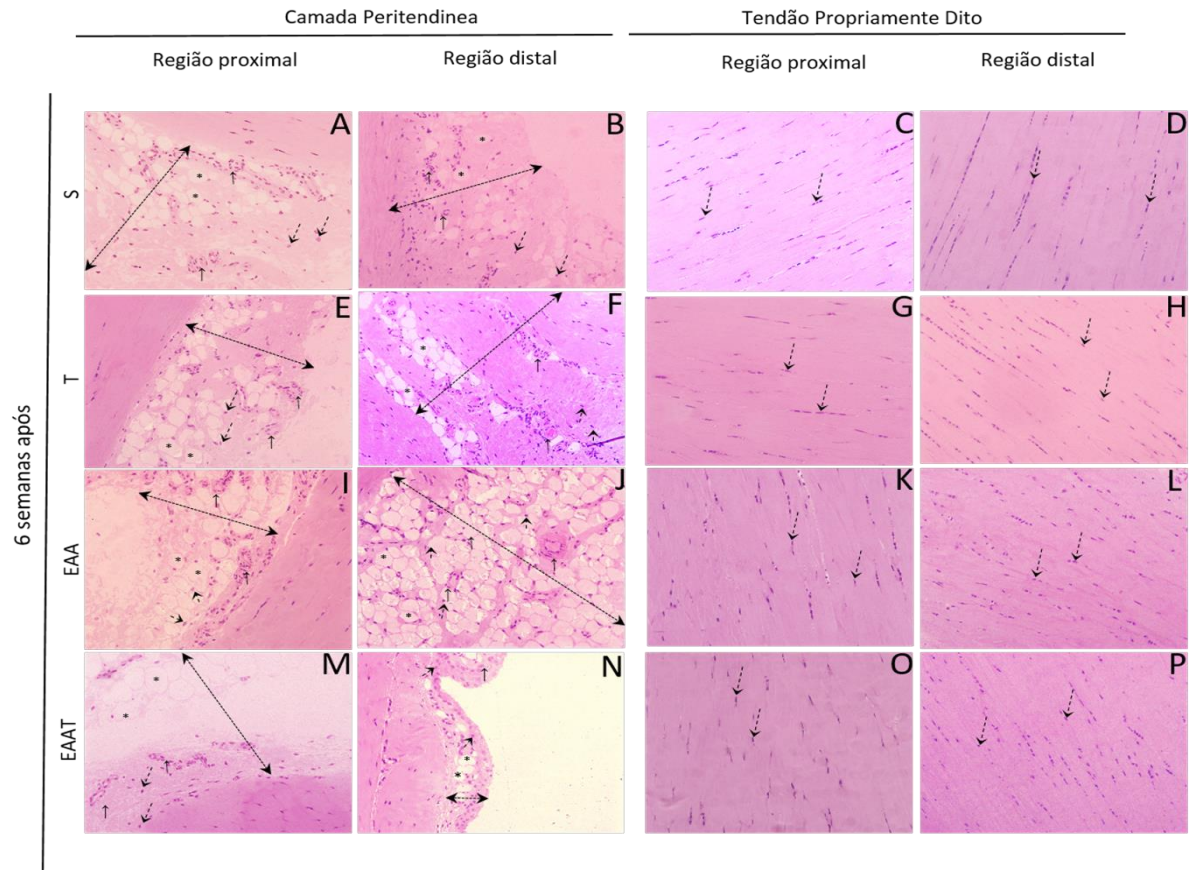


Fig 8. Cortes longitudinais das regiões proximal e distal do tendão calcâneo de rato (TC) corados com hematoxilina-eosina- Grupo imediatamente após. Grupo S, Grupo T, Grupo EAA e Grupo EAAT: Camada peritendínea (seta de ponta dupla), células adiposas (asterisco), vasos sanguíneos (seta contínua), células da camada peritendínea e tendão propriamente dito (seta tracejada).

### Análise Temporal: IA X 6S

#### Grupo S: controle

Nesse grupo foi observado diferença apenas na região distal, que mostrou um aumento na Vv% de células da camada peritendínea após 6 S de destreinamento (Fig.9).

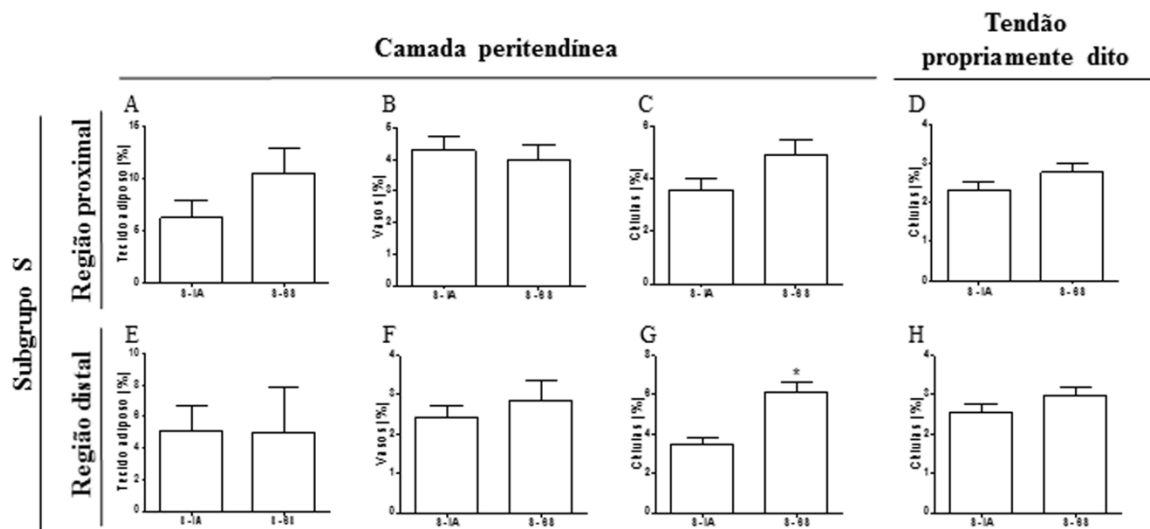


Fig 9. Teste T não pareado- Análise temporal do subgrupo S

#### Grupo T: Treinamento X Destreino

O grupo 6S comparado ao IA apresentou um aumento na Vv% de células adiposas na região proximal e de células do tendão propriamente dito na região distal (Fig.10 A, H e F). Mostrou também uma redução na Vv% de vasos sanguíneos na região distal.

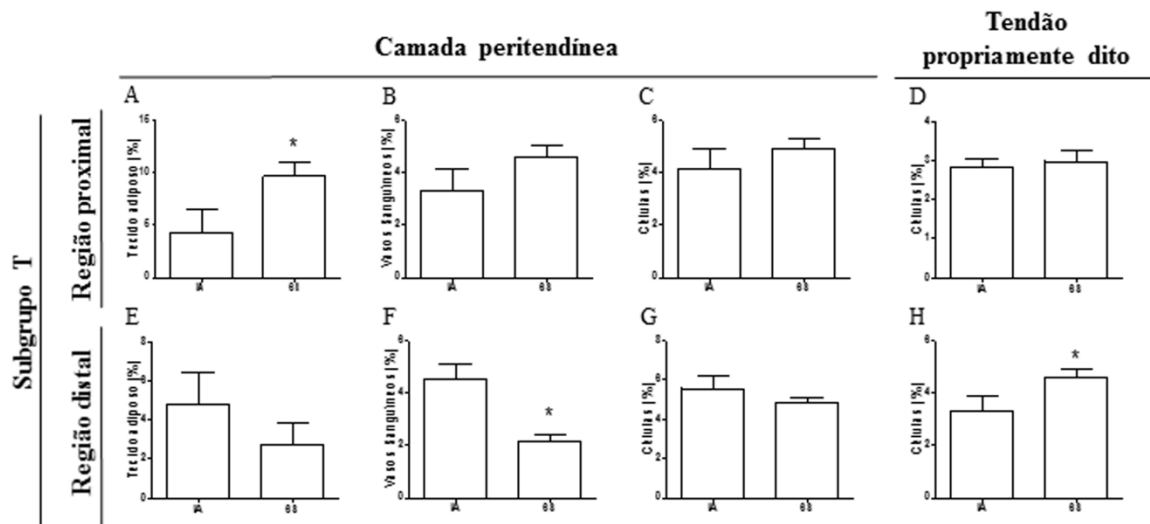


Fig 10. Teste T não pareado- Análise temporal do subgrupo T

#### Grupo EAA: Administração X Interrupção

O grupo 6S comparado ao IA mostrou um aumento na Vv% de células adiposas na região distal, bem como na Vv% de células da camada peritendínea nas duas regiões do TC (Fig.11 E, C e G). Além disso, observou-se uma redução na Vv% de células do tendão

propriamente dito na região proximal (Fig.11D). A Vv% de vasos sanguíneos foi a única variável que não apresentou diferença (Fig.11 B e F).

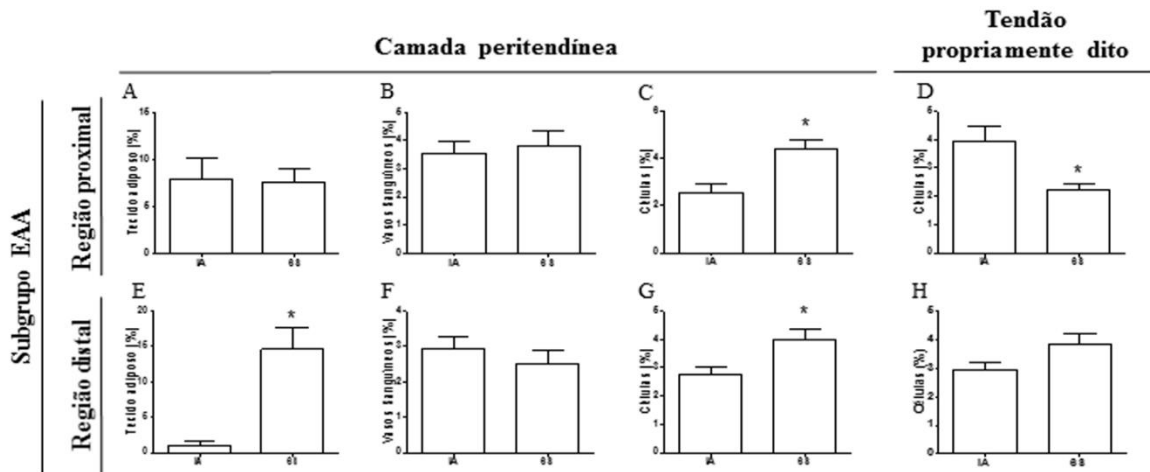


Fig 11. Teste T não pareado- Análise temporal do subgrupo EAA

#### Grupo EAAT: Efeito do EAA + Treinamento X Interrupção + Destreino

O grupo 6S comparado ao IA mostrou um aumento em todas as variáveis na região distal, quais sejam, Vv% de células adiposas, de vasos sanguíneos, de células da camada peritendínea e do tendão propriamente dito (Fig. 12E, F, G H), já a região proximal mostrou uma redução na Vv% de células do tendão propriamente dito, mostrando um efeito contrário ao da região distal do mesmo grupo (Fig.12D)

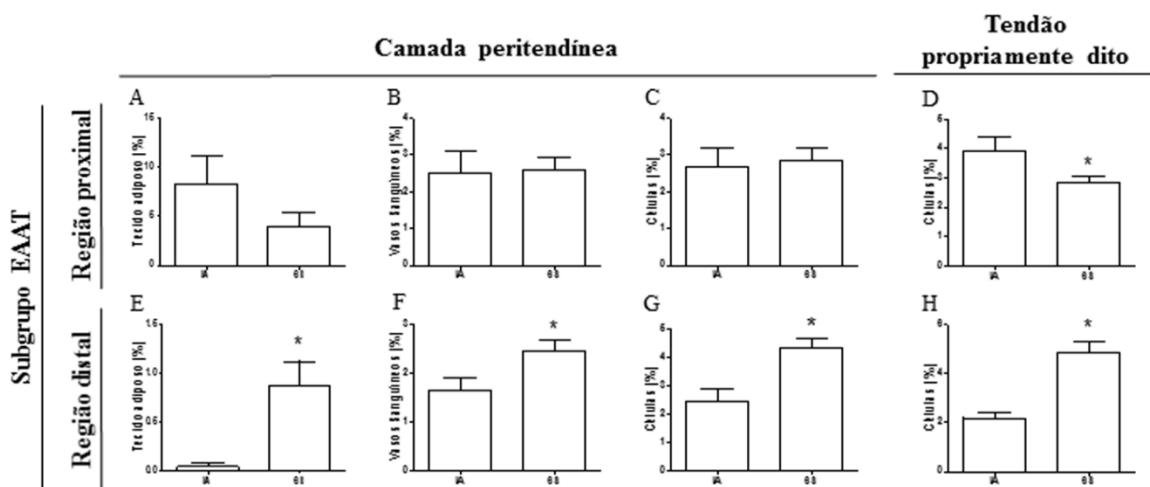


Fig 12. Teste T não pareado- Análise temporal do subgrupo EAAT

## 5.0 DISCUSSÃO

### IA- comparação entre os grupos experimentais

Efeitos do treinamento:

A Vv% de células da camada peritendínea e a vascularização aumentaram nesse grupo como resposta ao treinamento de carga. Esta resposta 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 indicando maior síntese de colágeno no tendão calcâneo de humanos (Langberg et al., 2001; Langberg et al., 2002; Kjaer, 2004).

O treinamento também modifica as propriedades estruturais e mecânicas (Magnusson, et al., 2003), bem como a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno nos tendões (Woo, 1980; Benjamin 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).

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 Vv% de vasos sanguíneos.

Nesse sentido, os tendões, tecidos brancos, diferentes dos músculos, vermelhos, possuem uma vascularização considerada pobre, mas 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. 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).

Efeitos da administração de EAA:

A administração de EAA ocasionou diferentes efeitos negativos no TC. Foi observada uma redução na Vv% de células adiposas e um aumento na celularidade interna do TC. Além disso a referida região ainda mostrou uma redução de células da camada peritendínea e na vascularização, porém, apenas quando comparada ao grupo T.

Marqueti et al., 2013 utilizando o mesmo modelo experimental do presente trabalho assim como tempo de treinamento mostrou um aumento na celularidade peritendínea, efeito diferente do encontrado em nosso estudo que não mostrou diferença, apenas uma redução em tal variável, quando comparada ao grupo T.

Michna (1987) observou que a administração de EAA em ratos causou um acúmulo de colágeno na matriz extracelular e desordens no tecido conjuntivo. 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).

Há uma escassez de trabalhos associando os efeitos dos EAA e as variáveis avaliadas neste estudo, em diferentes regiões do tendão, 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 et al., 2006, mostraram que a administração combinada de deca-durabin e decanoato de nandrolona acarretou um alteração na morfologia (fibrose periférica) e diminuição na atividade de metalopeptidases de matriz tipo 2 (MMP-2), prejudicando assim o remodelamento do tendão calcâneo.

Efeitos da associação EAAT:

O treinamento associado à administração de EAA interferiu negativamente nas propriedades morfológicas dos tendões, principalmente com relação à vascularização e à celularidade da camada peritendínea que sofreram uma redução, quando comparados ao grupo T. 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).

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). Em uma análise biomecânica foi observado que a associação do treinamento ao uso de EAA acarreta uma maior rigidez nos tendões (Marqueti et al, 2013). 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.

Outro efeito observado no presente trabalho foi a redução na Vv% de células adiposas, efeito mantido pelo uso de EAA que não foi influenciado por associação ao treinamento. Marqueti et al., 2013 utilizando o mesmo modelo experimental, mostrou resultados inversos, com um aumento na Vv% de células adiposas na região proximal.

Observou-se portanto que, que o treinamento potencializa os efeitos negativos causados pelo uso de EAA, revertendo os benefícios ocasionados pelo treinamento sobre vasos sanguíneos e células da camada peritendínea, e somado a isso afeta a celularidade da camada interna do tendão, pois esta estava aumentada no grupo EAA porém quando associou ao treinamento a mesma reduziu, voltando à níveis similares aos animais sedentários.

## **6S- comparação entre os grupos experimentais**

Efeitos do destreino:

O destreino de 6 semanas não alterou nenhuma das variáveis relativas a Vv% de células adiposas, Vv% de vasos sanguíneos, Vv% de células da camada peritendínea e do tendão propriamente dito, nas regiões avaliadas, mostrando assim que esse período é capaz de reverter os benefícios causados pelo treinamento, sendo observado o retorno de todas as variáveis aos níveis basais, quando comparado aos animais do grupo S.

O tempo necessário para que os benefícios adquiridos com a prática de exercício sejam mantidos após a interrupção no treinamento permanece controverso. Essa interrupção, gera a perda parcial ou completa das adaptações anatômicas, fisiológicas e de desempenho induzidas



pelo treinamento e variam quantitativa e qualitativamente dependendo do período de pausa (Michelin, 2008). Estudo concluiu que a atividade física moderada prolongada exerce um efeito protetor sobre a estrutura e morfologia do tendão e induz um aumento dos PGs. O destreinamento causa efeitos opostos e em curto prazo altera a morfologia intra-tendínea, mostrando que ambos tanto o conteúdo de PG quanto a organização das fibras de colágeno foi significativamente menor nos animais não treinados e destreinados que nos treinados, foi demonstrado ainda que a interrupção do treinamento causa um rearranjo na disposição das fibras de colágeno, redução na atividade de síntese dos tenócitos e apesar disso as MMPs sintetizadas durante a fase de treinamento permanecem ativas auxiliando no remodelamento tecidual. (Frizziero et al., 2011).

Efeitos da interrupção da administração de EAA:

Nesse grupo foi observado um aumento na Vv% de células adiposas, além de, uma redução na celularidade da camada peritendínea e do tendão propriamente dito. Os EAAs exercem efeitos anabólicos sobre tecidos, o que gera o aumento da celularidade, fato mostrado nesse estudo, além disso, causa a inibição da adipogênese o que explica a redução na Vv% de células adiposas observados nesse trabalho. Porém, com a interrupção da administração de EAA (grupo 6S) elimina-se o estímulo anabólico, e portanto, ocorrem efeitos contrários aos observados durante o uso, o que explica a redução na celularidade observada nesse grupo. Além disso, em relação a algumas variáveis a interrupção da administração de EAA ainda exerce um efeito negativo exacerbado. Sugere-se a ocorrência de um efeito negativo (rebote), observado com interrupção da administração de EAA sobre a variável Vv% de células adiposas, pois o uso de EAA causa inibição da adipogênese e ao retirar o estímulo ocorre um aumento descontrolado de tecido adiposo. Conclui-se portanto, curiosamente, que a interrupção da administração de EAA interfere negativamente, sendo que tanto não reverte os malefícios causados pelos EAAs, como os potencializa. Jozsa e colaboradores (1997) descrevem uma relação de tendinopatia com o aparecimento de lipídios e infiltrado de linfócitos em tendão calcâneo lesionado de humanos. Dessa forma, esses achados determinam uma resposta não funcional ao tendão, por possível redução do remodelamento tendíneo, redução na concentração de MMP-2, aumento da rigidez e conseqüentemente maior tendência de lesões.

Efeitos da associação do destreinamento e interrupção da administração de EAA:

A combinação destreinamento e interrupção da administração de EAA mostrou uma redução na Vv% de células adiposas, quando comparado a interrupção de EAA somente, e

também acarretou uma redução na vascularização e na celularidade da camada peritendínea, sugerindo que os efeitos negativos remanescentes dos EAAs permanecem mesmo após 6S de destreino e interrupção da administração.

### **Análise Temporal: IA X 6S**

#### **Grupo S: Controle**

Nesse grupo foi observado diferença apenas na região distal, demonstrando aumento na Vv% de células da camada peritendínea após 6S de destreino, não se sabe o que acarretou essa resposta com o passar de 6S, talvez um número maior de amostras poderia minimizar esse efeito.

#### **Grupo T: Treinamento X Destreino**

O destreino de 6S resultou em aumento na Vv% de tecido adiposo e de células do tendão propriamente dito. Um resultado curioso é que o treinamento não alterou a Vv% de células do tendão propriamente dito, porém o destreino promoveu aumento nessa variável, resultado possivelmente oposto ao encontrado no estudo de Frizziero et al., 2016, aonde mostrou que o destreino altera a curto prazo (4semanas) a síntese e a atividade metabólica dos tenócitos. Os resultados também mostraram uma redução na Vv% de vasos sanguíneos, demonstrando que esse intervalo temporal é suficiente para reverter os benefícios causados pelo treinamento de 7 semanas sobre a vascularização. Isso pode ter ocorrido em resposta à falta de demanda tecidual ocasionada pela interrupção do treinamento, uma resposta fisiologicamente esperada.

Estudos com corredores de longa distância destreinados mostraram diminuição na vascularização muscular após 15 dias de interrupção do exercício. Foi demonstrado também que o exercício aumentou o número e a atividade de mitocôndrias em adipócitos, medida por aumento na atividade de marcadores mitocondriais e que 4 semanas de destreino em ratos mostrou a reversão total do efeito do treinamento sobre a adiposidade, aumentando a capacidade lipogênica em relação ao grupo treinado, o destreino ainda pode ter estimulado o processo adipogênico e eventos apoptóticos que contribuem para recuperar rapidamente a massa adiposa (Sertie et al., 2013).

Recentemente foi realizada uma revisão sistemática mostrando o efeito do destreino em tendões e observou-se que em curto prazo (4 semanas) ocorre alteração na síntese de tenócitos, na celularidade, na vascularização e na atividade metabólica relacionada ao propeptídeo terminal-C, colágeno tipo I e III, fibronectina, agreganas, tenascina-C,

interleucina-1b e metaloproteinase I e III. Esses resultados também indicam que os tenócitos não se limitam a um papel passivo mas desempenham uma função importante durante o treinamento. Além disso, estudos mostraram alterações na morfologia tendínea e nas enteses envolvendo conteúdo de PGs, organização das fibras de colágeno com aumento de colágeno III e redução do tipo I, redução da resistência a tensão, aumento da rigidez e do risco de ruptura (Frizziero et al; 2016).

#### Grupo EAA: Administração X Interrupção

A interrupção da administração de EAA causou um aumento na Vv% de células adiposas, bem como redução na Vv% de células do tendão propriamente dito. A interrupção do estímulo anabólico parece ocasionar efeitos contrários aos observados durante o uso. Os EAA causam redução de adipócitos. Estudo desenvolvido por Singh et al., 2003, mostrou que os EAA (testosterona e diidrotestosterona) regulam a composição corporal através da estimulação das células mesenquimais pluripotentes em sua linhagem miogênica e inibição de sua diferenciação em linhagem adipogênica, o que conseqüentemente resulta em aumento de massa muscular e redução na Vv% de células adiposas. A interrupção da administração de EAA, por outro lado, ocasionou a restauração da adipogênese que estava suprimida, bem como a redução na celularidade interna do TC. Além disso, observou-se um aumento na Vv% de células da camada peritendínea. Os tendões são constituídos por alguns tipos celulares como: fibroblastos (tenoblastos e tenócitos), células endoteliais, células sinoviais e mastócitos (Kannus, 2000; Kjaer, 2004; Wang, 2006). Nesse estudo, em relação à camada peritendínea, não foi feita seleção quanto ao tipo de célula que seria considerada. A camada peritendínea por ter um melhor aporte vascular apresenta também maior conteúdo de células e é metabolicamente mais ativa (Magnusson et al., 2003). A camada peritendínea expressa muitas alterações que ocorrem no interior do tendão (Langberg et al., 2002). O aumento da celularidade e da espessura da camada peritendínea foi observado após 1 dia de salto vertical e 4 dias de esteira corrida foi observada no TC de ratos (Malheiro et al., 2009). A região peritendínea é capaz de aumentar a atividade metabólica em resposta à atividade física (Magnusson et al., 2003), talvez a interrupção da administração de EAA possa despertar o aparecimento de células cujas vias poderiam estar inibidas. Sugere-se que alguns efeitos negativos dos EAA ainda permanecem mesmo após 6S de interrupção da administração.

Os estudos biomecânicos realizados por Miles et al. e Inhofe et al. concluíram que 12 semanas de tratamento com EAA causaram um aumento na rigidez tendínea e uma falha ao menor alongamento e que essas alterações foram reversíveis após a descontinuação do

tratamento (Tsitsilonis et al., 2014). Outro estudo demonstrou que a massa muscular reduz dentro de poucas semanas após a cessação de terapêutica com androgênios (Bonetti et al., 2008). Estudo realizado com diferentes doses de nandrolona (3,75 e 7,5 mg / kg) mostrou que 30 dias após a última dose, o efeito anabólico promovido pela nandrolona sobre a massa muscular foi reduzido (Berlardin et al., 2014).

#### Grupo EAAT: Efeito do EAA e Treinamento X Interrupção e Destreinamento

O grupo 6S comparado ao IA mostrou um aumento em todas as variáveis na região distal, como Vv% de células adiposas, de vasos sanguíneos, de células da camada peritendínea e do tendão propriamente dito. Além disso, a região proximal apresentou uma redução na Vv% de células do tendão propriamente dito, mostrando um efeito contrário ao da região distal do mesmo grupo. As diferentes regiões do TC respondem de forma diferente ao mesmo estímulo (Marqueti et al., 2013). Parece que o treinamento exerce um efeito tardio no tendão, similar à “memorização de um evento” interpretado por sinalização celular mesmo após 6S. Assim, tanto a vascularização quanto o conteúdo de células, que são elementos teciduais dependentes, respondem aos mecanismos de carga, que parecem estar suprimidos durante a administração de EAA associado ao exercício, porém após a interrupção de ambos esses elementos conseguem ser restaurados.

## 6.0 CONCLUSÃO

Um dos aspectos-chaves do nosso trabalho foi demonstrar os inúmeros benefícios promovidos pelo treinamento vertical na água, por outro lado demonstrar os efeitos negativos da administração de EAA sobre a morfologia do TC. Contudo, o efeito mais adverso encontrado foi o da associação de EAA com o treinamento, por potencializar os efeitos negativos dos EAA.

Outro aspecto importante é que o treinamento quando interrompido reverte até níveis basais as variáveis analisadas, em especial células e vasos. Por outro lado, quando se refere ao destreinamento associado também à interrupção de EAA, nesse aspecto o treinamento pareceu exercer um efeito protetor mesmo após 6 semanas. Nossos resultados indicam que os tendões são tecidos mecanoresponsivos e parecem possuir algum mecanismo (sensor/memória), porém suprimido pelo uso de EAA, capaz de interpretar os sinais mecânicos do treinamento e despertar respostas celulares importantes após a interrupção da administração de EAA.

Algumas limitações nesse trabalho foram identificadas, como a avaliação de um número pequeno de animais e a realização apenas da análise histológica. Outros estudos são necessários como a expressão gênica, e análises funcionais (biomecânica) para ampliar nosso entendimento

sobre a função tendínea tanto com relação ao destreinamento como a interrupção da administração de EAA.

## **7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apresentação das atividades desenvolvidas e dificuldades encontradas durante a execução do estudo:

Para o desenvolvimento do presente estudo, envolvendo a análise morfológica do TC foi realizado diversos testes e protocolos, que incluíram desde os cortes das amostras até a análise propriamente dita, durante os meses de agosto/2014 a abril/2016. Vários foram os laboratórios envolvidos: Laboratórios de Histologia da Universidade Católica de Brasília (UCB), Laboratório de Histopatologia Bucal da Universidade de Brasília (UnB), Laboratório de Biologia Molecular da UnB-IB, Laboratório de Genética da UnB-IB e Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (Ufscar).

Todo esse período de ensaio foi necessário devido à carência de referencial que descrevessem protocolos específicos para coloração usando a historesina como substância de emblocamento das amostras. Os tendões desse estudo foram emblocados em historesina, uma substância que de forma vantajosa permite efetuar cortes muito finos (2 $\mu$ m) do tecido facilitando a visualização das estruturas que compõe a amostra sem sobreposições. A maior dificuldade e limitação desse trabalho foi em padronizar uma metodologia para coloração das amostras de tendão em historesina. Para um melhor entendimento desta proposta de pesquisa, serão contextualizadas, a seguir, em forma de síntese, as atividades envolvidas neste processo.

### **7.1 Detalhamento dos Métodos**

Durante os primeiros meses de experiência, o foco inicial foi estabelecer uma metodologia para a realização dos cortes das amostras, visto que foram emblocadas em historesina e seria necessário que fossem obtidos cortes com 2 $\mu$ m de espessura para a realização das análises. Foi então realizado um piloto, de forma inicial, que seguiu da seguinte forma.

Inicialmente foi utilizado o Micrótomo Leica RM2155 com utilização de navalhas descartáveis, aonde não foi obtido êxito devido ao fato desse aparelho não apresentar um suporte aos toquinhos de madeira nos quais as amostras estavam coladas. Seguiu-se tentando outro aparelho, um pouco mais arcaico mas tinha o suporte para os toquinhos e assim as amostras poderiam ser cortadas, porém teria que ser utilizado uma navalha de aço. Obtemos vários cortes no piloto, porém após a visualização das imagens observou-se muitos problemas

como a qualidade do corte. Após seguiu-se na tentativa de padronização dos cortes nos laboratórios de genética e de biologia molecular da UnB-Instituto de Biologia (IB), nos quais encontramos o ultramicrotomo onde poderiam ser realizados cortes utilizando-se navalhas de vidro na expectativa de êxito nos cortes. Porém o aparelho não possuía suporte para os toquinhos e mesmo com ajustes no material e adaptações os cortes apresentaram falhas, imperfeições e dobras impossibilitando sua utilização.

Por fim, já em 2015, contactamos o Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), onde finalmente obtivemos cortes com êxito utilizando o microtomo da Leica anteriormente citado com adaptação para navalhas de vidro e para os toquinhos de madeira que seguravam as amostras.

Após a padronização dos cortes iniciou-se a etapa de testes das colorações. Inicialmente pensou-se em realizar a imunohistoquímica e histologia com a utilização das seguintes colorações: Hematoxilina-eosina (HE) para a analisar a morfologia básica, Safranina para a análise do conteúdo de PGs e Alizarina para a verificação da incidência de cálcio. Porém a primeira técnica já foi logo descartada devido ao fato da resina não permitir a ligação da amostra com o anticorpo e pela falta de um protocolo adequado para retirar a historesina das amostras. Tentou-se o contato com a própria Leica (empresa que vende a historesina) mas infelizmente não obtivemos sucesso em adquirir um protocolo de retirada da mesma.

Iniciou-se a parte histológica com a HE, com a qual foram realizados vários testes sem êxito, pois os protocolos envolviam a desidratação e nessa etapa descorava todo o material. Portanto, conseguiu-se contato com a laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Unicamp no qual obtivemos um protocolo para corar amostras emblocadas com historesina e o tipo de Hematoxilina utilizada, pois isso diferencia o processo de coloração. A partir disso, foi padronizada a coloração.

Seguiu-se com a padronização da alizarina, a qual não foi possível por essa coloração não corar os cortes com historesina, posteriormente tentou-se Von Kossa o qual também não deu certo. Realizou-se a última tentativa de padronização, para a safranina, porém ocorreu o mesmo problema anteriormente citado sem sucesso na padronização. Finalmente, seguiu-se apenas com a HE visto que, ainda foi a única que conseguimos corar, obter as imagens e realizar as análises.

## REFERÊNCIAS

- Abrahin OSC, Souza NSF, Sousa EC, et al. Prevalência do Uso e Conhecimento de Esteroides Anabolizantes Androgênicos por Estudantes e Professores de Educação Física que Atuam em Academias de Ginástica. *Rev Bras Med Esporte*, v. 19, n. 1, jan/fev, 2013.
- Birch HL, Worboys S, Eissa S, et al. Matrix metabolism rate differs in functionally distinct tendons. *Matrix Biol* 27: 182 – 189, 2008.
- Benjamim M, Kaiser E, Milz S. Structure-function relationships in tendons: a review. *J. Anat.* 212: 211–228, 2008.
- Belardin LB, Simão VA, Leite GA, et al. Reversibility of the aas effects on reproduction. *Birth defects research (part b)* 101:168–177, 2014.
- Benjamin M, Ralphs JR. Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol* 233: 1-45, 2004.
- Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, et al. 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.
- Bonetti A, Tirelli F, Catapano A., et al. Side effects of anabolic androgenic steroids abuse. *Int J Sports Med* 29:679–687, 2008.
- Chiquet M, Gelman L, Lutz R, et al. 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.
- Cunha TS, Tanno AP, Moura MJCS, et al. Influence of high-intensity training and anabolic steroids treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sciences*, 77: 1030 – 1043, 2005.
- Delgado DI. Estudio diagnóstico com ex-atletas de alto nível: su relación com factores de riesgos coronários. *Disertación (graduación) Instituto de Cultura Física de la Habana*. Habana, 2000.
- Frizziero A, Fini M, Salamanna F, et al. Effect of training and sudden detraining on the patellar tendon and its enthesis in rats. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 12:20, 2011.
- Frizziero A, Salamanna F, Bella ED. *The Role of Detraining in Tendon Mechanobiology. Detraining in Tendon Mechanobiology*, v.8, n.43, 2016.
- Graceli JB, Gava PL, Gomes HL, et al. Uso crônico de Decanoato de nandrolona como fator de risco para hipertensão arterial pulmonar em ratos Wistar. *Rev Bras Med Esp*, v.16, n. 1, jan/fev, 2010.

- Inhofe PD, Grana WA, Egle D, et al. The effects of anabolic steroids on rat tendon. An ultrastructural, biomechanical, and biochemical analysis. *Am J Sport Med* 23: 227-232, 1995.
- Józsa L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports* 1997; 7: 113–118.
- Junior SHAS. Morbidade hospitalar por ingestão de esteróides anabólico-androgênicos (eaa) no Brasil. *Rev Bras Med Esp*, v. 19, n. 2, mar/abr, 2013.
- Kannus, P, Structure of the tendon connective tissue. *Scand. J. Med Sci Sports* 10: 312-320, 2000.
- Kjaer M. The secrets of matrix mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports* 19:455-6, 2009.
- Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84: 649-698, 2004.
- Langberg H, Olesen JL, Bülow J, Kjaer M. Intra- and peri-tendinous microdialysis determination of glucose and lactate in pigs. *Acta Physiol Scand*, 174: 377–380, 2002.
- 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.
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, et al. 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, 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, et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med*. 29: 559- 63, 2008b.
- Marqueti RC., et al. Tendon structural adaptations to load exercise are inhibited by anabolic androgenic steroids. *Scand J Med Sci Sports*. 2014 Feb;24(1):e39-51. doi: 10.1111/sms.12135. Epub 2013 Nov 14.
- 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, et al. 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.
- Michna H. Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int. Orthop* 11: 157-162, 1987.



Michelin E, Coelho CF, Burini RC. Efeito de um mês de destreinamento sobre a aptidão física relacionada à saúde em programa de mudança de estilo de vida. *Rev Bras Med Esp*, v.14, n. 3, mai/jun, 2008.

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.

Monteiro JC, Gomes MLM, Tomiosso TC, et al. More resistant tendons obtained from the association of Heteropterys aphrodisiaca and endurance training. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:51, 2011.

National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 1996.

Paschoal M, Marqueti RC, Perez S, et al. Nandrolone inhibits VEGF mRNA in rat muscle. *Int J Sports Med* 30: 775-778, 2009.

Prior BM, Lloyd PG, Yang HT., et al. Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc Sport Sci Rev*, 31: 26–33, 2003.

Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 23: 1355–1390, 2001.

Sertie RAL., et al. Cessation of physical exercise changes metabolism and modifies the adipocyte cellularity of the periepididymal white adipose tissue in rats. *J Appl Physiol* 115: 394–402, 2013.

Seynnes OR, Kamandulis S, Kairaitis R, et al. Effect of androgenic-anabolic steroids and heavy strength training on patellar tendon morphological and mechanical properties. *J Appl Physiol* • doi:10.1152/jappphysiol.01417.2012.

Singh R., et al. Androgens Stimulate Myogenic Differentiation and Inhibit Adipogenesis in C3H 10T1/2 Pluripotent Cells through an Androgen Receptor-Mediated Pathway. *Endocrinology*, 144(11):5081–5088, Nov 2003.

Tsitsilonis S, Panayiotis CE, Athanasios MS, et al. Anabolic androgenic steroids reverse the beneficial effect of exercise on tendon biomechanics: An experimental study. *Foot and Ankle Surgery* 20: 94–99, 2014.

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, et al. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons - long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect Tissue Res* 7: 177-183, 1980.

