



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

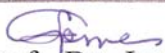
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ADRIANO BIANCALANA

“ANÁLISE MORFOLÓGICA, BIOMECÂNICA E BIOQUÍMICA DE
TENDÃO DE RATOS ZUCKER (fa/fa) OBESOS”

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

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


Orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes

Co-Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Campinas, 2009

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

B470a Biancalana, Adriano
 Análise morfológica, biomecânica e bioquímica de
 tendão de ratos Zucker (fa/fa) obesos / Adriano Biancalana.
 – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Laurecir Gomes, Lício Augusto Velloso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ratos Zucker. 2. Obesidade. 3. Tendões. 4.
Morfologia. 5. Biomecânica. I. Gomes, Laurecir, 1954-.
II. Velloso, Lício Augusto. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Morphological, biomechanical and biochemical analysis of tendon of obese Zucker (fa/fa) rats.

Palavras-chave em inglês: Rats, Zucker; Obesity; Tendons; Morphology; Biomechanics.

Área de concentração: Biologia Celular.

Títuloção: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Laurecir Gomes, Hernandes Faustino de Carvalho, Marcelo Augusto Marretto Esquisatto, Cibele Marli Cação Paiva Gouvea, Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.

Data da defesa: 27/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 27 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laurecir Gomes (Orientadora)



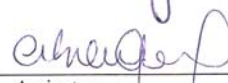
Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



Assinatura

Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvea



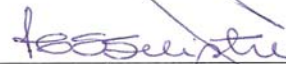
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto



Assinatura

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo



Assinatura

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Assinatura

Profa. Dra. Antonella Sachsida Braga Vilela

Assinatura

Agradecimentos

Aos meus pais Claudio e Lourdes, e meu irmão Marcelo pelo apoio, confiança, amor e incentivo constantes em minha vida.

A minha esposa Fernanda por todo apoio, amor e paciência ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Em especial à minha orientadora, profa. Laurecir Gomes, meus mais profundos agradecimentos pela oportunidade, confiança, amizade e dedicação. Durante todo esse tempo desde a graduação até hoje.

Ao Professor Edson Rosa Pimentel pela amizade, paciência, sugestões, que contribuíram muito em minha formação.

A Liliam S. Panagio pela amizade, pela paciência, e principalmente pela ajuda nos momentos de sufoco. Competente em todos os momentos.

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

A Andrea, Tatiana, Wilson, Frances pela amizade, divertida companhia e ajuda durante a realização dos experimentos no laboratório.

Aos amigos do Instituto de Biologia, Danilo, Taíze, Karina, Silvia, Manuel, Gustavo e todos os outros que fizeram parte de minha vida no IB, pela agradável e divertida convivência.

A todos os professores do Instituto de Biologia que de alguma forma colaboraram em minha formação, durante a graduação e a pós graduação. Em especial aos professores Vidal, Hernandez, Heidi, Shirlei, Ângelo, pela paciência e ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Lício Augusto Velloso e Dr. Eliane B. Ribeiro pelo fornecimento dos animais utilizados nesse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP por possibilitar a realização desta dissertação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho (Processo 04/14358-5).

Dedico esta dissertação

A, Deus e minha esposa, que dão sentido à minha vida.

Índice

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Justificativa e Objetivo	18
Referências	19
Artigo I	26
Artigo II	53
Conclusões	75

Resumo

A obesidade é considerada hoje uma epidemia mundial. A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública em muitas partes do planeta, onde cresce em taxas alarmantes. No Brasil, a diminuição das taxas de desnutrição vieram acompanhadas pelo aumento das taxas de sobrepeso e obesidade. A obesidade pode ser definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que pode prejudicar a saúde. A obesidade aumenta significativamente o risco do desenvolvimento de problemas de saúde como a hipertensão arterial, derrame, problemas respiratórios, diabetes Melitus (Tipo II), incidência de certas formas de câncer, doenças do coração, alterações músculo esqueléticas e osteoartrites das grandes e pequenas articulações. Sendo que a adiposidade está relacionada aos níveis individuais de gordura para cada indivíduo. A função dos tendões é transmitir a força criada nos músculos aos ossos, possibilitando o movimento articular. Os tendões são constituídos por células (tenócitos e tenoblastos) e por uma matriz extracelular desenvolvida, constituída por macromoléculas que interagem entre si e com a célula que a produz. A matriz extracelular dos tendões é constituída por colágeno, proteoglicanos e proteínas não colagênicas. Este trabalho objetivou analisar as alterações morfológicas, bioquímicas e biomecânicas do tendão do músculo flexor digital profundo em ratos Zucker geneticamente obesos (fa/fa) e dos animais magros (Fa/_). Os ratos Zucker possuem receptores para leptina não funcionais, e devido a isso desenvolvem obesidade. A avaliação histológica não revelou diferenças, assim como os testes imunohistoquímicos para colágeno do tipo III, nos tendões de ambos os grupos. Na análise ultraestutural do tendão de ambos os animais foram observadas gotículas de lipídio ao longo dos feixes de fibrilas de colágeno. Somente os animais obesos apresentaram fibrilas de colágeno desorganizadas, diferente da distribuição típica esperada para o tecido. O diâmetro das fibrilas de colágeno apresentou distribuição e diâmetro de massa-médio diferente entre os dois grupos. Com relação aos parâmetros mecânicos houve diferença significativa com relação ao deslocamento e a deformação máxima. Os animais obesos apresentaram conteúdo maior de hidroxiprolina enquanto os animais magros apresentaram maior quantidade de proteínas não colagênica e de glicosaminoglicanos. Devido ao elevado sobrepeso e as características do tendão dos animais obesos pode ser concluído que a influência da obesidade sobre os tendões provoca alterações na constituição e organização dos componentes da matriz extracelular. Alterações estas que podem ser relacionadas a modificações organizacionais e

estruturais dos feixes de colágeno, influenciando as propriedades mecânicas do tendão e a evolução para um estado patológico.

Abstract

Obesity is considered a worldwide epidemic, one of the biggest public health problems in many parts of the planet, which grows in alarming rates. In Brazil, the decline in rates of malnutrition has been accompanied by rising rates of overweight and obesity, which can be defined as the accumulation of abnormal or excessive fat which presents a risk to health. Obesity significantly increases the risk of developing health problems as hypertension, stroke, respiratory problems, diabetes, cancer, cardiovascular diseases, skeletal muscle alteration and osteoarthritis. The tendons transmit the strength created in muscles to bones, allowing the joints movement. Tendons consist of cells (tenocyte and tenoblast) and an abundant extracellular matrix composed by collagen, proteoglycans and non-collagenous proteins. This study aimed to analyze the morphological, biochemical and biomechanical alterations of the deep digital flexor tendon in Zucker rats genetically obese (fa/fa) and of lean animals (Fa/_). Histological evaluation and immunohistochemical tests for collagen type III, showed no differences in tendons of both groups. Ultrastructural analysis, showed presence of lipid droplets on the bundles collagen. Only the obese animals showed disorganization in the distribution of fibrils. The diameter of collagen fibrils presented different distribution and mass-average diameter between the two groups, being bimodal in lean rats and unimodal in obese rats. With regard to mechanical parameters significant difference was observed, larger maximum displacement and strain in obese animals. The obese animals presented higher content of hydroxyproline while lean animals showed a larger amount of non-collagenous proteins and glycosaminoglycans. Due to the high overweight of the obese animals can be concluded that the obesity causes changes in the composition and organization of extracellular matrix of the tendon. These alterations may be related to organizational and structural changes of collagen bundles, influencing the mechanical properties of tendon and developments toward a pathological condition.

Introdução

A obesidade é considerada hoje uma epidemia mundial (James, *et al.*, 2001; WHO, 2003b, Ogden *et al.*, 2006; WHO, 2007). O seu custo para os cofres públicos está entre 1% e 7% do total dos investimentos em saúde, representando um gasto significativo dos orçamentos nacionais (Visscher & Seidell, 2001).

A obesidade pode ser definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que pode prejudicar a saúde (WHO, 2000), ou ainda como um aumento significativo acima do peso ideal, sendo o peso ideal aquele que maximiza a expectativa de vida (Kuczmarski *et al.*, 1994). Em humanos, tabelas atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a expectativa de vida é reduzida quando o índice de massa corpórea (IMC) indica adiposidade significativamente aumentada, acima dos níveis ideais. O IMC é definido como a massa do indivíduo adulto em quilogramas dividida pela altura em metros ao quadrado. Indivíduos que apresentam $IMC \geq 25$ estão em sobrepeso, já os que apresentam $IMC \geq 30$ são considerados obesos. O sobrepeso indica um fator de risco aumentado para o desenvolvimento de doenças crônicas e um alerta de que o indivíduo pode desenvolver a obesidade. Segundo a OMS mais de 1 bilhão de pessoas no mundo apresentam sobrepeso, e as estimativas para 2015 é que esse número chegue a mais de 2,3 bilhões. Com relação à obesidade, mais de 300 milhões de pessoas no mundo hoje apresentam IMC maior ou igual a 30, e a estimativa para 2015 é que mais de 700 milhões de pessoas estejam obesas (WHO, 2003; 2006).

Além do IMC outras medidas antropométricas podem ser realizadas para determinação da adiposidade, que está relacionada aos níveis individuais de gordura para cada indivíduo, como a circunferência abdominal, a relação cintura/quadril e as dobras cutâneas. A adiposidade pode ser ainda mensurada por análise de imagens, como a tomografia computadorizada e pesagens em baixo da água (Goodpaster, 2002; Shen *et al.*, 2003). Esses últimos por possuir custo elevado são menos utilizados.

No Brasil, a diminuição das taxas de desnutrição vieram acompanhadas pelo aumento das taxas de sobrepeso e obesidade (IBGE, 2003). Os últimos dados disponíveis mostram que 40% da população adulta brasileira apresenta sobrepeso e aproximadamente 11% é obesa. Os dados mostram um crescimento elevado dessas taxas nos últimos 30 anos (IBGE, 2003).

A obesidade pode estar relacionada a diferentes causas, como a interações entre genes, fatores ambientais e psicológicos. Dentre esses fatores, os genéticos têm indubitável importância (Kopelman, 2000). A obesidade pode ser vista como uma doença, na qual o excesso de massa gorda é acumulado podendo afetar a saúde de diferentes formas. A obesidade aumenta significativamente o risco do desenvolvimento de problemas de saúde como a hipertensão arterial, derrame, problemas respiratórios, diabetes Melitus (Tipo II), incidência de certas formas de câncer e doenças do coração (Kopelman, 1994; Sorof & Daniels, 2002). Outras desordens importantes que a sobrecarga de peso pode provocar sobre a estrutura corporal, estão relacionadas a alterações músculo esqueléticas e osteoartrites das grandes e pequenas articulações (Kopelman, 1994; James, 1995; DiNubile, 1997; Lementowski & Zelicof, 2008). No estudo das articulações e do tecido muscular, assim como dos tendões acometidos por injúrias, diversas patologias ou outras desordens tem sido objeto de estudo principalmente em humanos (Józsa & Kannus, 1997). Porém dados que relacionem a obesidade e sua influência na estrutura e funcionamento dos tendões são escassas.

Em nosso trabalho utilizamos os animais da linhagem Zucker (fa/fa) (figura 1) que pertencem a uma linhagem de animais em que a obesidade está ligada a um gene autossômico recessivo que codifica receptores não funcionais para hormônio leptina (Phillips, *at al.*, 1996). Os ratos machos Zucker (Fa/fa ou Fa/Fa) magros e Zucker (fa/fa) geneticamente obesos foram alimentados com ração normal até cinco meses de idade, quando atingiram peso 140% maior que os magros (Tabela 1). Geneticamente obesos, os ratos Zucker (fa/fa) podem expressar muitas características metabólicas em comum com os humanos, como diabetes Melitus (Tipo II) ligada à obesidade, taxas aumentadas de colesterol, triglicérides, insulina e glicose. Nas primeiras três ou quatro semanas de vida não é possível distinguir os ratos obesos dos magros, mas a diferença é visível após a quinta semana de vida (Bray, 1977).

Em geral genes ligados à obesidade codificam moléculas que regulam o peso corporal. Um elemento chave nesse sistema é o hormônio leptina, produzido pelo tecido adiposo, que fornece informações nutricionais para os centros regulatórios no cérebro, como o hipotálamo. A leptina age em receptores no sistema nervoso central inibindo a ingestão de alimento e promovendo o gasto de energia (Rahmouni & Haynes, 2001), em tecidos periféricos promove a distribuição do combustível metabólico a ser utilizado (Muoio *et al.*, 1997). No tecido muscular a leptina muda a fonte da qual o ATP é gerado, trocando o combustível preferencial

a ser utilizado, de carboidrato para lipídio (Reidy & Weber, 2000). Em humanos, os efeitos da leptina no metabolismo dos ácidos graxos na musculatura esquelética são atenuados nos indivíduos obesos em comparação com os magros (Steinberg *et al.*, 2002). Mudanças na concentração de leptina podem também afetar outros sistemas, como o sistema reprodutor, o sistema imune e até a formação óssea (Friedman & Halaas, 1998).

Os tendões são estruturas fundamentais para a execução de atividades consideradas simples, como o ato de caminhar, mas que requerem uma complexa estrutura que possibilita a movimentação e a coordenação do sistema músculo esquelético. A função dos tendões é transmitir a força criada nos músculos aos ossos, e dessa forma possibilitar o movimento articular (Józsa & Kannus, 1997). Os tendões podem ser curtos ou longos e grossos ou finos, geralmente na forma cilíndrica ou de lâmina, essa última também denominada aponeurose (Józsa & Kannus, 1997). Os tendões possuem características fibrosas, são altamente resistentes às forças de tensão e compressão e, quando saudáveis, apresentam textura fibroelástica com coloração esbranquiçada e brilhante, devido ao colágeno (Józsa & Kannus, 1997).

Na junção osteotendínea, na inserção do tendão ao osso, as células possuem morfologia semelhante aos condrócitos e são transformadas em grupos de osteócitos que posteriormente assumem uma distribuição óssea características (Ralphs *et al.*, 1991; Rufai *et al.*, 1992). Os elementos fibrilares presentes no tendão se expandem até a região de inserção, reforçando a fixação e assim distribuindo as forças de tensão (Elliot, 1965). Na junção miotendínea, na inserção do tendão ao músculo, existe uma complexidade maior, onde os elementos fibrilares do tendão são contínuos com o tecido conjuntivo compondo o revestimento das unidades musculares e uma íntima associação entre os componentes fibrilares e a superfície das fibras musculares, mais propriamente a lâmina basal (Józsa *et al.*, 1991).

O tendão pode ser revestido por uma bainha sinovial, a qual facilita o deslizamento do tendão contra as superfícies adjacentes, que tem função de diminuir o atrito contra os acidentes ósseos e os tecidos. Envolvendo os tendões, que não possuem bainhas sinoviais verdadeiras, existe uma membrana externa de tecido conjuntivo frouxo com função similar, a bainha paratendinosa ou paratenônio (Benjamin & Ralphs, 2000; Kannus, 2000). O paratenônio permite o livre movimento do tendão contra os tecidos vizinhos e a entrada de nervos, de vasos linfáticos e sanguíneos, que vascularizam as camadas mais internas do

tecido, através do epitenônio e endotenônio. O epitenônio localizado sob o paratenônio, é uma fina bainha de tecido conjuntivo que circunda o tendão (Józsa *et al.*, 1991). O endotenônio reveste e liga cada feixe de fibra de colágeno terciário, secundário (fascículo) e primário (subfascículo) do tendão (Józsa & Kannus, 1997; Kannus, 2000; Aro *et al.*, 2009). As fibrilas são as unidades básicas que formam as fibrilas de colágeno e têm função fundamental na transmissão da força no tendão (Magnusson *et al.*, 2003). As fibrilas de colágeno são constituídas por moléculas longas e estáveis compostas por três cadeias polipeptídicas, denominadas α , que formam uma estrutura em tripla hélice, denominada de tropocolágeno. Cada cadeia possui uma sequência repetitiva Gly-X-Y, sendo que X e Y podem ser quaisquer aminoácidos, mas cerca de um terço das posições X são ocupadas por prolina e um número semelhante de posições Y são ocupadas por hidroxiprolina (Kadler *et al.*, 1996; Gelse *et al.*, 2003). As propriedades biomecânicas do tendão se devem ao arranjo e organização das moléculas de colágeno. A presença de prolina, hidroxiprolina e glicina é fundamental na estabilização da tripla hélice das moléculas de colágeno (Piez & Reddi, 1984).

A MEC dos tendões é constituída por colágeno, proteoglicanos (PGs) e proteínas não colagênicas (Kannus, 2000; Silver *et al.*, 2003). O colágeno representa cerca de 65-85% do peso seco do tendão, sendo o restante representado por células, PGs e outras proteínas da matriz (Parry *et al.*, 1978; Liu *et al.*, 1995; Kjaer, 2004). O colágeno corresponde a mais da metade do total de proteínas de um organismo adulto e é um dos principais componentes da MEC dos tendões (Gelse *et al.*, 2003). Atualmente já foram descritos vinte e três tipos de colágeno estruturalmente distintos (Gordon *et al.*, 2000), assim como sua distribuição e função nos diferentes tecidos (Burgeson & Nimni, 1992; Mayne & Brewton, 1993). O colágeno do tipo I é o principal componente nos tendões, no entanto outros tipos já foram descritos (van der Rest & Garrone, 1991; Kjaer, 2004), como o tipo III (Birk & Mayne, 1997), IV, (Ahtikoski *et al.*, 2003), V e VI (Józsa & Kannus, 1997).

Uma grande parte da água contida nos tendões está associada aos PGs na MEC (Józsa & Kannus, 1997; Vogel & Meyers, 1999; Kjaer, 2004), que são grandes moléculas hidrofílicas, constituídas por um esqueleto protéico central e por cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), açúcares sulfatados e carboxilados ligadas covalentemente (Evanko & Vogel, 1990; Provenzano & Vanderby Jr., 2006). Os GAGs dos PGs em geral também podem se associar às proteínas fibrosas da matriz, como o colágeno, gerando

estruturas supramoleculares (Vidal & Mello, 1984). A variabilidade molecular observada, tanto no esqueleto protéico quanto nas diferentes classes de GAGs ligados, permite aos PGs desempenharem diversas funções nos tecidos (Iozzo & Murdoch, 1996). O PG contribui significativamente com as propriedades biomecânicas do tendão (Silver *et al.*, 2003), na regulação do diâmetro das fibrilas (Hedbom & Heinegård, 1989; Iozzo & Murdoch, 1996; Birk & Mayne, 1997) e em sua formação (Dressler *et al.*, 2002). Nos tendões estão presentes os pequenos PGs, fibromodulim e decorim, ricos em leucina (Derwin *et al.*, 2001; Provenzano & Vanderby Jr., 2006) e os grandes PGs, representados pelo agregam e o versicam (Evanko & Vogel, 1990). Os pequenos PGs, interagem com as fibrilas de colágeno atuando na fibrilogênese (Scott *et al.*, 1997) e na regulação do crescimento em diâmetro das fibrilas de colágeno (Douglas *et al.*, 2006). Em resposta às forças de tensão e compressão esses pequenos PGs podem atuar na remodelação do tendão (McCormick, 1999), aumentando a capacidade do tecido de resistir às demandas mecânicas (Silver *et al.*, 2003).

Histologicamente os tendões apresentam um arranjo denso e paralelo de feixe de fibras de colágeno associados às células, que se orientam de acordo com os feixes. Regiões do tendão submetidas a forças adicionais de compressão apresentam uma estrutura fibrocartilaginosa que se cora fortemente com o azul de Toluidina (AT), devido à presença dos GAGs. Os feixes de fibras de colágeno do tendão apresentam um fenômeno chamado de "crimp", os quais são arranjos regulares e sinuosos, refletindo uma periodicidade de mudanças de direção dos elementos fibrilares, com uma variação organizacional periódica importante na absorção de choques durante o estresse mecânico (Gathercole & Keller, 1991). Os tenoblastos e tenócitos, formas especializadas de fibroblastos e fibrócitos, estão localizados entre as fibras de colágeno e são responsáveis pela síntese dos componentes da MEC dos tendões (Hayem, 2001). Compreendem cerca de 90% a 95% dos elementos celulares do tendão, os outros 5% a 10% compreendem os condrócitos em regiões de compressão e inserção, células sinoviais da bainha e células vasculares no endotenônio e no paratenônio (Józsa & Kannus, 1997).

Os fibroblastos são caracterizados por intensa atividade sintética, demonstrada na ultraestrutura pela presença de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, ribossomos livres e numerosas vesículas periféricas, com a maturidade essas células apresentam-se metabolicamente menos ativas, alongadas e com poucos prolongamentos (Esquisatto *et al.*, 2003).

A análise ultraestrutural do tendão mostra que nem todas as fibras de colágeno são paralelas, embora o colágeno do tipo I tenha preferência em adotar essa disposição, podendo ser encontradas fibras organizadas horizontal e transversalmente, assim como formando espirais e entrelaçadas ao longo de seu curso (Józsa *et al.*, 1991).

Diferentes forças podem atuar no tendão, modificando as características ultraestruturais das células, da conformação dos feixes de colágeno e da matriz como um todo, indicando que as células nessas regiões respondem às mudanças nas forças biomecânicas (Gillard *et al.*, 1979; Merrilees & Flint, 1980). Dentre essas forças estão, a tensão, a compressão e o atrito. Tendões que mudam de direção e contornam uma extremidade óssea ou uma articulação, antes da sua inserção, são denominados de "wrap around" (Alexander & Dimery, 1985). Esse estímulo provoca a formação de uma estrutura fibrocartilaginosa, ocorrendo assim uma resposta adaptativa que protege os tendões de compressões potencialmente prejudiciais (Benjamin & Ralphs, 2004). Nessas regiões, que recebem forças de compressão, ocorre o estímulo para a síntese de PGs, enquanto a força de tensão, também presente, pode desempenhar um papel regulatório na determinação do tipo de PGs produzido pelo tendão (Vogel & Heinegård, 1985; Koob & Vogel, 1987; Evanko & Vogel, 1990). Conseqüentemente as fibrocartilagens apresentam um acúmulo de GAGs que promove maior retenção de água na matriz contribuindo para elevar a resistência à compressão no tecido (Vogel & Koob, 1989).

Possuindo papel central no funcionamento e biomecânica dos tendões as fibrilas de colágeno podem possuir padrões de distribuição diferentes. Em tendões, onde as forças de compressão estão atuando em todas as direções, a fibrilas não apresenta uma orientação regular e o tecido está arranjado de forma irregular. Quando as forças de tensão são executadas somente em uma direção as fibrilas apresentam-se dispostas com seu arranjo típico paralelo entre si e alinhadas às forças de tensão (O'Brien, 1997).

As fibrilas de colágeno possuem área de secção transversa circular, podendo apresentar diâmetros e distribuições variáveis nos diferentes tendões. As fibrilas com diâmetro maior têm grande quantidade de ligações cruzadas intrafibrilares, que implica em grande resistência à força de tensão. Fibrilas de diâmetro menor possuem potencial para a formação de ligações cruzadas interfibrilares com função de inibir o deslizamento entre as fibrilas proporcionando maior elasticidade. Assim a proporção de fibrilas de diferentes diâmetros está associada com a

força e a elasticidade do tendão (Parry *et al.*, 1978). Uma forma de descrever a distribuição dos diâmetros das fibrilas de colágeno é o diâmetro de massa-média (MAD), que corresponde a média da distribuição diâmetro/área das fibrilas, em função da distribuição diâmetro/frequência de uma determinada população de fibrilas. O MAD leva em conta o fato de que pequeno número de fibrilas grandes tem uma contribuição significativa à resistência à tração (Lindsey *et al.*, 2005).

Essa estrutura complexa permite aos tendões apresentarem propriedades mecânicas que são essenciais para o seu correto funcionamento. Dentre essas propriedades mecânicas podemos citar a elasticidade, a viscoelasticidade e a plasticidade (Engles, 2001). A elasticidade pode ser definida como a capacidade que o material tem, após a retirada de uma carga, de retornar ao seu comprimento e formas originais. Em materiais elásticos a deformação ocorre instantaneamente quando uma força é aplicada e com a remoção dessa força os materiais elásticos retornam ao seu comprimento inicial. Na maioria dos materiais biológicos, como os tendões, a deformação e a volta ao seu comprimento e formas originais ocorrem de maneira gradual. Esse comportamento se deve as propriedades viscoelásticas presentes nos tendões. Assim, toda deformação sofrida pelo tendão, dentro de limites fisiológicos, é recuperável (Öskaya & Leger, 2001). Materiais viscoelásticos têm a capacidade de se deformarem a uma taxa constante, independente da velocidade de aplicação da força (Macnair, 2000). Diferente das outras propriedades descritas, a plasticidade implica em deformação permanente dos tecidos biológicos e está associada a situações patológicas ou quando ocorrem lesões devido à sobre carga (Öskaya & Leger, 2001).

O comportamento dos tecidos biológicos em resposta ao estresse mecânico é representado através de um gráfico da magnitude da força aplicada sobre o material em relação ao deslocamento apresentado (Engles, 2001). A curva de tensão vs deformação fornece informações relativas à elasticidade, plasticidade, rigidez, ponto de falha, e a energia que um tecido é capaz de absorver antes de sua ruptura (Nokin & Levangie, 1992). Essa curva é caracterizada por três regiões distintas. A primeira região é conhecida por “toe region”, onde as fibras ainda se apresentam frouxas e pouco alinhadas em um padrão ondulatório chamado “crimp” (Lundon, 2003). Com o aumento da carga sobre o tecido as fibras de colágeno começam a se alinhar. Essa região é caracterizada por uma baixa rigidez, um pequeno aumento na força de tensão provocando grande deformação (Woo *et al.*, 1980). Após a fase de

alinhamento das fibrilas, o tecido entra na região elástica, a fase linear da curva, onde as fibras tornam-se mais alongadas e alinhadas em paralelo umas com as outras (Viidik, 1996). Nessa região a deformação aumenta linearmente com a força aplicada (Engles, 2001). A inclinação da curva tensão vs deformação representa a rigidez do tecido, que é representada pelo módulo de Young (ou módulo elástico), que está diretamente relacionada à resistência do material à deformação (Ugbo *et al.*, 2004; Dowling & Dart, 2005). Na região elástica a retirada da carga permite que o material retorne ao seu estado original (Engles, 2001). Caso ultrapasse o limite elástico, chegando ao ponto máximo de tensão, a fase de falha (região plástica) é atingida e a curva começa a declinar, devido à perda de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno. Com o conseqüente aumento da deformação ocorrendo rupturas sucessivas das fibras antes do completo colapso do tendão. Após esse ponto a tensão cai e vários elementos fibrosos se rompem (Viidik, 1996). Quando isso acontece, o tecido torna-se permanentemente deformado, não ocorrendo recuperação após a remoção da carga.

Os tendões também estão expostos a modificações de sua MEC que podem acarretar prejuízo ao funcionamento normal do tecido. Os níveis aumentados de colesterol são comuns entre os indivíduos obesos e seu acúmulo no interior dos tendões pode ter efeito prejudicial. Níveis aumentados de colesterol podem desempenhar um papel no desenvolvimento de injúrias do tendão. O efeito negativo de altas taxas de colesterol já foram relacionadas à saúde do tendão (Mathiak *et al.*, 1999; Ozgurtas *et al.*, 2003; Beeharry *et al.*, 2006).

Existem modificações da MEC relacionadas ao acúmulo de lipídio e células adiposas no tendão, sendo que o acúmulo de lipídio é freqüente, porém normalmente é relacionado à idade. Células adiposas são raramente encontradas associadas às fibras e aos tenócitos nos tendões humanos saudáveis, ficando restritas ao paratenônio e ao endotenônio. A deposição do lipídio nos tendões pode ocorrer de diferentes formas. Na lipidose, pequenas gotículas de lipídio são depositadas entre as fibras de colágeno e as fibras do fascículo, as fibras de colágeno não apresentam anormalidades estruturais ou químicas, e provavelmente, as propriedades biomecânicas do tendão não são afetadas (Józsa & Kannus, 1997). As gotículas podem ser constituídas de lipídios neutros e cristais de colesterol. Esse é um processo mais freqüente nos tendões calcanear e patelar humanos.

Na tendolipomatose ocorre acúmulo de células adiposas entre as fibras de colágeno. A fase inicial da tendolipomatose é caracterizada pelo aparecimento de pequenos grupos

isolados de adipócitos profundamente no tendão, entre as fibras de colágeno. Na fase avançada, as células produtoras de lipídio aparecem interrompendo a continuidade das fibras de colágeno e feixes de fibras, formando cavidades irregulares paralelas ao eixo do tendão. Em algumas áreas, as células adiposas são circundadas por uma fina rede fibrilar de colágeno do tipo III e as fibras de colágeno apresentam padrão irregular. Durante o desenvolvimento da tendolipomatose a estrutura normal da rede de colágeno desaparece e os feixes de fibras tornam-se mais desorientadas e interrompidas mostrando aumento na variação da espessura, resultando em diminuição da força de tensão do tendão (Józsa & Kannus, 1997).

Embora a literatura possua informações sobre muitos aspectos da obesidade, são escassas as informações que relacionam as limitações, funcionais e estruturais, impostas pelo sobrepeso e pela obesidade aos tendões (Gaida *et al.*, 2008).

Diferentes fatores influenciam o metabolismo dos tendões, alterando sua estrutura, composição química e propriedades mecânicas, durante seu desenvolvimento e maturação. Dentre esses fatores as alterações relacionadas ao exercício (Nakagaki *et al.*, 2007), a inativação ou desuso (Stone, 1988; Nakagawa *et al.*, 1989) e a idade (Parry *et al.*, 1978; Birk & Mayne, 1997) são bem conhecidas. No entanto, um outro fator começa a ser relacionado às alterações a que os tendões são submetidos, o aumento da adiposidade e da obesidade nas populações humanas.

Já é conhecido o efeito da obesidade sobre o sistema músculo esquelético e sua relação com as osteoartrites das grandes e pequenas articulações (James, 1995). Mas sua associação entre a obesidade e a saúde dos tendões necessita de investigações mais profundas (Gaida *et al.*, 2008). Trabalhos recentes mostram que pode haver associação entre a adiposidade e a obesidade e as patologias do tendão. Autores relacionam a obesidade a ruptura espontânea de tendões (Holmes & Mann, 1992), a adiposidade abdominal aumentada como fator na ocorrência de alterações dos tendões patelares de atletas (Malliaras *et al.*, 2007) e maior IMC ao aumento do risco do desenvolvimento de tendinopatias (Fahlstrom *et al.*, 2003; Wendelboe *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2005). No entanto os mecanismos envolvidos continuam desconhecidos (Gaida *et al.*, 2008).

Diante disso, verifica-se que a obesidade é um mal que afeta as sociedades modernas sendo um assunto de interesse geral, mas pouco se sabe sobre sua influência nos tendões. Devido à grande importância desse tema nos dias atuais, este projeto teve o objetivo de buscar

informações sobre a influência da obesidade no sistema músculo-esquelético, principalmente nos tendões.

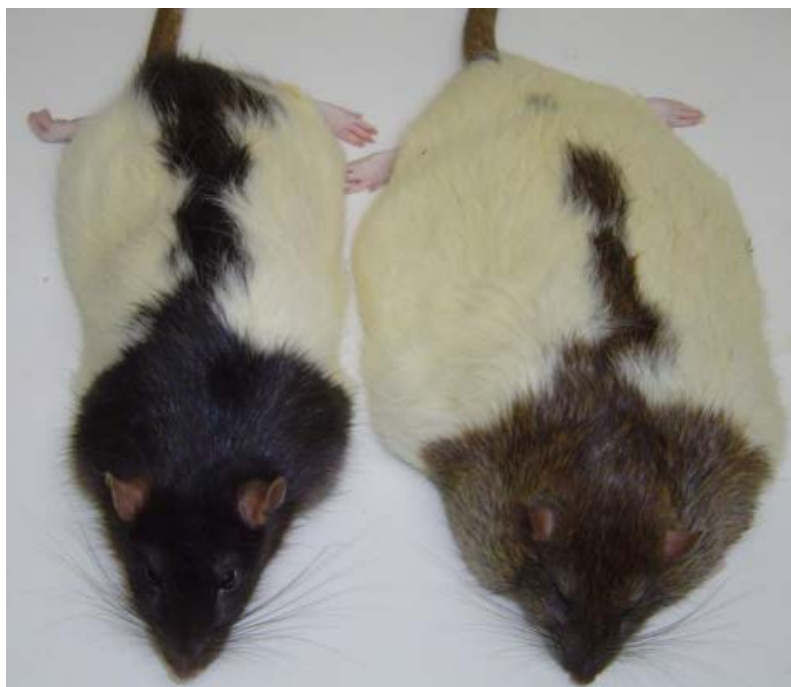


Figura 1 - Ratos Zucker Magro (Fa/Fa or Fa/fa) e Obeso (fa/fa), da esquerda para direita.

Tabela 1 – Peso dos animais obesos e magros em gramas.

Animais	Peso (g)*
Obeso (fa/fa)	628.25 ± 69.14
Magro (Fa/Fa or Fa/fa)	259.50 ± 15.50

(* - significante $p < 0.05$)

Justificativa

A obesidade é um assunto de interesse geral, pois é atualmente um dos maiores problemas de saúde pública que afeta a população humana. Apesar de existir vasta literatura sobre a influência da obesidade no aparato músculo-esquelético pouco se sabe sobre sua influência nos tendões.

Objetivo

Analisar o tendão do músculo flexor digital profundo (DDFT) de ratos geneticamente obesos (Zucker - fa/fa), através de estudos morfológicos, biomecânicos e bioquímicos procurando identificar as mudanças ocorridas nesses tendões, devido ao ganho de peso, quando comparados com tendões de ratos magros (Zucker - Fa/_).

Referências

- Ahtikoski, A. M., Koskinen, S. O. A., Virtanen, P., Kovanen, V., Risteli, J., Takala, T. E. S. (2003). Type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol. Scand.* 177: 473-481.
- Alexander, R., Dimery, N. J. (1985). The significance of sesamoids and retroarticular processes for the mechanics of joints. *J. Zool.* 205: 375-371.
- Aro, A. A., Vidal, B. C., Pimentel E. R. Propriedades bioquímicas, estruturais e biomecânicas do tendão calcâneo. *Multiciência*, 9 (in press).
- Beeharry, D., Coupe, B., Benbow, E. W., Morgan, J., Kwok, S., Charlton-Menys, V., France, M., Durrington, P. N. (2006). Familial hypercholesterolaemia commonly presents with Achilles tenosynovitis. *Ann. Rheum. Dis.* 65: 312-315.
- Benjamin, M., Ralphs, J. R. (2000). The cell and development biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.* 196: 85-130.
- Benjamin, M., Ralphs, J. R. (2004). Biology of fibrocartilage cells. *Int. Rev. Cytol.* 233: 1-45.
- Birk, D. E., Mayne, R. (1997). Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur. J. Cell Biol.* 72: 352-361.
- Bray, G.A. (1977). The Zucker-fat rat: a review. *Fed. Proc.* 36: 148-153.
- Burgeson, R. E., Nimni, M. E. (1992). Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin. Orthop.* 282: 250-272.
- Derwin, K. A., Soslowsky, L. J., Kimura, J. H., Plaas, A. H. (2001). Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structures in the mouse tail tendon fascicle. *J. Orthop. Res.* 19: 269-277.
- Descamps, O. S., Leysen, X., Van Leuven, F., Heller, F. R. (2001). The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 157: 514-518.
- DiNubile N. A. (1997). Osteoarthritis: how to make exercise part of your treatment plan. *Phys. Sportsmed.* 25: 47-56.
- Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Worch, H. (2006). Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* 7(8): 2388-2393.

- Dowling B. A., Dart A. J. (2005). Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *Vet. J.* 170: 184-192.
- Dressler, M. R., Butler, D. L., Wenstrup, R., Awad, H. A., Smith, F., Boivin, G. P. (2002). A potential mechanism for age-related declines in patellar tendon biomechanics. *J. Orthop. Res.* 20: 1315-1322.
- Elliot, D. H. (1965). Structure and function of mammalian tendon. *Biol. Ver.* 40: 392-421.
- Engles, M. (2001). Tissue response. In Donatelli, R. A., Wooden, M. J., Orthopaedic Physical Therapy. 3rd ed., Churchill Livingstone, Philadelphia, pp.1-24.
- Esquisatto, M. A. M., Joazeiro, P. P., Pimentel, E. R., Gomes, L. (2003). Ultrastructural characteristics of tensional regions and tendons from rats of different ages. *Braz. J. Morphol. Sci.* 20: 109-114.
- Evanko, S. P., Vogel, K. G. (1990). Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous regions of bovine tendon. *Matrix* 10: 420-436.
- Fahlstrom, M., Jonsson, P., Lorentzon, R., Alfredson, H. (2003). Chronic Achilles tendon pain treated with eccentric calf-muscle training. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 11: 327-333.
- Friedman, J. M., Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
- Gaida, J. E., Cook, J. L., Bass, S. L. (2008). Adiposity and tendinopathy. *Disabil. Rehabil.* 30: (20 -22) 1555 - 1562.
- Gathercole, L. J., Keller, A. (1991). Crimp morphology in the fibre-forming collagens. *Matrix* 11: 214-234.
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. (2003). Collagens – structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55: 1531-1546.
- Gillard, G. C., Reilly, H. C., Bell-Booth, P. G., Flint, M. H. (1979). The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect. Tissue Res.* 7: 37-46.
- Goodpaster, B. H. (2002). Measuring body fat distribution and content in humans. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 5: 481-487.
- Gordon, M. K., Gerecke, D. R., Hahn, R. A., Bhatt, P., Goyal, M., Koch, M. (2000). Cloning of a new collagen, type XXIII, expressed in cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 3997.
- Hayem, G. (2001). Tenology, a new frontier. *Joint Bone Spine* 68: 19-25.

Hedbom, E., Heinergård, D. (1989). Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J. Biol. Chem.* 264: 6869-6905.

Holmes, G. B., Mann, R. A. (1992). Possible epidemiological factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. *Foot Ankle*.13: 70-79.

IBGE (2003). Coordenação de Índice de Preços, Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Diretoria de Pesquisas, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/analise.pdf>, acessado em 26/11/2008.

Iozzo, R.V. Murdoch, A. D. (1996). Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 10: 598-614.

James, P. T., Leach R., Kalamara, E., Shayeghi, M. (2001). The Worldwide Obesity Epidemic. *Obes. Res.* 9: S228-S233.

James, W.P. (1995). A public health approach to the problem of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 3: 37-45.

Józsa, L. G., Kannus, P., Balint, J.B., Rëffy, A. (1991). Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta. Anat.* 142: 306-312.

Józsa, L. G., Kannus, P. (1997). In Human tendons: Anatomy, Physiology and Pathology, Human Kinetics, Champaign, pp. 46-95.

Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., Chapman, J. A. (1996). Collagen fibril formation. *Biochem. J.* 316: 1-11.

Kannus, P. (2000). Structure of tendon connective tissue. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 10: 312-320.

Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.*, 84: 649-698.

Koob, T. J., Vogel, K. G. (1987). Site-related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J. Orthop. Res.* 5: 414-424.

Kopelman, P.G. (1994). Causes and consequences of obesity. *Med. Int.* 22: 385-388.

Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.

Kuczmarski, R., Flegal, K., Campbell, S., Johnson, C. (1994). Increasing prevalence of overweight among US adults. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 205-211.

Lementowski, P.W., Zelicof, S. B. (2008). Obesity and osteoarthritis. *Am. J. Orthop.* 37(3):148-51.

Lindsey, J., Edwards, J., Allen, E., Helen, L. (2005). Effect of exercise on age-related changes in collagen fibril diameter distributions in the common digital extensor tendons of young horses. *Am. J. Vet. Res.* 66: 564-568.

Liu, S. H., Yang, R. S., Shaikh, R., Lane, J. M. (1995). Collagen in tendon, ligament and bone healing. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 318: 265-278.

Lundon, K. (2003). Orthopedic rehabilitation science: Principles for clinical management of nonmineralized connective tissue. Butterworth Heinemann, St. Louis, pp. 195.

Macnair, P. J. (2000). Stretching at the ankle joint: Viscoelastic responses to holds and continuous passive motion. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33: 354-358.

Magnusson, S. P., Hansen, P., Kjaer, M. (2003). Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 13: 211-223.

Malliaras, P., Cook, J. L., Kent, P. M. (2007). Anthropometric risk factors for patellar tendon injury among volleyball players. *Br. J. Sports. Med.* 41 :259-263.

Mathiak, G., Wening, J. V., Mathiak, M., Neville, L. F., Jungbluth, K. (1999). Serum cholesterol is elevated in patients with Achilles tendon ruptures. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 119: 280-284.

Mayne, R. Brewton, R. G. (1993). New members of the collagen superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 883-890.

McCormick, R. J. (1999). Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poult. Sci.* 78: 785-791.

Merrilees, M. J., Flint, M. H. (1980). Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am. J. Anat.* 157: 87-106.

Muoio, D. M., Dohm, G. L. Fiedorek Jr., F. T., Tapscott, E. B., Coleman, R. A. (1997). Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46: 1360-1363.

Nakagaki, W. R., Biancalana A., Benevides, G. P., 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.

Nakagawa, Y., Totsuka, M., Sato, T., Fukuda, Y., and Hirota, K. (1989). Effect of disuse on the ultrastructure of the Achilles tendon in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 59: 239-242.

Nokin C. C., Levangie P. K. (1992). Joint structure & function: A comprehensive analysis. 2 ed., FA Davis Company, Philadelphia, pp. 512.

- O'Brien, M. (1997). Structure and metabolism of tendons. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 7: 55-61.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R. (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA* 295:1549-1555.
- Öskaya, N., Leger, D. (2001). Introduction to biomechanics: basic terminology and concepts. In: Nordin, M., Frankel, V. H., Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2-16.
- Ozgurtas, T., Yildiz, C., Serdar, M., Atesalp, S., Kutluay, T. (2003). Is high concentration of serum lipids a risk factor for Achilles tendon rupture? *Clin. Chim. Acta.* 331: 25-28.
- Parry, D. A. D., Barnes, G. R. G., Craig, A.S. (1978). A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 203: 305-321.
- Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. J., Hess, J. F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetics* 13: 18–19.
- Piez, K. A., Reddi A. H. (1984). Extracellular matrix biochemistry. In: Molecular and aggregate structures of the collagens, Elsevier, New York, pp.1-40.
- Provenzano, P. P., Vanderby Jr., R. (2006). Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.* 25: 71-84.
- Rahmouni, K., Haynes, W. G. (2001). Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins. *Bio. Essays* 23: 1095-1099.
- Ralphs, J. R., Benjamin, M., Thornett, A. (1991). Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subjected to compression. *Anat. Rec.* 231: 167-177.
- Reidy, S. P., Weber, J. M. (2000). Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 125: 285-297.
- Rufai, A., Benjamin, M., Ralphs, J. R. (1992). Developmental and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. *Anat. Embryol.* 186: 611-618.
- Scott, P. G., Nakano, T., Dodd, C. M. (1997). Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Bioch. Biophys. Acta* 1336: 254-262.

- Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., Imielinska, C., Ross, R., Heymsfield, S. B. (2003). Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes. Res.* 11: 5-16.
- Silver, F. H., Freeman, J. W., Seehra, G. P. (2003). Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech.* 36: 1529-1553.
- Sorof, J., Daniels, S. (2002). Obesity hypertension in children: a problem of epidemic proportions. *Hypertension* 40: 441-447.
- Steinberg, G. R., Parolin, M. L., Heigenhauser, G. J. F., Dyck, D. J. (2002). Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am. J. Physiol.* 28: E187-E192.
- Stone, M. H. (1988). Implications for connective tissue and bone alterations resulting from resistance exercise training. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 20: S162-S168.
- Ugbo J. L., Leeson B., Hutton W. C. (2004). Tensile properties of fresh human calcaneal (Achilles) tendons. *Clin. Anat.* 17: 30-35.
- van der Rest, M., Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5: 2814-2823.
- Vidal, B. C., Mello, M. L. S. (1984). Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cellular. Mol. Biol.* 30: 195-204.
- Viidik A. (1996). Tendons and ligaments. In: Comper, W. D. Extracellular matrix: Tissue function. V. 1, Amsterdam, Cap 10, pp. 303-327.
- Visscher, T. L. S., Seidell J. C. (2001). The public health impact of obesity. *Annu. Rev. Public Health* 22: 355-375.
- Vogel, K. G., Heinergård, D. (1985). Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J. Biol. Chem.* 16: 9298-9306.
- Vogel, K. G., Koob, T. J. (1989). Structural specialization in tendons under compression. *Int. Rev. Cytol.* 115 :267-293.
- Vogel, K. G., Meyers, A. B. (1999). Proteins in the tensile region of adult bovine deep flexor tendon. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 367: 344-355.
- Wendelboe, A. M., Hegmann, K. T., Gren, L. H., Alder, S. C., White, G. L., Lyon, J. L. (2004). Associations between body-mass index and surgery for rotator cuff tendinitis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86: 743-747.
- Werner, R. A., Franzblau, A., Gell, N., Ulin, S. S., Armstrong, T. J. (2005). A longitudinal study of industrial and clerical workers: Predictors of upper extremity tendonitis. *J. Occup. Rehabil.* 15 :37-46.

W.H.O. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894.

W.H.O. (2003). Global strategy on diet, physical activity and health. Geneva, World Health Organization.

W.H.O. Western Pacific Region (2003b). Diet, food supply and obesity in the pacific. WHO Regional Office for the Western Pacific.

W.H.O. (2006). Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Geneva, World Health Organization.

W.H.O. Europe (2007). The challenge of obesity in the WHO european region and the strategies for response. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe.

Woo, S. L. Y., Ritter, M. A., Amiel, D., Sanders, M., Gomez, M. A., Kuei, S. C., Garfin, S. R., Akeson, W. H. (1980). The biomechanical and biochemical properties of swine tendons: long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect. Tissue Res.* 7: 177-183.

Artigo I

Implications of obesity for tendon structure, ultrastructure and biochemistry: A study on Zucker rats

A. Biancalana,¹ L. A. Velloso², S. R. Taboga³ and L. Gomes^{1,*}

¹ Department of Cell Biology, Institute of Biology, CP 6109, University of Campinas – UNICAMP, 13083-863 Campinas, SP, Brazil.

² Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, CP 6109, University of Campinas – UNICAMP, 13083-863 Campinas, SP, Brazil.

³ Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences São Paulo State University - UNESP, - IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

*** Corresponding Author:**

Dr. Laurecir Gomes

Telephone: 0055-19-35216113

Phone/Fax: 0055-19-35216111

e-mail: laure@unicamp.br

Abstract

Tendons connect muscle to bone and are thus involved in force transmission. The structural organization of tendons is a reflex of the supramolecular arrangement of collagen fibers which confer to the tendon the biomechanical properties necessary to transmit and withstand tension and compression forces. The extracellular matrix consists of collagen, proteoglycans and non-collagen proteins. The incidence of obesity and associated diseases is currently increasing in developed countries. Obesity is considered to be a disease of modern times, and genes predisposing to the disease have been identified in humans and animals. The objective of the present study was to analyze the morphological and biochemical alterations that occur in the deep digital flexor tendon of lean (Fa/Fa or Fa/fa) and genetically obese (fa/fa) Zucker rats. Ultrastructural analysis showed the presence of lipid droplets in both groups, whereas disorganized collagen fibril bundles were observed in obese animals. Lean animals presented a larger amount of non-collagen proteins and glycosaminoglycans than obese rats. In conclusion, the overweight and peculiar conditions to which the tendon of obese animals is submitted provoke alterations in the composition and organization of extracellular matrix components. These alterations might be related to organizational and structural modifications in the collagen bundles that influence the mechanical properties of tendons and the progression to a pathological state.

Keywords: Zucker rats, Obesity, Tendon, Morphology, Glycosaminoglycans

1. Introduction

The function of tendons is to transmit the force generated by muscles to bones and thus to permit joint movement (Józsa and Kannus 1997). Collagen accounts for 65 to 80% of the dry mass of tendons, whereas cells, proteoglycans and other matrix proteins represent the remaining dry mass (Parry et al. 1978; Liu et al. 1995). Type I collagen is the main component of tendons, although other types have been described (van der Rest and Garrone 1991). The tissue architecture of tendons is characterized by a dense and parallel arrangement of type I collagen fiber bundles associated with cells that run according to the orientation of the bundles, called modeled dense connective tissue in classical histology (Williams et al. 1989). However, although type I collagen preferentially forms longitudinal fibers, ultrastructural analysis has shown that not all fibers are oriented longitudinally, with the observation of horizontal- and transverse-oriented fibers, as well as fibers forming spirals and fibers intermingled along their trajectory (Józsa et al. 1991). This type of ultrastructural organization is probably more compatible with the function of tendons which can be modeled according to biomechanical demand (Vogel and Koob 1989).

During tendon development, collagen fibrillogenesis produces a tendon-specific extracellular matrix that will determine the functional properties of the tendon (Zhang 2005). Three forces can act on the tendon: tension, compression and friction (Józsa and Kannus 1997). In general, the region subjected to additional compressive and friction forces presents biochemical alterations that can even be detected at the histological level and characterize this region as fibrocartilage (Vogel and Koob 1989). In the compression region, changes in the matrix composition of fibrocartilage reflect the functional differences required by these structures (Ralphs et al. 1991). The ultrastructural characteristics of cells, collagen bundle arrangement and extracellular matrix as a whole in the area submitted to compression and tension differ from those found in regions where only tension forces exist, indicating that the cells present in these regions are sensitive and respond to changes in biomechanical forces (Gillard et al. 1979; Merrilees and Flint 1980; Evanko and Vogel 1990; Carvalho and Vidal 1994).

Obesity has been recognized as one of the leading public health problems in many parts of the world and its incidence is increasing at an alarming rate (WHO 1998; James et al.

2001). Obesity is formally defined as a significant increase above the ideal weight, with ideal weight being defined as that which maximizes life expectancy (Kuczmarski et al. 1994; WHO 2000). For humans, current World Health Organization tables (WHO 2000) show that life expectancy is reduced when the body mass index indicates a significant increase in adiposity above ideal levels. Important alterations in body structure caused by overweight are related to musculoskeletal disorders and osteoarthritis involving large and small joints (James 1995; Kopelman 1994, DiNubile 1997).

Different aspects of obesity have been studied, but data associating molecular and structural effects of overweight and obesity on tendons require further explanations and multidisciplinary anatomobiochemical studies are scarce. Therefore, the objective of the present study was to analyze the morphological and biochemical alterations that occur in the deep digital flexor tendon (DDFT) of Zucker rats. In these animals (fa/fa), obesity is known to be related to an autosomal recessive gene encoding leptin (Bray 1977).

2. Materials and methods

2.1 Animals

Lean (Fa/Fa or Fa/fa) and genetically obese (fa/fa) male Zucker rats were fed normal rat chow until 5 months of age when the latter animals reached 140% of the weight of lean animals and were considered to be obese. The animals performed no type of additional exercise and were therefore classified as sedentary. The experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Institute of Biology, UNICAMP (process 755-2).

2.2 Material collection

The DDFT originates in the deep digital flexor muscle and runs in the direction of the paw where it branches to the fingers. For histological, ultrastructural and biochemical analysis, the tendon was removed and divided into a proximal region, which is subjected to tension/compression forces, and a distal region, which is mainly subjected to tension (Covizi

et al., 2000). The DDFT was removed as a single piece for the analysis of glycosaminoglycans (GAGs).

2.3 Extraction of matrix components

The matrix components were extracted with 4 M guanidine chloride in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.8, containing protease inhibitor, 50 mM EDTA and 1 mM PMSF (Heinegård and Sommarin 1987), for 24 h at 4°C under constant shaking. The material was centrifuged at 15,000 rpm for 60 min at 4°C and the supernatant was stored at -20°C.

2.4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

The DDFT samples were analyzed on SDS-PAGE gradient gels (4-16%) (Zingales 1984) in a buffer system according to Laemmli (1970). Aliquots (100 µl) of different extracts were precipitated in 50 µl 1 M sodium acetate buffer, pH 7.4, and 9 volumes of ethanol for 24 h at 4°C. The precipitate was then dried at 37°C and resuspended in sample buffer containing 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 8% glycerol, 0.4 mM EDTA, and 0.01% bromophenol blue with and without β -mercaptoethanol. Molecular weight standards were run in parallel. The gels were stained with 0.25% Coomassie blue.

2.5 Isolation quantitation and characterization of sulfated glycosaminoglycans

Intact tendons were dehydrated in acetone for 12 h and dried in an oven (12 h, 37°C). GAGs were extracted with papain solution (200 mg/g tissue) in 0.5 M sodium acetate buffer, pH 5.0, containing 25 mM EDTA and 25 mM cysteine for 12 h at 60°C. The precipitate was resuspended in water and used for the measurement of GAGs (Farndale et al., 1986) and agarose gel electrophoresis in propylene diamine buffer according to Dietrich and Dietrich (1976). Standards were analyzed in parallel. The gels were stained with 0.2% toluidine blue.

2.6 Analytical procedures

The content of non-collagenous proteins was determined by the methods of Bradford (1976).

2.7 Histology and histochemistry

The tendons were bathed during dissection in fixative solution (10% formalin in Millonig buffer, pH 7.4) and the different regions were separated and immersed in the same fixative for 24 h at room temperature. The specimens were then washed under running water for 2 h and processed for histological embedding in Histosec™ (Merck, Darmstadt, Germany). Longitudinal sections (7 µm) were cut with a manual microtome and stained with hematoxylin-eosin (HE) for routine histology and with 0.025% toluidine blue (TB) in McIlvaine buffer, pH 4.0, for the analysis of GAGs (Mello and Vidal 1980). For the analysis of lipids, frozen cryostat sections were obtained, air dried at room temperature and fixed in 4% paraformaldehyde in Millonig buffer, pH 7.4. The cryosections were then stained with 1% aqueous Nile blue solution containing 0.01 M sulfuric acid for the observation of lipids under a fluorescence microscope and with 1.4% Sudan black B in saturated 70% alcohol for conventional light microscopy.

2.8 Transmission electron microscopy

During dissection, the tendons were bathed in fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. The compression and tension regions were separated and kept in the same fixative for 2 h at room temperature. The material was washed with buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h at 4°C and bulk stained with 1% aqueous uranyl acetate for 18 h at 4°C. After these procedures, all specimens were dehydrated, embedded in Epon 812 resin and polymerized for approximately 48 h at 58°C. Ultrathin sections were cut with an Ultracut UCT ultramicrotome (Leica). The material was counterstained with 2% uranyl acetate in 50% ethanol and 0.2% lead citrate in 0.1 N NaOH and observed under an LEO 906 transmission electron microscope.

(Zeiss, Jena, Germany) operated at 80 kV. The images were captured with a digital imaging system for documentation.

2.9 Scanning electron microscopy

The fixation and postfixation procedures were the same as described in the previous section. The specimens obtained from the different regions were treated with increasing sucrose concentrations (0.5, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 M), frozen in liquid nitrogen, broken into pieces and washed in water. After these procedures, the pieces were dehydrated in an increasing ethanol series (70, 80, 90, 95 and 100%) and completely dried in a critical-point chamber using carbon dioxide (Anderson 1951). The material was mounted on stubs and sputtered with gold using a sputtering system (Herrmann and Muller 1991). The specimens were analyzed under a JEOL 5800 LV scanning electron microscope and images were captured with a digital imaging system for documentation.

2.10 Statistical analysis

The data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for multiple comparisons. The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The level of significance was set at 5% for all tests.

3. Results

3.1 Histology and histochemistry

Overall microscopic analysis of HE- and TB-stained histological sections obtained from the two groups of animals revealed no qualitative differences in the architectural arrangement or cellularity of tendons. However, groups of axially oriented round cells, intercalated with collagen fibers, were observed in the compression region (Fig. 1A). These cells were concentrated in the region bordering the bone and their morphology resembled that of fibrocartilage.

TB staining promoted marked metachromasia in the extracellular matrix of the compression region, which was more intense in the territorial region of cells compared to the interterritorial matrix of the tendon (Fig. 1B). In the region mainly subjected to tension forces, HE staining showed the presence of elongated fibroblast cells, aligned along the tendon (Fig. 1C). TB did not react with the extracellular matrix of the tension region (Fig. 1D), with only nuclear staining showing the orthochromasia characteristic of chromatin.

Lipid droplets with a similar pattern of distribution were detected in all cryosections obtained from the two regions, intercalating with the collagen fibers of tendons in both obese and lean animals (Fig. 1E and F).

3.2 Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy

Axially oriented elongated cells were observed in the compression region of tendons from obese and lean animals (Fig. 2A), whose ultrastructural characteristics were those of typical fibroblasts. The territorial matrix of these fibroblasts was rich in collagen fibrils that presented the characteristic molecular distribution and arrangement. Tenocytes were observed in the same region in a more distal portion of the tendon bordering the bone. These cells were similar to those detected in the tendon region subjected to tension forces (Fig. 2E). In obese and lean animals, the tendon region mainly subjected to tension forces presented fibroblast-like cells with numerous processes that intercommunicated with different cells (Fig. 2E) and were oriented in parallel to the collagen fibrils (Fig. 2D). The typical band pattern of collagen fibrils was visible in longitudinal sections (Fig. 2B). Variations in collagen fibril diameter were observed in cross-sections (Fig. 2C) of tendons in the two regions analyzed. In tendons from both groups of animals, lipid droplets were present inside cells and in the extracellular space between collagen bundles in these regions (Fig. 2F, G, H). In the tension region of obese animals, a disorganized pattern of fibril distribution was observed along the collagen fibril bundles (Fig. 2I, J).

3.3 Ultrastructural analysis by scanning electron microscopy

Analysis of the material by scanning electron microscopy showed that the presence of fat droplets was constant in the two regions studied in both obese and lean animals. Analysis of the distribution of the lipid material of variable diameters confirmed their extracellular location intermingled with collagen fibrils (Fig. 3E, F). A network of collagen fibers was observed in the tendons of obese and lean animals (Fig. 3D). The collagen fiber network was broken and formed a disorganized structure which was similar in the two groups. On tendon photomicrographs, undulated collagen fibers and aligned cells were observed in the compression region of obese and lean animals (Fig. 3C). A network of aligned fibrils forming bundles was noted in the tension region of tendons from both obese and lean animals (Fig. 3E). Cells with accumulated material arranged in rows and covered with thin collagen fibers were only observed in obese animals. These structures were present along normal collagen fibers (Fig. 3A, B).

3.4 Analytical procedures

A significant non-collagenous protein content was observed in the tension region of the DDFT of lean animals (17.31 ± 0.6 mg/g tissue) compared to obese animals (11.14 ± 0.6 mg/g tissue). A no significant difference was observed in the compression region (Table 1). GAG content was higher in the DDFT of lean animals (2.45 ± 0.16 mg/g tissue) compared to the tendon of obese animals (1.31 ± 0.46 mg/g tissue) ($p > 0.05$) (Table 2).

3.5 Analysis of non-collagen protein and glycosaminoglycans

The distribution of α_1 , α_2 and β collagen chains, the most abundant protein components in tendon, and non-collagen proteins in the two regions of the DDFT was similar in obese and lean animals (Fig. 4). Treatment with β -mercaptoethanol did not alter protein mobility (data not shown). A protein band of about 60 kDa (indicated by $\rightarrow$), which might correspond to the small proteoglycan fibromodulin, was present in the two groups.

The GAGs chondroitin sulfate and dermatan sulfate were detected in tendons of the two groups studied. Dermatan sulfate was the most abundant in both groups, whereas there were only traces of chondroitin sulfate (fig. 5).

4. Discussion

The tissue organization, stability and mechanical characteristics of tendons are determined by the structure, organization and orientation of their collagen fibers, as well as by the length and diameter of the fibrils (Birk et al. 1997). On the other hand, the physical properties of tendons depend on intra- and intermolecular crosslinks (Parry 1988; Haut et al. 1992) which confer tensile strength to the tendon. Collagen is the main element that significantly contributes to the mechanical properties of tendons and ligaments (Viidik 1996). During life the mechanical properties of tendons undergo modifications in terms of the efficiency of tendon function and diseases related to the tendon itself (Silver et al. 2000). An increase or decrease in physical activity, as well as the absence of stress, can cause alterations in tendon composition and structure, rendering them less stiff and weaker (Tipton 1975).

The results obtained with different training protocols have shown the effect of exercise on tendons in rabbits (Viidik 1969), pigs (Woo et al. 1980), rats (Nielsen et al. 1998; Marqueti et al. 2008), birds (Buchanan and Marsh 2001), young horses (Cherdchutham et al. 2001) and humans (Rosager et al. 2002), as well as in chickens submitted or not to spontaneous exercise (Benevides et al. 2004; Nakagaki et al. 2007). The continuous repetition of load cycles as occurs while walking exerts significant demands on the musculoskeletal apparatus even in normal-weight individuals (Rohrle et al. 1984). Studies on humans have shown that obese subjects present limitations in daily activities and are at high risk of fatigue and/or musculoskeletal injury, especially to the lower limbs, a fact resulting in sedentary behavior (Hills et al. 2002).

The present results show that obesity is an important factor, causing altered structure, ultrastructure and macromolecular arrangement of the tendon extracellular matrix in the compression and tension regions. Though, the animals studied were considered to be sedentary, the two groups performed different physical activities during their development. Lean animals moved around normally in the cages, whereas physical activity was limited in

the case of obese rats which remained lying down most of the time. As a consequence, the tendons of lean animals were constantly stimulated, whereas those of obese animals were not.

Our results regarding tendon morphology in obese and lean rats, as well as the differences observed between the compression and tension regions, agree with those reported for rabbits (Gillard et al. 1979; Merrilees and Flint 1980), bovines (Vogel and Koob 1989), rats (Covizi et al. 2001), and humans (Vogel et al. 1993). A large number of processes spreading throughout the extracellular matrix forming a structure of the network were observed in the tendons analyzed. These are necessary to guarantee the contact between cells and abundantly present extracellular matrix components (Merrilees and Flint 1980; Józsa and Kannus 1997). The presence of collagen fibrils along these processes may function to protect these long structures that extend throughout the tendon.

The distribution and diameter of collagen fibrils varies from tendon to tendon (Parry et al. 1978). Changes in collagen fibril diameter are related to age (Parry 1978; Birk 1997), exercise (Culav et al. 1999; Cherdchutham 2001), stress deprivation (Nakagawa 1989), and healing (Frank et al. 1992; Eriksen et al. 2002). Large fibrils are essential for the tendon to withstand tension forces and remodeling of the tendon results in the occurrence of fibrils with a smaller diameter, indicating the production of new fibrils (Shino et al. 1995; Cherdchutham et al. 2001). In Zucker rats, changes in the diameter and distribution pattern of collagen fibrils were observed when comparing lean and obese animals (Biancalana et al., see accompanying paper).

Collagen fibrils are not only aligned longitudinally along the tendon, but may also run in different directions and some bundles present as spirals (Józsa et al. 1991). In the present study, changes in collagen fibril orientation were observed in the two tendon regions of both obese and lean animals. In the compression region, this pattern of distribution was clearly visible and the cells of this region were typical and presented few prolongations. This morphology is important because it permits the tendon to adapt to the different forces to which it is subjected (Vogel and Koob 1989; Merrilees and Flint 1980). This ultrastructure of the tendon may offer a system that withstands longitudinal, transverse and rotation forces during movement (Józsa et al. 1991).

The accumulation of lipid is frequently observed in tendons and is mainly related to aging. This process is called tendolipomatosis since adipose cells are rarely found associated

with fibers or fibroblasts (Kannus and Józsa 1991). The number of lipid droplets in fibroblasts increases with increasing age and especially under pathological conditions (Kannus and Józsa 1991). However, the exclusive presence of small lipid droplets does not cause structural or chemical anomalies in collagen fibers and, therefore, is unlikely to affect the biomechanical properties of tendons (Józsa and Kannus 1997). In the present study, lipid droplets were detected inside cells as well as between collagen fibers of lean and obese rats. The structures observed in the compression region of obese individuals and identified as cells with accumulated material covered with thin collagen fibers, probably type III collagen (Józsa et al. 1984), have been described in degenerative human tendons (Kannus and Józsa 1991). In tendolipomatosis, adipose cells accumulate between collagen fibers, forming long chains and three-dimensional agglomerates in more advanced states, with the collagen fibers becoming interrupted and atrophic (Kannus and Józsa 1991). However, the present results indicate that, if implanted in the tendon studied here, the process of tendolipomatosis was in its initial phase since only small groups of lipid droplets were detected in the extracellular matrix, together with few adipocytes in the tendon.

The progression of tendolipomatosis causes severe changes in tendon architecture and function that interfere with the biomechanical properties of tendons (Kannus and Józsa 1991). In addition, spontaneous rupture of the tendon system alone or in association with other histopathological alterations (Kannus and Józsa 1991) has been reported. Although no training protocol was employed in the present study and the animals were considered to be sedentary, the tendon of obese animals was assumed to undergo periods of extreme use intercalated with periods of inactivity and responded to these stimuli with macromolecular and architectural alterations in the extracellular matrix.

Extreme exercise has been associated with microinjuries and degenerative lesions (Paterson-Kane et al. 1997). During tendon repair and regeneration, the tissue produced possesses incipient biomechanical properties that result in a less organized extracellular matrix (James et al. 2008). Disorganized and tangled collagen fibrils were observed in the tension region of tendons from obese animals. A study investigating the Achilles tendon of chickens submitted to extreme exercise has shown an increase in the deposition of collagen which, however, presented fewer crosslinks. The authors suggested that the increased exercise-

associated recycling of collagen results in the accumulation of immature collagen bundles (Curwin et al. 1988).

Tendon stress deprivation has also been suggested to induce modifications in tendon architecture (Mueller and Maluf 2002) that are related to alterations in the chemical composition and organization of the extracellular matrix, rendering the tissue less resistant (Tipton et al. 1975; Amiel et al. 1982). However, an increased turnover in the absence of alterations in collagen concentration is observed (Akeson et al. 1987; Woo et al. 1975). In this condition, the amount of water and GAGs is reduced and the tissue becomes less elastic and consequently more fragile (Engles 2001; Woo et al. 1975).

The GAGs chondroitin sulfate and dermatan sulfate have been described in the tendons of cattle (Vogel and Koob 1989; Vogel and Heinegård 1985), rabbits (Vogel and Koob 1989; Merrilees and Flint 1980), rats (Covizi et al. 2001), and frogs (Carvalho and Felisbino 1999), and are also present in the tendon of Zucker rats. Among the groups studied, the lowest amount of these GAGs was observed in the DDFT of obese animals. This lower amount of GAGs might be responsible for the inadequate deposition and organization of collagen fibrils observed in the tension region of obese animals (Waggett et al. 1998).

The difference in protein content observed in the tension region of the DDFT between obese and lean animals might be related to the mechanical requirements of this tendon as a function of animal weight, demonstrating that the tissue responds to stimuli and adapts. The detection of a 60-kDa component suggests the presence of small proteoglycans in the DDFT. This 60-kDa component has been identified as the small proteoglycan fibromodulin in the digital flexor tendon of rats and chickens (Benevides et al. 2004; Esquisatto et al. 2007). Proteoglycans are present in the interfibrillar matrix, maintaining and regulating collagen fibril diameter (Cribb and Scott 1995). In this respect, fibromodulin and decorin are known to regulate collagen fibrillogenesis (Hedbom and Heinegård 1989; Iozzo and Murdoch 1996; Provenzano and Vanderby 2006). In addition, proteoglycans significantly contribute to the biomechanical properties of tendons (Kjaer 2004; Cribb and Scott 1995). The results obtained might be related to the composition of GAGs and proteoglycans observed in the tendons of obese and lean animals, influencing collagen fibril organization (Cribb and Scott 1995). These findings suggest the homeostatic importance of GAGs, which play a vital role in the natural

regulation of tendon extracellular matrix and collagen fibrillogenesis (Screen et al. 2005; Waggett et al. 1998).

The changes observed in the present study are directly related to the mechanical stimuli received by the tendon, with the tendon adapting to the mechanical requirements in order to permit its function (Kjaer 2004). The lipid droplets observed inside cells and between collagen bundles did not seem to alter tendon structure; however, the presence of cells with accumulated material may pose a serious risk to tendon integrity, with subsequent progression to severe tendinopathy (Józsa and Kannus 1997; Kannus and Józsa 1991).

5. Conclusion

In conclusion, the overweight and peculiar conditions to which the DDFT of obese animals is submitted provoke alterations in the composition and organization of extracellular matrix components. These alterations might be related to organizational and structural modifications in the collagen bundles that influence the mechanical properties of tendons and the progression to a pathological state

Acknowledgments We thank Dr. Eliane B. Ribeiro, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, for providing the animals used in this study, and FAPESP for the fellowship and financial support (grant 04/14358-5).

References

- Amiel D, Woo SL, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: A biochemical-biomechanical correlation. *Acta Orthop Scand* 1982; 53: 325-332.
- Anderson TF. Techniques for preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *N York Acad Sci* 1951; 13: 130-134.
- Akeson WH, Amiel D, Abel MF, Garfin SR, Woo SL. Effects of immobilization on joints. *Clin Orthop* 1987; 219: 28-37
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72: 248-254.
- Benevides GP, Pimentel ER, Toyama MH, Novello JC, Marangoni S, Gomes, L. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res* 2004; 45:206-215.
- Birk DE, Zychband EI, Woodruff S, Winkelmann DA, Trelstad RL. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Dev Dynam* 1997; 208: 291-298.
- Bray GA. The Zucker-fat rat: a review. *Fed Proc* 1977; 36: 148-153.
- Buchanan CI, Marsh RL. Effects of long-term exercise on the biomechanical properties of the Achilles tendon of guinea fowl. *J Appl Physiol* 2001; 90: 164-171.
- Carvalho HF, Felisbino SL. Development of the pressurebearing tendon the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Anat Embryol* 1999; 200: 55-64.
- Carvalho HF, Vidal BC. Structure and histochemistry of a pressure-bearing tendon of the frog. *Annals of Anatomy* 1994; 176: 161-170.
- Cherdchutham W, Meershoek LS, van Weeren PR, Barneveld A. Effects of exercise on biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon in foals. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1859-1864.
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF. Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cell* 2001; 33: 483-490.
- Cribb AM, Scott JE. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon. *J Anat* 1995; 187: 423-428.

Culav EM, Clarck CH Merrilees MJ. Connective tissue: Matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 1999; 79: 308-319.

Curwin SL, Vailas AC Wood J. Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J Appl Physiol* 1988; 65: 2297-2301.

Dietrich CP, Dietrich SMC. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*, 1976; 70: 645-647.

DiNubile NA. Osteoarthritis: how to make exercise part of your treatment plan. *Phys Sportsmed* 1997; 25: 47-56.

Engles M. Tissue response In: Donatelli RA, Wooden MJ. *Orthopaedic Physical Therapy*, 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2001. p. 1-24.

Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res* 2002; 20: 1352-1357.

Esquisatto MAM, Joazeiro PP, Pimentel ER, Gomes L. The effect of age on the structure and composition of rat tendon fibrocartilage. *Cell Biol Int* 2007; 31: 570-577.

Evanko SP, Vogel KG. Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous regions of bovine tendon. *Matrix* 1990; 10: 420-436.

Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue *Biochim. Biophys Acta* 1986; 883: 173-177.

Frank C, McDonald D, Bray D, Bray R, Rangayyan R, Chimich D, Shrive N. Collagen Fibril Diameters in the Healing Adult Rabbit Medial Collateral Ligament. *Connect Tissue Res* 1992; 27: 251-263.

Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, Flint MH. The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycan content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect Tissue Res* 1979; 7: 37-46.

Haut RC, Lancaster RK, Decamp CE. Mechanical properties of the canine patellar tendon: some correlations with age and the content of collagen. *J Biomech* 1992; 25: 163-173.

Hedbom E, Heinergård D. Interaction of a 59kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. *J Biol Chem*, 1989; 264: 6869-6905.

Heinegård D, Sommarin Y. Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods Enzymol.* 1987; 144: 319-72.

Herrmann R, Müller M. Pre-requisites of high resolution scanning electron microscopy. *Scanning Microscopy* 1991; 5: 653-664.

Hills AP, Hennig EM, Byrne NM, Steele JR. The biomechanics of adiposity: structural and functional limitations of obesity and implications for movement. *Obesity Reviews* 2002; 3: 35-43.

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

James WP. A public health approach to the problem of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 3: 37-45.

James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The Worldwide Obesity Epidemic. *Obes Res* 2001; 9: 228-233.

James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and involving treatment options. *J Hand Surg* 2008; 33: 102-112.

Józsa LG, Réffy A, Balint JBA. Polarization and electron microscopy studies on the collagen of intact and ruptured human tendons. *Acta Histochem* 1984; 74: 209-215.

Józsa LG, Kannus P, Balint JB, Réffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat* 1991; 142: 306-312.

Józsa LG, Kannus P. In *Human tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*, Champaign: Human Kinetics; 1997. p. 46-95.

Kannus P, Józsa LG. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon: A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg* 1991; 73: 1507-1525.

Kjaer M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev* 2004; 84: 649-698.

Kopelman PG. Causes and consequences of obesity. *Med Int* 1994; 22: 385-388.

Kuczmarski R, Flegal K, Campbell S, Johnson C. Increasing prevalence of overweight among US adults. *J Am Med Assoc* 1994; 272: 205-211.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Liu SH, Yang RS, Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament and bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 318: 265-278.

Mello MLS, Vidal BC. *Práticas de Biologia Celular*, Campinas: Edgard Blücher; 1980. p.71.

Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF, Selistre-de-Araujo HS. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol* 2008; 104: 1087-1093.

Merrilees MJ, Flint MH. Ultrastructural study of tension and pressure zones in a rabbit flexor tendon. *Am J Anat* 1980; 157: 87-106.

Mueller MJ, Maluf KS. Tissue adaptation to physical stress: A proposed "Physical Stress Theory" to guide physical therapist practice, education and research. *Phys Ther* 2002; 82: 383-403.

Nakagaki WR, Biancalana A, Benevides GP, Gomes L. Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. *Connect Tissue Res* 2007; 48: 219-228.

Nakagawa Y, Totsuka M, Sato T, Fukuda Y, Hirota K. Effect of disuse on the ultrastructure of the achilles tendon in rats. *Eur J Appl Physiol* 1989; 59: 239-242.

Nielsen HM, Skalicky M, Viidik A. Influence of physical exercise on aging rats III Life-long exercise modifies the aging changes of the mechanical properties of limb muscle tendons. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 243-260.

Parry DAD, Barnes GRG, Craig AS. A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1978; 203: 305-321.

Parry DAD. The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys Chem* 1988; 29: 195-209.

Patterson-Kane JC, Wilson AM, Firth EC, Parry DAD, Goodship AE. Comparison of collagen fibril populations in the superficial digital flexor tendons of exercised and nonexercised Thoroughbreds. *Equine vet J* 1997; 29: 121-125.

Provenzano PP, Vanderby Jr R. Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol* 2006; 25: 71-84.

Ralphs JR, Benjamin M, Thornett A. Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subjected to compression. *Anat Rec* 1991; 231: 167-177.

Rohrle H, Schotten R, Sigolotto C, Sollbach W. Joint forces in the human pelvis-leg skeleton during walking. *J Biomech* 1984; 17:409-424.

Rosager S, Aagaard P, Dyhre-Poulsen P, Neergaard K, Kjaer M, Magnusson SP. Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand J Med Sci Sports* 2002; 12: 90-98.

Screen HRC, Shelton JC, Chhaya VH, Kayser MV, Bader DL, Lee DA. The Influence of Noncollagenous Matrix Components on the Micromechanical Environment of Tendon Fascicles. *An Biom Engin* 2005; 33: 1090-1099.

Shino K, Oakes BW, Horibe S, Nakata K, Nakamura N. Collagen fibril populations in human anterior cruciate ligament allografts. *Am J Sports Med* 1995; 23: 203-209.

Silver FH, Christiansen DL, Snowhill PB, Chen Y. Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. *Connect Tissue Res* 2000; 41: 155-164.

Tipton CM, Mathes RD, Maynard JA, Careu RA. The influence of physical activity in ligaments and tendons. *Med Sci Sports* 1975; 7: 165-175.

van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991; 5: 2814-2823.

Vogel KG, Heinegård D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J Biol Chem* 1985; 260: 9298-9306.

Vogel KG, Koob TJ. Structural Specialization in Tendons under Compression. *Int Rev Cytol* 1989; 115: 267-293.

Vogel KG, Ördög A, Pogány G, Oláh J. Proteoglycans in the compressed region of human tibialis posterior tendon and in ligaments. *J Orthop Research* 1993; 11: 68-77.

Viidik S. Tensile strength properties of Achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. *Acta Orthop Scand* 1969; 40: 261-272.

Viidik A. Tendons and ligaments In: Comper WD. *Extracellular matrix: Tissue function*, vol. 1, Amsterdam: 1996. p. 303-327.

Waggett AD, Ralphs JR, Kwan APL, Woodnuttt D, Benjamin M. Characterization of Collagens and Proteoglycans at the Insertion of the Human Achilles Tendon. *Matrix Biology* 1998; 16: 457-470.

Williams PL, Warwick R, Dyson M, Banmister LH. *GRAY's Anatomy* 37rd ed, London: Churchill Livingstone; 1989.

Woo SL, Matthews JV, Akeson WH, Amiel D, Conver YFR. Connective tissue response to immobility: Correlative study of biomechanical measurements of normal and immobilized rabbit knees. *Arthritis Rheum* 1975; 18: 257-264.

Woo SL, Ritter MA, Amiel D, Sanders M, Gomez MA, Kuei SC, Garfin SR, Akeson, WH. The biomechanical and biochemical properties of swine tendonslong-term effects of exercise on the digital extensors. *Connect Tissue Res* 1980; 7: 177-183.

WHO. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic Report of a WHO Consultation on obesity Geneva: World Health Organization; 1998.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic Report of a WHO Consultation WHO Technical Report Series 894 Geneva: World Health Organization; 2000.

Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, Chakravarti S, Birk DE. Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. J Musculoskelet Neuronal Interact 2005; 5: 5-21.

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

Figure legends

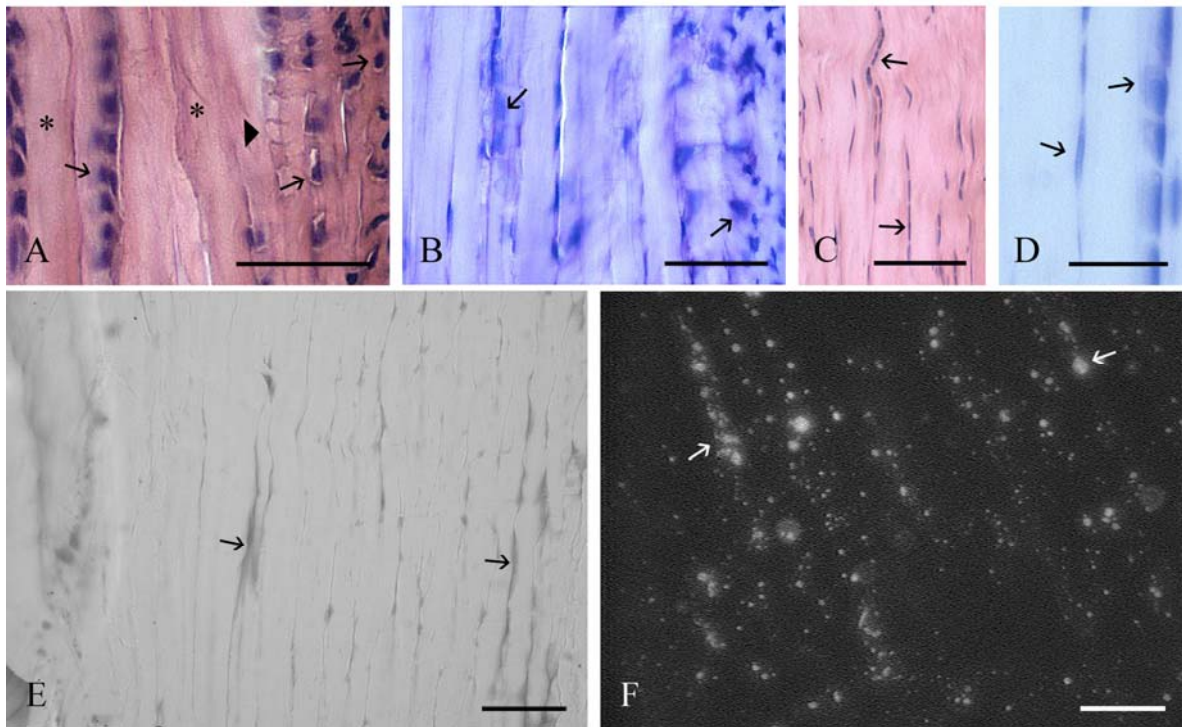


Fig. 1 Longitudinal sections of the tendons of Zucker rats showing the compression (A, B) and tension regions (C, D, E, F). **A** Compression region stained with HE showing round cells arranged in rows (→) and intercalated with collagen fibers (*). Note the large number of chondrocytes close to bone (▶). **B** Toluidine blue staining reveals marked metachromasia around cells (→) where the concentration of glycosaminoglycans is high. **C** Tension region showing hematoxylin-stained elongated nuclei (→). **D** Toluidine blue stains the nuclei (→) in the tension region. The presence of lipids (→) is demonstrated by Sudan black B staining (E) and Nile blue fluorescence (F) under fluorescent light in longitudinal sections of the tension region. Bars = 45 μ m A, B, 25 μ m C, 75 μ m D, 50 μ m E, F.

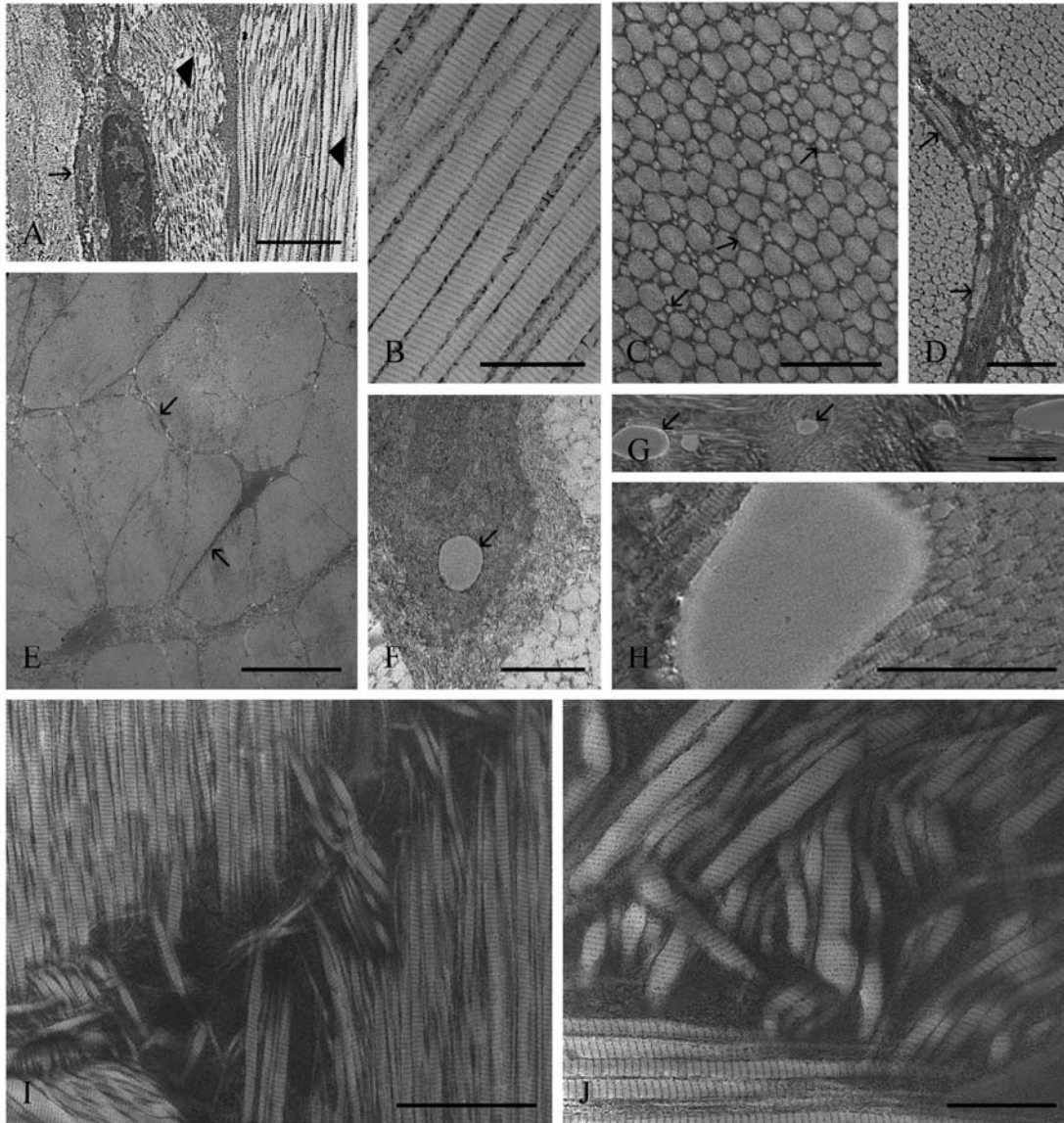


Fig. 2 Transmission electron photomicrographs of the tendons of lean (B, C, E) and obese animals (A, D, F, G, H, I, J). **A** Longitudinal section of the compression region showing elongated cells (→) and collagen fibrils in different orientations (►). Observe the characteristic band pattern of collagen in cross-sections of the tension region (B) and collagen fibrils with different diameters (→) in longitudinal sections (C). **D** Collagen fibrils oriented in parallel to the processes. **E** Cell prolongations (→) surrounding the collagen fibrils. Lipid droplets can be observed inside cells (F/→) and between collagen fibrils (G, H) in tendons from obese and lean animals. Differently oriented collagen fibrils are observed in the tension region of tendons from obese animals (I, J). Bars = 1 μ m **D, F, J**, 2 μ m **H, I**, 5 μ m **G**, 10 μ m **A, B, C, E**.

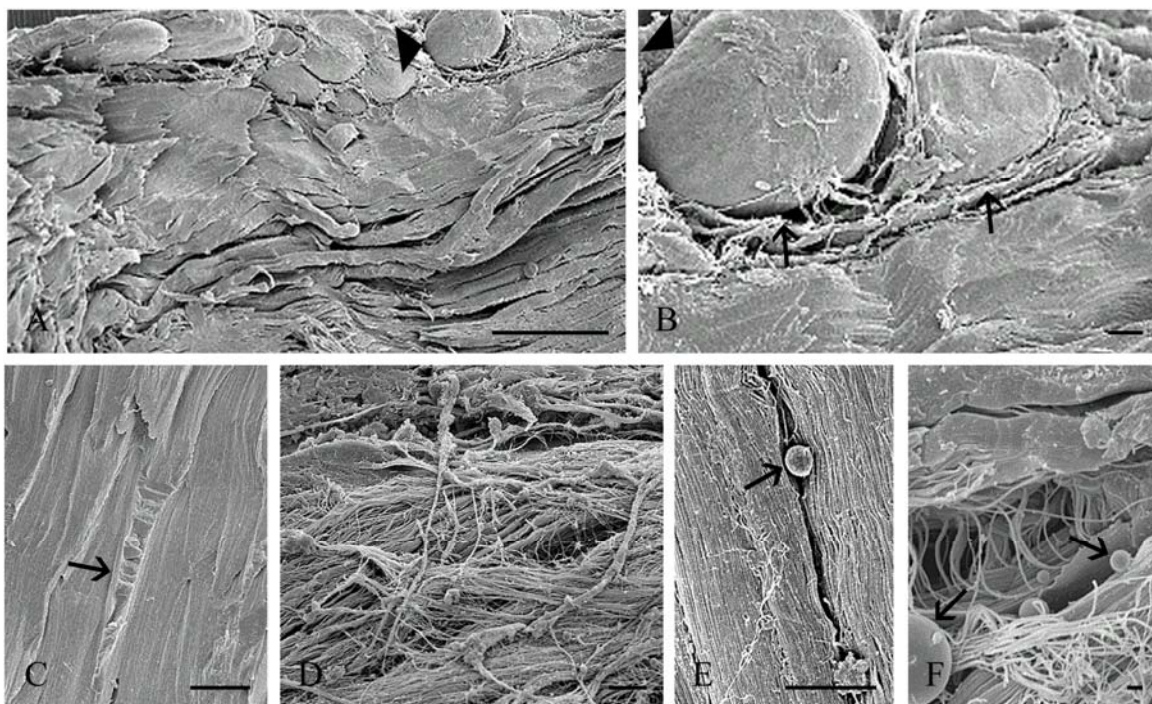


Fig. 3 Scanning electron photomicrographs of the tendons of obese (A, B, C, E) and lean animals (D, F). **A, B** In obese animals lipid cells are covered with thin collagen fibrils (►). **C** In the compression region, fibrochondrocytes (→) are arranged in rows amidst collagen fibers. **D** After cryofracture a network of differently oriented collagen fibers can be observed. **E, F** Lipid droplets (→) are found among collagen bundles. Bars = 1 μm **F**, 10 μm **B, C, D, E**, 100 μm **A**.

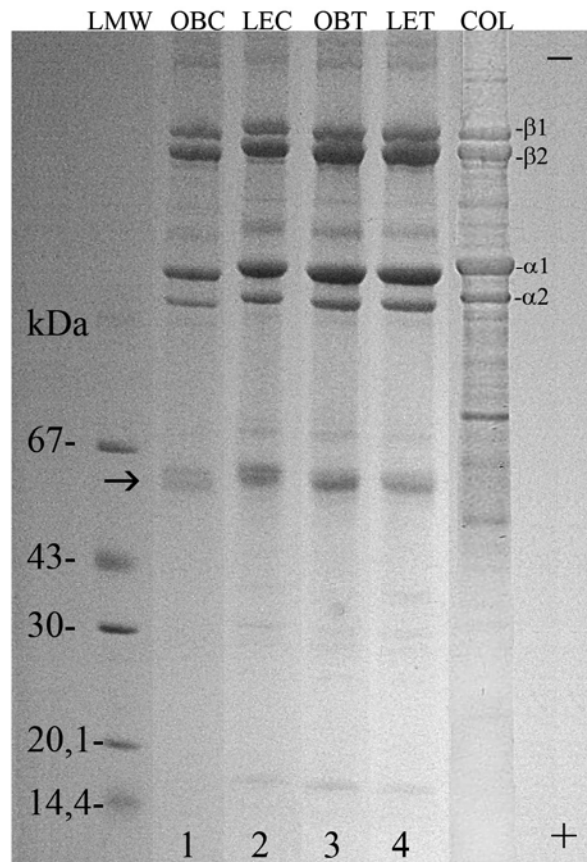


Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of whole extracts obtained from the different regions of the DDFT in the absence of β -mercaptoethanol. A band of about 60 kDa similar to that of fibromodulin is present in all samples. Coomassie blue staining. A low molecular weight standard (LMW) and collagen (COL) were analyzed in parallel. OBC = compression region of the tendon of obese animals; LEC = compression region of the tendon of lean animals; OBT = tension region of the tendon of obese animals; LET = tension region of the tendon of lean animals.

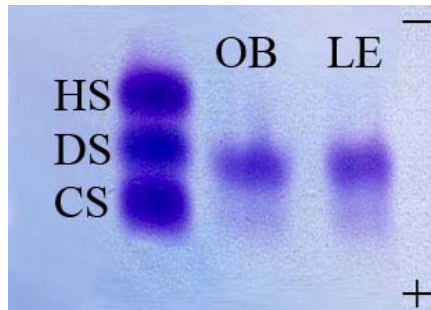


Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of the DDFT. Dermatan sulfate is the predominant component in the tendon of obese (OB) and lean (LE) rats. Note the small amount of chondroitin sulfate. The profile of glycosaminoglycans was analyzed in parallel: CS = chondroitin sulfate; DS = dermatan sulfate; HS = heparan sulfate. Toluidine blue staining.

Tables

Table 1 - Concentration of non-collagen protein (mg/g wet tissue) in the different regions of the DDFT

Animals	Compression region (mg/g) ^{ns}	Tensile region (mg/g)*
Obese (fa/fa)	16.09 ± 2.5	11.14 ± 0.6
Lean (Fa/Fa or Fa/fa)	14.77 ± 1.9	17.31 ± 0.6

(ns – not significant p> 0.05; * - significant p< 0.05)

Table 2 - Concentration of sulfated glycosaminoglycan (GAG) (mg/g dry tissue) of the DDFT

Animals	(mg/g) *
Obese (fa/fa)	1.31 ± 0.46
Lean (Fa/Fa or Fa/fa)	2.45 ± 0.16

(* - significant p< 0.05)

Artigo II

Obesity affect collagen fibril diameter and mechanical properties of Zucker rats tendon

Adriano Biancalana,¹ Lício A. Veloso², and Laurecir Gomes¹

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

²Department Medical Clinic., Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Keywords: Zucker, Obesidade, Tendão, fibrilas de colágeno, biomecânica

Article Type: Original Research.

Contact Author:

Dr. Laurecir Gomes

Department of Cell Biology

Institute of Biology

CP 6109, University of Campinas – UNICAMP

13083-863 Campinas, SP, Brazil.

e-mail: laure@unicamp.br

Telephone: 0055-19-35216113

Phone/Fax: 0055-19-35216111

Resumo

A obesidade é considerada hoje uma epidemia mundial. A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública em muitas partes do planeta, onde cresce em taxas alarmantes. O modelo utilizado foi o rato Zucker, que é um animal geneticamente obeso. A função dos tendões é transmitir a força criada nos músculos aos ossos, possibilitando o movimento articular. Este trabalho objetivou analisar as alterações ultraestruturais, bioquímicas e biomecânicas do tendão do músculo flexor digital profundo em ratos Zucker obesos e magros. Na ultraestrutura do tendão de ambos os animais, o diâmetro das fibrilas de colágeno apresentou distribuição e diâmetro de massa-médio diferentes entre os dois grupos. Com relação aos parâmetros mecânicos houve diferença significativa com relação ao deslocamento e a deformação máxima. Os animais obesos apresentaram o conteúdo de hidroxiprolina maior quando comparado com os animais magros. Devido ao elevado sobrepeso e as condições peculiares à que o tendão dos animais obesos é submetido concluímos que a influência da obesidade sobre os tendões provoca alterações na constituição e organização dos componentes da matriz extracelular. Alterações estas que podem ser relacionadas a modificações organizacionais e estruturais dos feixes de colágeno, influenciando as propriedades mecânicas do tendão e a evolução para um estado patológico.

Palavras chave: Zucker, Obesidade, Tendão, Diâmetro de fibrilas, Hidroxiprolina

Introdução

A obesidade é considerada hoje uma epidemia mundial (James, *et al.*, 2001), custando aos cofres públicos entre 1% e 7% do total dos custos com saúde, representando um gasto significativo dos orçamentos nacionais (Visscher & Seidell, 2001). Obesidade é definida como um aumento significativo acima do peso ideal, sendo o peso ideal aquele que maximiza a expectativa de vida (Kuczmarski *et al.*, 1994; WHO, 2000). Em humanos, tabelas atuais da World Health Organization (WHO, 2000), a expectativa de vida é reduzida quando o índice de massa corpórea (BMI) indica adiposidade acima dos níveis ideais. A obesidade pode estar relacionada a diferentes causas, como interações entre genes, fatores ambientais e até fatores psicológicos. Dentre esses fatores, os genéticos têm indubitável importância (Kopelman, 2000). Os ratos Zucker (fa/fa) pertencem a uma linhagem de animais em que a obesidade está ligada a um gene autossômico recessivo que codifica um receptor não funcional para o hormônio leptina (Phillips, *at al.*, 1996). Geneticamente obesos, os ratos Zucker (fa/fa) podem expressar muitas características metabólicas em comum com os humanos, como diabetes melitus (tipo II) ligada à obesidade, taxas aumentadas colesterol, triglicérides, insulina e glicemia. Nas primeiras três ou quatro semanas de vida não é possível distinguir os ratos obesos dos magros, mas após a quinta semana de vida essa diferença já pode ser observada (Bray, 1977). Em geral genes ligados à obesidade codificam moléculas que compõem o sistema fisiológico, funcionando na regulação no peso corporal. Um elemento chave nesse sistema é o hormônio leptina, que é produzido pelo tecido adiposo e fornece informações nutricionais para os centros regulatórios no cérebro, como o hipotálamo. Mudanças na concentração de leptina podem também afetar outros sistemas, como o sistema reprodutor e o sistema imune, com impactos até na formação óssea (Friedman & Halaas, 1998). A obesidade pode ser vista como uma doença na qual o excesso de massa gorda é acumulado podendo afetar a saúde de diferentes formas. A obesidade aumenta significativamente o risco de desenvolver problemas de saúde como a hipertensão arterial, problemas respiratórios, diabetes melitus (Tipo II), incidência de certas formas de câncer e doenças do coração (Kopelman, 1994, Sorof and Daniels, 2002). Outras desordens importantes resultantes da sobrecarga de peso estão relacionadas à estrutura corporal, incluindo alterações músculo esqueléticas e osteoartrites das grandes e pequenas articulações (James, 1995).

Os tendões ligam os músculos aos ossos e transmitem a força criada nos músculos aos ossos, tornando possível o movimento articular (Józsa & Kannus, 1997). O colágeno é o principal componente bioquímico dos tendões, representando de 65 a 80% do peso de tecido, sendo o restante representado por células, proteoglicanos e outras proteínas da matriz (Parry, *et al.*, 1978b; Liu *et al.*, 1995). O principal colágeno encontrado nos tendões é o tipo I, embora outros tipos já tenham sido descritos (van der Rest & Garrone, 1991). Durante o desenvolvimento do tendão a fibrilogenese do colágeno gera uma matriz extracelular tendão-específica que determina as propriedades funcionais do tecido (Zhang *et al.*, 2005). As fibrilas de colágeno possuem área de secção transversa circular com distribuição e diâmetro variáveis de tendão para tendão e a proporção de diferentes diâmetros de fibrilas está associada com a força e a elasticidade do tendão (Parry *et al.*, 1978b). O tendão é uma estrutura que se modela de acordo com a demanda mecânica (Vogel & Koob, 1989), de modo que respostas ao estresse mecânico provocam mudanças na organização de componentes de matriz (Woo *et al.*, 1980; Curwin *et al.*, 1988). As propriedades biomecânicas do tendão estão relacionadas à orientação das fibrilas de colágeno, seu diâmetro, organização e ordem molecular (Vidal & Carvalho, 1990). A regulação do desenvolvimento estrutural do tendão, o processo de crescimento linear e lateral das fibrilas e conseqüentemente das propriedades funcionais está relacionada a interação das moléculas de colágeno que formam fibrilas com outros tipos de colágeno que se associam às fibrilas e aos proteoglicanos (Birk *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2005). A interação com as macromoléculas da matriz extracelular provem um mecanismo em que os fibroblastos do tendão regulam essas alterações (Gillard *et al.*, 1979; Vidal, 1993; Zhang *et al.*, 2005). Os tendões tem sido objeto de estudo no envelhecimento (Parry, 1978b; Esquisatto *et al.*, 2007), no envelhecimento de animais que se exercitaram ou não (Cherdchutham *et al.*, 2001, Nakagaki *et al.*, 2007) e sob injúria (Frank *et al.*, 1992; Benevides *et al.*, 2004), porém pouco se sabe sobre o comportamento de tendões de animais obesos. Este trabalho tem como objetivo analisar os tendões de ratos Zucker sob aspectos biomecânicos, bioquímicos e morfológicos.

Materiais e Métodos

Animais

Os ratos machos Zucker (Fa/fa ou Fa/Fa) magros e Zucker (fa/fa) geneticamente obesos foram alimentados com ração normal até cinco meses de idade, quando atingiram peso 140% maior que os magros, sendo considerados indivíduos obesos. Não houve qualquer tipo de exercício adicional sendo, portanto, os animais considerados indivíduos sedentários. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de experimentação animal do Instituto de Biologia – UNICAMP (nº 755-2).

Obtenção do material

O tendão do músculo flexor digital profundo (DDFT), que se origina no músculo flexor digital profundo e se dirige à pata, foi dividido em duas regiões distintas, porção proximal (*p*), onde recebe forças de compressão e porção distal (*d*), a qual compreende uma região do tendão que ramifica em direção aos dígitos, recebendo forças de tensão (Covizi et al., 2000). O DDFT foi retirado em uma só peça para realização do ensaio bioquímico de dosagem de hidroxiprolina e biomecânico e dividido nas duas regiões para determinação do diâmetro das fibrilas e análise imunohistoquímica.

Diâmetro das fibrilas de colágeno

O DDFT durante a dissecação e após a separação das regiões de compressão (C) e tensão (T), foram colocados em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 por 2 horas à temperatura ambiente. O material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e preparado para inclusão em resina Epon 48h à 58°C. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 2% em etanol 50% e citrato de chumbo 0,2% em NaOH 0,1N. Os diferentes materiais foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 (Zeiss) e as imagens capturadas para documentação. Para a medida das fibrilas foram selecionados os cortes mais representativos das regiões C e T. Desses cortes foram obtidas imagens com aumento final = 21.560x, as quais foram capturas digitalmente e analisadas utilizando software ITEM 5.0

(Olympus Soft Imaging System). A imagem da região de interesse foi fixada em uma área de $22,2\mu\text{m}^2$ e cada fibrila foi marcada e seu diâmetro foi mensurado. Para cada região analisada foram medidas mais de 2.000 fibrilas. A partir dessas medidas foram elaborados histogramas da distribuição dos diâmetros das fibrilas e calculado o diâmetro de massa-média (MAD). O MAD foi calculado utilizando a seguinte equação: $\text{MAD} = (\sum [\mathbf{n}_i \times \mathbf{d}_i^3]) / (\sum [\mathbf{n}_i \times \mathbf{d}_i^2])$, onde $\mathbf{n}_i$ é o número de fibrilas com um diâmetro específico e $\mathbf{d}_i$ o diâmetro específico (Lindsey *et al.*, 2005).

Teste mecânico

Para os ensaios mecânicos sob tração uniaxial foram utilizados 8 tendões, sem cortes ou lacerações. Os testes biomecânicos foram realizados de acordo com o descrito por Benevides e colaboradores (2004). Os tendões foram medidos tomando-se o comprimento inicial (L_0) a largura e a espessura com paquímetro. Com as medidas de largura e espessura foi obtida a área de secção transversa (CSA) e com o valor do comprimento inicial e do deslocamento final ($\Delta L = L - L_0$) foi obtida a deformação ($\varepsilon = \Delta L / L_0$, em %). A tensão (σ) foi calculada pela razão da força (N) pela área de secção transversa (mm^2) e expressa em MPa. Para evitar o ressecamento das fibras, durante o ensaio mecânico, os tendões foram mantidos úmidos com solução salina (PBS). As peças foram fixadas em garras metálicas através dos dígitos e do próprio tendão no equipamento de tração (MTS, modelo TESTSTAR II). Cada tendão foi submetido a um aumento gradual de força com velocidade constante de 20mm/min, em célula de carga de 1KN (Tohyama & Yasuda, 2000). Com os dados foram calculadas as médias dos valores máximos de força, deslocamento, tensão e deformação, e também foram construídas curvas de força vs deslocamento e de tensão vs deformação. As curvas foram obtidas da média de cada propriedade mecânica de cada grupo, a partir de uma média da superposição de curvas de cada espécime. O módulo elástico que indica a rigidez do tecido foi obtido de cada grupo através da inclinação da porção linear da curva tensão-deformação de cada amostra (Gupte *et al.*, 2002). Os testes foram realizados no Laboratório de Propriedades Mecânicas na Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP.

Quantificação de hidroxiprolina

A determinação do conteúdo de hidroxiprolina, que é proporcional à concentração de colágeno, foi baseada em Stegemann and Stalder (1967). Os tendões, de 5 diferentes animais, foram mantidos inteiros e hidrolisados em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 4h a 130°C. As amostras foram preparadas da seguinte maneira: 5µL do material hidrolisado; 1 mL de solução de cloramina T, após 20min foi adicionado 1mL de solução de ácido perclórico/aldeído e incubadas por 15 min a 60 °C, resfriadas e lidas em 550nm.

Imunohistoquímica

Cortes do tendão em congelamento de 10 µm foram fixados em paraformaldeído 4% e incubados em peróxido de hidrogênio 3% para bloquear a peroxidase endógena. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com BSA 3% em PBS 0,05 M pH 7,4. Os cortes foram incubados no anticorpo primário, para colágeno do tipo III (Chemicon – AB757 rat collagen type III), diluído 1:100 em BSA 1% em PBS 0,05 M pH 7,4 à 4°C overnight. O material foi então lavado, incubado com o anticorpo secundário (Zymed - 81-6120 goat anti rabbit IgG, H+L, HRP conjugate) diluído 1:200 durante 1h e a revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB).

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) One-Way, seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância.

Resultados

As regiões de tensão e de compressão do DDFT dos animais obesos apresentaram distribuição unimodal das fibrilas de colágeno enquanto que as mesmas regiões do tendão dos

animais magros possuem uma distribuição bimodal (Figura 1 e Tabela 1). O diâmetro de massa-média (MAD) calculado se apresentou maior nos animais magros nas duas regiões analisadas do tendão, tensão e compressão, quando comparado com os animais obesos (tabela 2). A análise biomecânica do DDFT dos animais obesos e magros (tabela 3) mostra que houve diferença significativa com relação ao deslocamento máximo e a deformação máxima. Analisando os gráficos de força vs deslocamento e tensão vs deformação (Figuras 2 a e b, respectivamente) pode ser observado que a “toe region” assim como a região que corresponde a região elástica, em ambos os gráficos, não apresentam diferença quando são comparados os animais obesos e magros. Por outro lado analisando a região plástica nos gráficos, os animais obesos apresentam deslocamento e deformação maiores quando comparado com os animais magros (figura 2). Na tabela 4 estão resumidos os dados da dosagem de hidroxiprolina. Os animais obesos apresentaram o conteúdo de hidroxiprolina maior quando comparado com os animais magros ($p < 0.05$). Os testes imunohistoquímicos demonstraram a presença de colágeno do tipo III nos tendões dos animais magros e obesos, não sendo observadas diferenças entre os animais e as diferentes regiões do tendão (figura 3).

Discussão

A obesidade leva a uma série de alterações metabólicas que sabidamente estão relacionadas a muitas patologias que afetam a população mundial. O aumento de massa gorda é acompanhada por profundas mudanças nas funções fisiológicas como: alterações no volume de sangue, das funções cardíacas, respiratórias, desenvolvimento de hipertensão, elevação da concentração de insulina no plasma e resistência à insulina, diabetes Mellitus, hiperlipidemia e câncer (Kopelman, 2000; Sorof & Daniels, 2002).

Estudos onde é analisado o efeito do exercício sobre tendões sempre comparam os grupos exercitados ou não, muitas vezes submetidos a protocolos particulares de treinamento já realizados em ratos (Nielsen *et al.*, 1998), aves (Buchanan & Marsh, 2001), cavalos jovens (Cherdchutham *t. al.*, 2001), porcos (Woo *et al.*, 1980), coelhos (Viidik, 1969) e em humanos (Rosager *et al.*, 2002), assim como em frangos que praticaram o exercício espontâneo ou não (Benevides *et al.*, 2004; Nakagaki *et al.*, 2007). Os animais analisados foram considerados sedentários, porém ambos os grupos possuem atividade física diferenciada ao longo de seu desenvolvimento. Os animais magros (controle) se movimentam normalmente dentro das

gaiolas, enquanto a atividade física dos obesos é reduzida, permanecendo em decúbito ventral a maior parte do tempo e se movimentam a procura de alimento e água. Em função dessa situação, o estímulo nos tendões dos animais magros é constante, o que não acontece nos animais obesos. A organização tecidual, estabilidade e as características mecânicas são determinadas pela estrutura e organização das fibras de colágeno, que contribuem significativamente para as propriedades mecânicas dos tendões e ligamentos é o colágeno (Viidik, 1996). As propriedades mecânicas dos tendões são dependentes de vários fatores incluindo orientação das fibrilas e fibras de colágeno, assim como seu comprimento e diâmetro (Birk *et al.*, 1997) enquanto as propriedades físicas dos tendões dependem das ligações cruzadas intra e intermoleculares (Parry, 1988; Haut *et al.*, 1992). As moléculas de colágeno apresentam a formação dessas ligações cruzadas que conferem ao tendão maior força de tensão. Do nascimento ao envelhecimento as propriedades mecânicas dos tendões sofrem modificações com relação a sua eficiência na função desempenhada, assim como patologias relacionadas ao próprio tendão (Silver *et al.*, 2000).

O diâmetro das fibrilas de colágeno sofre alterações com a idade (Parry *et al.*, 1978b, Birk & Mayne 1997), com o exercício (Culav *et al.*, 1999; Cherdchutham *et al.*, 2001), privação de estresse (Nakagawa *et al.*, 1989), e a cicatrização (Frank *et al.*, 1992, Eriksen *et al.*, 2002). A distribuição das fibrilas de colágeno assim como o diâmetro pode variar de tendão para tendão, onde se observa que a distribuição dessas fibrilas, nos tendões de animais jovens, é unimodal e com a maturidade passam a apresentar um padrão bimodal (Parry *et al.*, 1978a, b). A reestruturação das fibrilas de colágeno de uma distribuição unimodal para bimodal como um fenômeno induzido pelo exercício foi observado em tendão flexor digital superficial em potros, mostrando que animais confinados que não se exercitaram apresentaram distribuição unimodal enquanto os exercitados uma distribuição bimodal (Cherdchutham *et al.*, 2001). Nossos resultados mostram que nos animais magros há duas populações de fibrilas independente da região analisada (compressão ou tensão) podendo ser resultado do estímulo, mesmo que limitado, recebido pelo tendão enquanto que a distribuição unimodal nos animais obesos pode ser reflexo da ausência de movimento dos animais devido ao sobrepeso.

Em tendão bovino foi observado que com a maturação os tendões apresentam a transição de um padrão de distribuição unimodal para bimodal, que está presente em ambas as

regiões, embora seja mais evidente em regiões que sofrem predominante forças de tensão (Evanko and Vogel, 1990).

A presença de diferentes populações de fibrilas em tendões de animais adultos pode estar relacionada com diferentes funções. As fibrilas maiores seriam essenciais para que o tendão resistisse às forças de tensão. Na remodelação do tendão ocorre o aparecimento de fibrilas com diâmetros menores, indicando a produção de novas fibrilas (Shino *et al.*, 1995; Cherdchutham *et al.*, 2001).

O colágeno do tipo III durante o desenvolvimento e a cicatrização de tecidos tem como principal função atuar na força mecânica da matriz recém formada (Culav *et al.*, 1999). Nos tendões o aumento do conteúdo de colágeno do tipo III está relacionado à formação de finas fibrilas, com diminuição na força de tensão máxima e também já foi relacionado à ruptura total de tendões (Eriksen *et al.*, 2002). Birk e Mayne (1997) demonstraram que o aumento do diâmetro das fibrilas de colágeno está associado com a diminuição das fibrilas finas de colágeno do tipo III. Os diferentes grupos de fibrilas, com diâmetros maiores e menores, observados nos animais obesos e magros, devem ser constituídos principalmente por moléculas de colágeno dos tipos I e III. Essas moléculas tendem a se associar formando fibras (Fleischmajer *et al.*, 1990) e interagindo para atuar na regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno (Birk *et al.*, 1990).

O diâmetro maior das fibrilas possibilitaria uma maior concentração de ligações cruzadas covalentes quando comparadas com as fibrilas menores, pois essas fibrilas apresentam baixa relação área de superfície/volume (Parry *et al.*, 1978a). As fibrilas finas estariam relacionadas à elasticidade, pois possuem uma quantidade relativamente grande de ligações cruzadas não covalentes entre o colágeno e a matriz (Parry *et al.*, 1978b).

Os animais obesos apresentam alteração na distribuição de fibrilas de colágeno, apresentam MAD reduzido e distribuição unimodal quando comparados com os magros, sugerindo que o tendão dos animais obesos permanece como uma estrutura imatura.

A redução do MAD já foi relacionada aos micro-traumas causados pelo exercício excessivo, que eventualmente pode resultar em lesões degenerativas, como observado no tendão flexor digital superficial de cavalos adultos (Paterson-Kane, 1998). Em ratos foi observado que o desuso, em tendão de Aquiles, diminuiu o diâmetro médio das fibrilas de colágeno (Nakagawa *et al.*, 1989). Apesar de não utilizarmos nenhum protocolo de

treinamento e considerarmos os animais sedentários acreditamos que o tendão dos animais obesos foi submetido a uso extremo periódico com intervalos de inatividade, respondendo a esses estímulos com alterações na matriz extracelular. O MAD leva em conta o fato que o número reduzido de fibrilas com diâmetro maior de colágeno contribui significativamente à resistência à tração. Assim quanto maior o MAD maior será a força de tensão que o tendão é capaz de suportar. O MAD aumenta desde o nascimento até a maturidade e acredita-se que esse crescimento está relacionado aos estímulos mecânicos sofridos pelo tendão (Lindsey *et al.*, 2005). Além disso, em tendão calcâneo humano foi observado que o MAD aumenta durante a maturação e depois disso diminui com idade, como resultado da remodelação de fibrilas maiores (Strocchi *et al.*, 1991). Geralmente os estudos relacionam a mudança no diâmetro das fibrilas de colágeno com alteração das propriedades biomecânicas do tendão (Parry *et al.*, 1978b; Nakagawa *et al.*, 1989), no entanto a importância do diâmetro das fibrilas de colágeno para a resistência biomecânica do tendão já foram questionadas por estudos realizados em tendão de cauda de rato, que demonstraram não ser somente a distribuição do diâmetro das fibrilas de colágeno que determinam as propriedades estruturais e biomecânicas do tendão (Derwin *et al.*, 2001; Lavagnino *et al.*, 2005). As alterações mecânicas que acontecem do nascimento à maturidade nos tendões são provavelmente resultado do aumento do conteúdo de colágeno assim como no número de ligações cruzadas entre moléculas de colágeno (Shadwick, 1990).

Nossos resultados mostraram que os animais obesos apresentaram valores para deslocamento e deformação maiores quando comparados com os animais magros. Esses resultados podem estar relacionados à população de fibrilas encontrada nos obesos. Apesar do tendão dos animais obesos aparentemente possuírem maior resistência à ruptura, eles se apresentaram menos resistentes a tração, deformando mais com valor menor de tensão.

O conteúdo maior de hidroxiprolina nos tendões dos obesos pode ter ocorrido para suprir a demanda mecânica requerida, que mesmo sendo em períodos reduzidos pode ocorrer. É possível que a presença de ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno seja semelhante entre os grupos analisados. O aumento da rigidez do tendão pode estar relacionado com o aumento na síntese de colágeno e o aumento no número de ligações cruzadas. Em porcos (Woo *et al.*, 1980) e frangos (Benevides *et al.*, 2004) foi observado que tendões que

apresentaram os valores de hidroxiprolina aumentados possuíam maior força de tensão com menor deformação, quando comparados com os controles.

De acordo com os dados obtidos podem estar ocorrendo alterações no metabolismo dos tendões, na produção de colágeno e formação das ligações cruzadas. Além disso, pôde ser observado que há uma variação nas características mecânicas dos tendões quando comparamos o DDFT de ratos machos Zucker (Fa/fa ou Fa/Fa) magros e Zucker (fa/fa) geneticamente obesos.

Uma possibilidade que não está sendo descartada é a influência da ausência da ação do hormônio leptina, que pode estar causando alterações metabólicas nos ratos obesos, que não possuem o gene para receptores funcionais desse hormônio.

A leptina age em receptores no sistema nervoso central inibindo a ingestão de alimento e promovendo o gasto de energia (Rahmouni & Haynes, 2001), em tecidos periféricos promove a distribuição do combustível metabólico a ser utilizado (Muoio et al., 1997). No tecido muscular a leptina muda a fonte da qual o ATP é gerado, de carboidrato para lipídeo (Reidy & Weber, 2000). Em humanos, os efeitos da leptina no metabolismo dos ácidos graxos na musculatura esquelética são atenuados nos indivíduos obesos em comparação com os magros (Steinberg et al., 2002).

A função e ação desse hormônio são pouco conhecidas, porém se sabe que ele está envolvido na regulação de muitos sistemas fisiológico, incluindo o reprodutivo, o sistema imune, formação óssea, maturidade física e sexual (Friedman & Halaas, 1998). Novas descobertas da influência da obesidade e do papel da leptina podem ajudar na compreensão das alterações ocorridas nos tendões de ratos obesos com ausência desse hormônio.

Agradecimentos

Dr. Eliane B. Ribeiro Departamento de Fisiologia e Biofísica - Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo) pelo fornecimento dos animais utilizados nesse trabalho e a FAPESP pela bolsa e auxílio concedidos (Processo 04/14358-5).

Referências

- Benevides, G.P., Pimentel, E.R., Toyama, M.H., Novello, J.C., Marangoni, S., Gomes, L. (2004). Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect. Tissue Res.* 45:206-215.
- Birk, D.E., Fitch, J.M., Babiarz, J.P., Doane, K.J., Linsenmayer, T.E. (1990). Collagen fibrillogenesis *in vitro*: Interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J. Cell Sci.* 95: 649-657.
- Birk, D.E., Nurminkaya, M.V., Zycband, E.I. (1995). Collagen fibrillogenesis *in situ*: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev. Dyn.* 202:229-243.
- Birk, D.E., Mayne, R. (1997). Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur. J. Cell Biol.* 72: 352-61.
- Birk, D. E., Zycband, E. I., Woodruff, S., Winkelmann, D. A, Trelstad, R. L. (1997). Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Dev. Dynam.*, 208:291-298.
- Bray, G.A. (1977). The Zucker-fat rat: a review. *Fed. Proc.* 36:148-153.
- Buchanan, C.I., Marsh, R.L. (2001). Effects of long-term exercise on the biomechanical properties of the Achilles tendon of guinea fowl. *J. Appl. Physiol.* 90:164-171.
- Cherdchutham, W., Meershoek, L.S., van Weeren, P.R., Barneveld, A. (2001). Effects of exercise on biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon in foals. *Am. J. Vet. Res.* 62:1859-1864.
- Culav, E. M., Clarck, C.H. Merrilees M. J. (1999). Connective tissue: Matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys. Ther.*, 79: 308-319.
- Curwin, S.L., Vailas, A.C., Wood, J. (1988). Immature tendon adaptation to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* 65:2297-2301.
- Covizi D.Z., Felisbino S.L., Gomes L., Pimentel E.R., Carvalho H.F. (2001). Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue & Cell*, 33: 483-490.
- Derwin, K.A., Soslowsky, L.J., Kimura, J. H., Plaas, A. H. (2001). Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structure in the mouse tail tendon fascicle. *J. Orthop. Res.* 19:269-277.
- Eriksen, H. A., Pajala, A., Leppilahti, J., Risteli, J. (2002). Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J. Orthop. Res.* 20: 1352-1357.

Evanko, S.P., Vogel, K.G. (1990). Ultrastructure and proteoglycan composition in the developing fibrocartilaginous regions of bovine tendon. *Matrix*, 10: 420-436.

Esquisatto M.A.M., Joazeiro, P.P., Pimentel, E.R., Gomes, L. (2007). The effect of age on the structure and composition of rat tendon fibrocartilage. *Cell Biology International* 31: 570-577.

Fleischmajer, R., Perlish, J.S., Burgeson, R.E., Shaikh-Bahai, E., Timpl, R. (1990) Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 580: 161-175.

Frank, C., McDonald, D., Bray, D., Bray, R., Rangayyan, R., Chimich, D., Shrive, N. (1992). Collagen Fibril Diameters in the Healing Adult Rabbit Medial Collateral Ligament. *Connect. Tissue Res.* 27:251-263.

Friedman, J.M., Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.

Gillard, G.C., Reilly, H.C., Bell-Booth, P.G., Flint, M.H. (1979). The influence of mechanical forces on the glycosaminoglycans content of the rabbit flexor digitorum profundus tendon. *Connect. Tissue Res.* 7:37-46.

Gupte, C.M., Smith, A., Jamieson, N., Bull, A.M.J., Thomas, R.W. D., Amis, A.A. (2002). Meniscomfemoral ligaments-structural and material properties. *J. Biomech.* 35:1623-1629.

Haut, R. C., Lancaster, R. L., DeCamp, C. E. (1992). Mechanical properties of the canine patellar tendon: some correlations with age and the content of collagen. *J. Biomech.* 25:163-73.

James, W.P. (1995). A public health approach to the problem of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 3: 37-45.

James, P. T., Leach R., Kalamara, E., Shayeghi, M. (2001). The Worldwide Obesity Epidemic. *Obes. Res.* 9:S228-S233.

Józsa, L. G., Kannus, P. (1997). *In Human tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*, pp. 46-95, Human Kinetics, Champaigne.

Kopelman, P.G. (1994). Causes and consequences of obesity. *Med. Int.* 22:385-388.

Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.

Kuczmarski, R., Flegal, K., Campbell, S., Johnson, C. (1994). Increasing prevalence of overweight among US adults. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 205-211.

- Lavagnino, M., Arnoczky, S.P., Frank, K., Tian, T. (2005). Collagen fibril diameter distribution does not reflect changes in the mechanical properties of in vitro stress-deprived tendons. *J. Biomech.* 38:69-75.
- Lindsey, J., Edwards, J., Allen, E., Helen, L. (2005). Effect of exercise on age-related changes in collagen fibril diameter distributions in the common digital extensor tendons of young horses. *Am. J. Vet. Res.* 66:564-568.
- Liu, S.H., Yang, R.S., Shaikh, R., Lane, J.M. (1995). Collagen in tendon, ligament and bone healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 318:265-278.
- Muoio, D.M., Dohm, G.L., Fiedorek Jr., F.T., Tapscott, E.B., Coleman, R.A., (1997). Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46: 1360-1363.
- Nakagaki, W. R., Biancalana A., Benevides, G. P., 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.
- Nakagawa, Y., Totsuka, M., Sato, T., Fukuda, Y., Hirota, K. (1989). Effect of disuse on the ultrastructure of the achilles tendon in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 59:239-242.
- Nielsen, H.M., Skalicky, M., Viidik, A. (1998). Influence of physical exercise on aging rats. III. Life-long exercise modifies the aging changes of the mechanical properties of limb muscle tendons. *Mech. Ageing Dev.*, 100:243-260.
- Parry, D.A.D., Craig, A.S., Barnes, G.R.G. (1978a). Tendon and ligament from the horse: an ultrastructural study of collagen fibrils and elastic fibres as a function of age. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 203:293-303.
- Parry, D.A.D., Barnes, G.R.G., Craig, A.S. (1978b). A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 203:305-321.
- Parry, D.A.D. (1988). The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys Chem.*, 29:195-209.
- Patterson-Kane, J.C., Wilson, A.M., Firth, E.C., Parry, D.A.D., Goodship, A.E. (1997). Comparison of collagen fibril populations in the superficial digital flexor tendons of exercised and nonexercised Thoroughbreds. *Equine vet. J.* 29:121-125.
- Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. J., Hess, J. F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetics* 13: 18–19.
- Rahmouni, K., Haynes, W. G. (2001). Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins. *Bio. Essays* 23: 1095-1099.

- Reidy, S. P., Weber, J. M. (2000). Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 125: 285-297.
- Rosager, S., Aagaard, P., Dyhre-Poulsen, P., Neergaard, K., Kjaer, M., Magnusson, S. P. (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.
- Shadwick, R.E. (1990). Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. *J. Appl. Physiol.*, 68:1033-1040.
- Shino, K., Oakes, B. W., Horibe, S., Nakata, K., Nakamura, N. (1995). Collagen fibril oopulations in human anterior cruciate ligament allografts. *Am. J. Sports Med.* 23:203-209.
- Silver, F. H., Christiansen, D. L., Snowhill, P. B., Chen, Y. (2000). Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self - assembled collagen fibers. *Connect. Tissue Res.* 41:155-164.
- Sorof, J., Daniels, S. (2002). Obesity Hypertension in Children: A Problem of Epidemic Proportions. *Hypertension* 40:441-447.
- Stegemann, H., Stalder, K. (1967). Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta* 18:267-273.
- Steinberg, G.R., Parolin, M.L., Heigenhauser, G.J.F., Dyck, D.J. (2002). Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am. J. Physiol.* 28: E187-E192.
- Strocchi, R., Pasquale, V., Guizzardi, S. (1991). Human Achilles tendon: morphological and morphometric variations as a function of age. *Foot Ankle*, 12:100–104.
- Tohyama, H., Yasuda, K. (2000). The effects if stress enhancement on the extraceclular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J. Biomech.* 33:559-565.
- WHO (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization.
- Woo, S.L., Ritter, M.A., Amiel, D., Sanders, M., Gomez, M.A., Kuei, S.C., Garfin, S.R., Akeson, W.H. (1980). The biomechanical and biochemical properties of swine tendonslong-term effects of exercise on the digital extensors. *Connect. Tissue Res.* 7:177-183.
- van der Rest, M., Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5:2814-2823.
- Viidik, S. (1969). Tensile strength properties of Achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 40:261-272.
- Viidik A. (1996). Tendons and ligaments. In: Comper W. D. Extracellular matrix: Tissue function. Volume 1, Amsterdam, Cap 10. p. 303-327.

Vidal, B.C., Carvalho, H.F. (1990). Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. *Matrix*, 10:48-57.

Vidal, B.C. (1993). Cell and extracellular matrix interaction: a feedback theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Rev. Fac.Ciên. Med. Unicamp*, 4:11–14.

Vischer, T. L. S., Seidell J. C. (2001). The public health impact of obesity. *Annu. Rev. Public Health* 22: 355-375.

Vogel, K.G., Koob, T.J. (1989). Structural Specialization in Tendons under Compression. *Int. Rev. Cytol.* 115:267-293.

Zhang, G., Young, B.B., Ezura, Y., Favata, M., Soslowsky, L.J., Chakravarti, S., Birk, D.E. (2005). Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 5:5-21.

Figuras e legendas

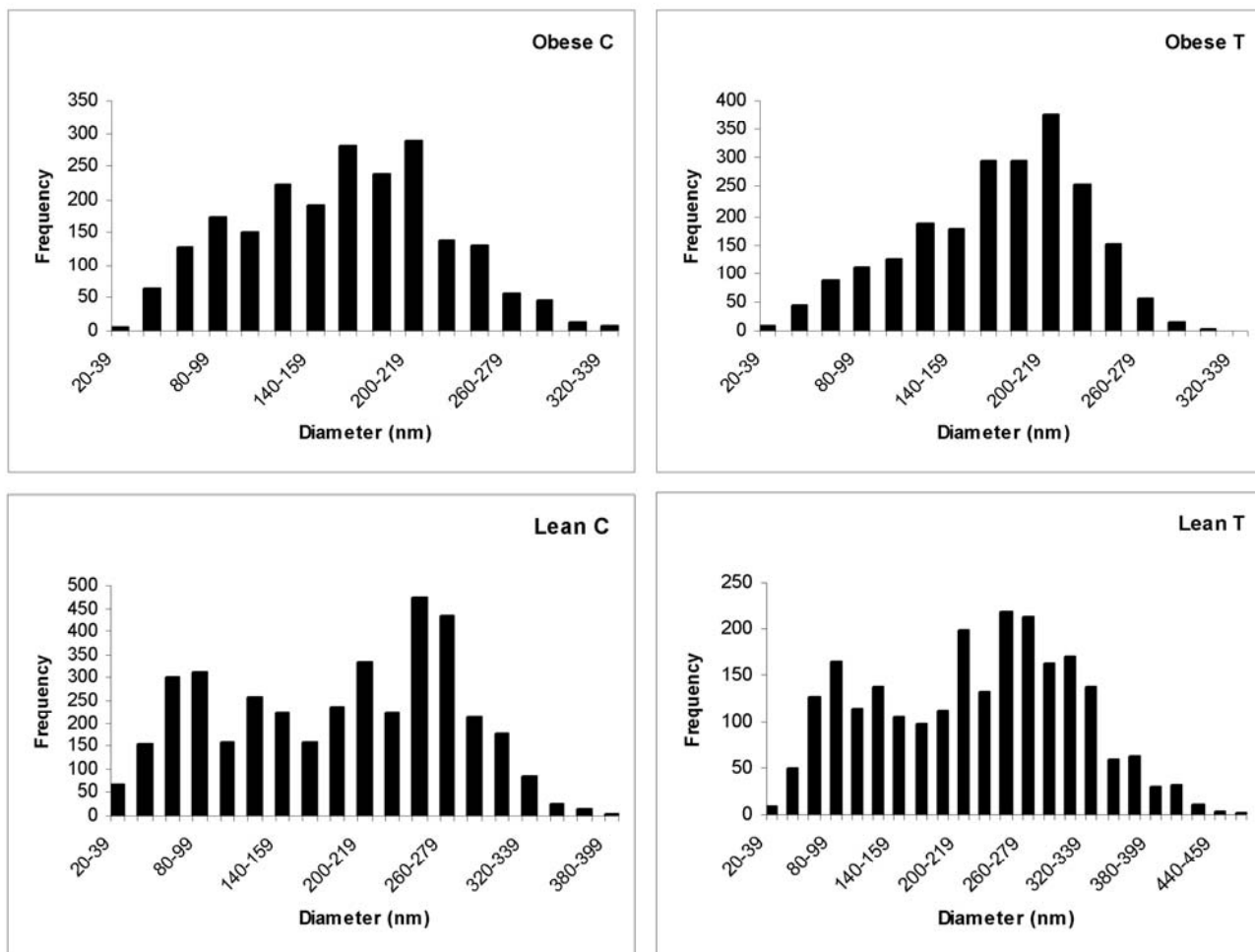


Fig 1: Histogramas da distribuição do diâmetro das fibrilas de colágeno, dos animais obesos e magros, na região de compressão (C) e tensão (T) do DDFT.

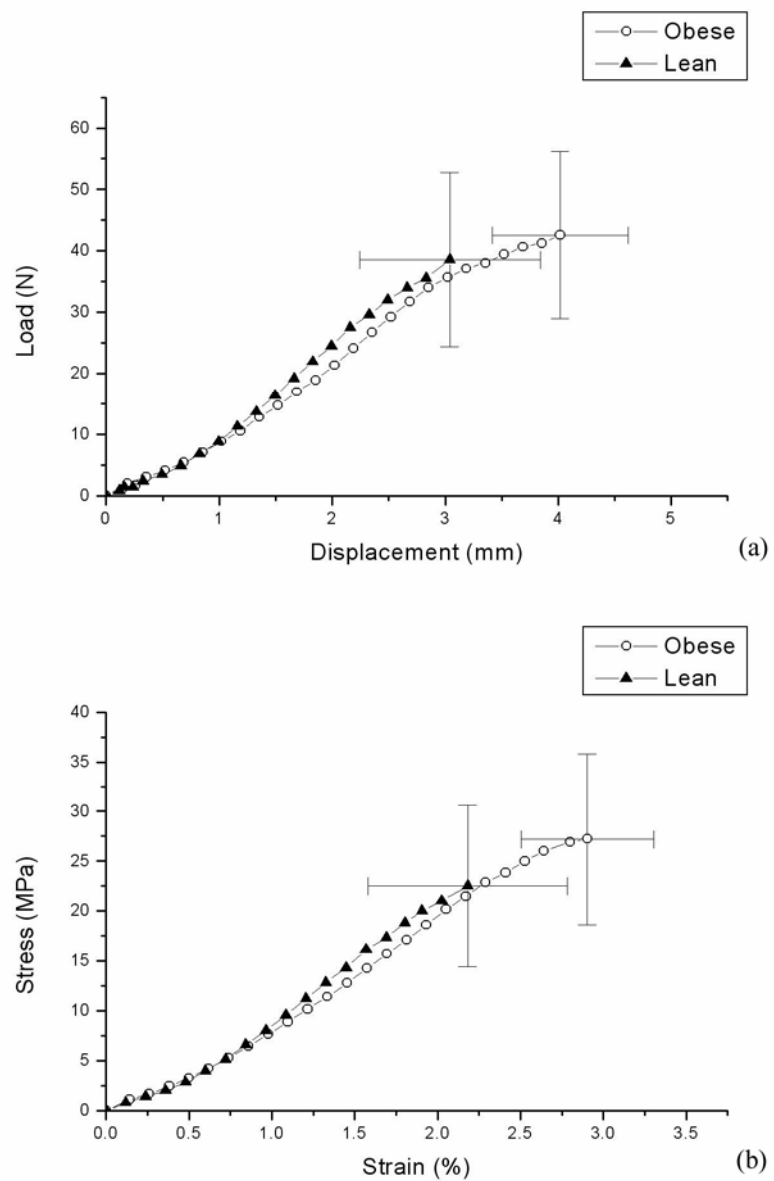


Fig 2: Gráfico de força vs deslocamento (a) e tensão vs deformação (b) do DDFT dos animais obesos e magros.

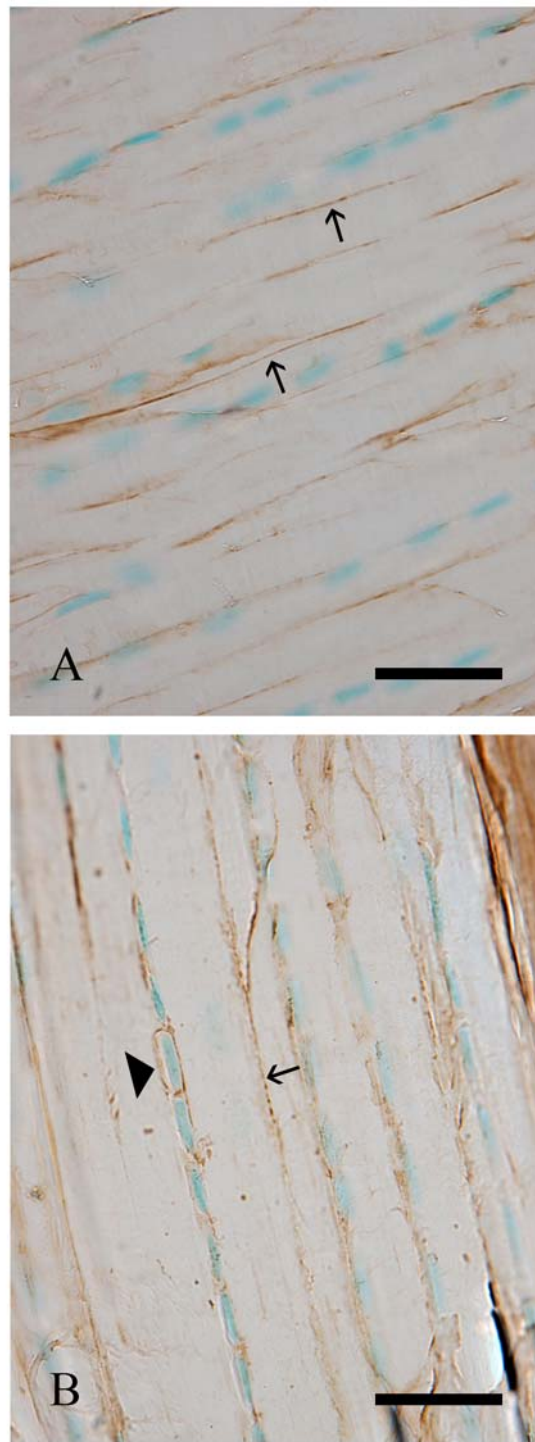


Fig 3: Imunolocalização para colágeno do tipo III em animais obesos (A) e magros (B). Entre as fibras de colágeno do tipo I podem ser observadas as do tipo III (→) e próximo aos núcleos (◄). Barra: 25 µm.

Tabelas

Tabela 1 - Número de fibrilas analisadas (n) e diâmetro médio de cada diferente região do tendão de animais obesos e magros.

Animal	Região de Compressão		Região de tensão	
	obeso	magro	obeso	magro
n	2134	2842	2191	2352
Diametro médio (nm)	166,24±60,9	189,84±84,52	173,39±54,7	219,78±94,0

Tabela 2 - Diâmetro de massa-média (MAD) das diferentes regiões do DDFT de animais obesos e magros (* p<0.05).

Animal/região	MAD	
	Compressão *	Tensão *
obeso	197.09 ± 32.7	185.18 ± 27.7
magro	240.75 ± 10.9	251.47 ± 36.3

(* - significante p< 0.05)

Tabela 3 - Média e desvio padrão das propriedades mecânicas do DDFT(* p<0.05).

Animal	Força Máxima (N)	Deslocamento Máximo (mm) *	Tensão Máxima (MPa)	Deformação Máxima (%) *	Módulo Elástico (MPa)	CSA (mm ²)
obeso	42.58 ± 13.6	4.05 ± 0.6	27.21 ± 8.6	2.9 ± 0.4	116.97 ± 34.5	1.55 ± 0.3
magro	38.56 ± 14.2	3.04 ± 0.8	22.52 ± 8.1	2.2 ± 0.6	137.88 ± 24.3	1.69 ± 0.1

(* - significante p< 0.05)

Tabela 4 - Quantificação de hidroxiprolina (mg/ g de tecido úmido) (* p<0.05).

Animal	Tendão (mg/g)
obeso	15.72 ± 1.6
magro	12.06 ± 1.0

(* - significante p< 0.05)

Conclusões

- A obesidade provocou alteração na estrutura, distribuição e diâmetro das fibrilas de colágeno, assim como nas propriedades biomecânicas.
- A obesidade alterou a constituição dos componentes da matriz extracelular do DDFT, em especial a quantidade dos glicosaminoglicanos, hidroxiprolina e proteínas não colagênicas.

Conclusão geral

A obesidade influencia a constituição e organização dos componentes da matriz extracelular do DDFT. Essas alterações podem estar relacionadas a modificações organizacionais e estruturais dos feixes de colágeno, influenciando as propriedades mecânicas do tendão e podendo evoluir para um estado patológico.