

LETÍCIA PRADO DE OLIVEIRA

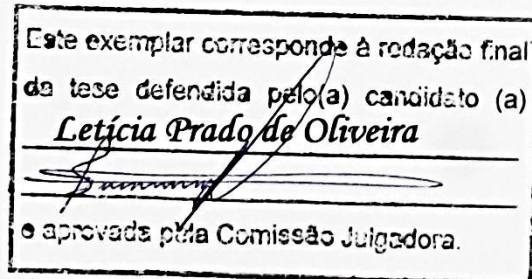
**EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ESTATINAS
EM TENDÃO CALCANEAR DE RATOS**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA PRADO DE OLIVEIRA

“EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ESTATINAS
EM TENDÃO CALCANEAR DE RATOS”



Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da UNICAMP
para obtenção do Título de Mestra
em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

OL4e Oliveira, Leticia Prado de, 1988-
Efeito do tratamento crônico com estatinas em tendão calcanear de ratos / Leticia Prado de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Tendão calcanear. 2. Simvastatina. 3. Atorvastatina. 4. Tratamento. I. Pimentel, Edson Rosa, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em Inglês: Effect of chronic treatment with statins in rat Achilles tendon

Palavras-chave em Inglês:

Achilles tendon

Simvastatin

Atorvastatin

Treatment

Área de concentração: Histologia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Edson Rosa Pimentel [Orientador]

Antonella Sachsida Braga Vilela

Juliana Castro Monteiro

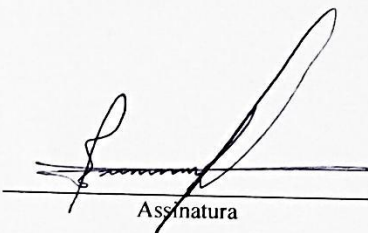
Data da defesa: 28-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 28 de fevereiro de 2013

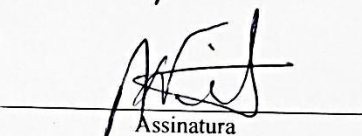
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



Assinatura

Profa. Dra. Antonella Sachsida Braga Vilela



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Castro Monteiro



Assinatura

Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marreto Esquisatto

Assinatura

Dedico esta dissertação aos meus pais Reginaldo e Helena que sempre lutaram para que eu chegasse até aqui. À minha querida tia-madrinha Maria Helena que nunca mediu esforços para ajudar em meus estudos. À minha irmã Thaís, motivo de muitas alegrias em minha vida. Obrigada família por ser meu alicerce, pelo amor incondicional, por me apoiarem em tudo e pela presença constante em minha vida.

*"Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se
tornam reais. Sonhe, trace metas,
estabeleça prioridades e corra riscos para
executar seus sonhos. Melhor é errar por
tentar do que errar por omitir!" Augusto
Cury*

Agradecimentos

A Deus por sempre me iluminar, por realizar muitas bênçãos em minha vida e por me conceder mais esta vitória.

Ao Professor Edson Rosa Pimentel que, com carinho, aceitou a tarefa de me orientar, pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos passados, por ser um exemplo de pessoa e de mestre.

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram-me dadas provas de amizade por pessoas que muito procuraram me ajudar e incentivar, e aos quais muito devo: Cristiano Pedrozo Vieira e Flávia da Ré Guerra. Agradeço não apenas pelo auxílio durante a escrita do projeto, dissertação e execução dos experimentos no laboratório, mas também pela amizade, pelos momentos divertidos que passamos juntos! Vocês fizeram com que eu me sentisse acolhida aqui em Campinas, participando da minha vida acadêmica e pessoal, me ensinando, aconselhando e motivando em todos os momentos. Quero levar nossa amizade por toda vida!

À Mayara Lustosa de Oliveira, amiga com quem tenho o privilégio de morar junto. Não dividimos apenas um teto, mas também momentos, emoções e experiência de vida. Obrigada por tornar mais fáceis tantos desafios que o mestrado trouxe, por me fazer refletir, por me dar bons conselhos, por me deixar mais calma e confiante. Com você eu aprendi muito!

Ao Marcos dos Santos Almeida pela colaboração, pelas sugestões e cuidadosa revisão de meus resultados.

À Haline Bellestero Fêo, pelos bons momentos vividos dentro e fora do laboratório e também pela aprendizagem que compartilhamos ao longo das disciplinas que cursamos juntas.

À Andrea Aparecida de Aro sempre disposta a ajudar e a tirar minhas dúvidas, seu conhecimento e seus ensinamentos foram de grande importância para minha formação.

Ao técnico Francisco Ângelo Mallatesta por seu apoio durante a realização dos experimentos, por sua prontidão e disponibilidade de fornecer explicações minuciosas de diversas técnicas realizadas em nosso laboratório.

Ao meu namorado Antônio Augusto Moreira Pinto Júnior pelo amor, carinho e compreensão com que me acompanhou, por me ajudar na correção da dissertação, por todo incentivo que me deu desde quando decidi fazer o mestrado.

À Viviane Nogueira de Paiva, minha amiga de longa data, obrigada por estar sempre comigo desde quando eu vim para Campinas, por nossas longas conversas no MSN, por tornar divertidos e menos complicados momentos de angústia que passamos ao longo do mestrado. Com certeza eu deixei um pedacinho de mim aí em Alfenas. Quanta saudade de você!

À Antonella Sacshida Braga-Vilela que sempre gostei de chamar de minha mãe científica! Você foi a grande incentivadora de minha vontade de pesquisar e guiou meus primeiros passos quando iniciei minha vida acadêmica. Obrigada por ser tão atenciosa e pelos saberes que me foram transmitidos!

A todos integrantes do laboratório de biologia reprodutiva.

À secretária do programa de pós-graduação, Líliam Alves Senne Panagio pela competência, agilidade e disposição para ajudar em todos os momentos.

Aos docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional.

Aos membros da banca pela atenção, disponibilidade e por aceitarem o convite.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido ao longo deste trabalho.

Ao auxílio financeiro da CAPES/PROAP.

Ao Programa de Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural.

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Anatomia do tendão calcâneo.....	15
1.2 Características estruturais e bioquímicas do tendão.....	15
1.3 Estatinas.....	20
1.4 Efeitos adversos das estatinas.....	22
2. OBJETIVOS	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
4. ARTIGOS	31
Artigo 1: Statins induce biochemical changes in the Achilles tendon.....	32
Artigo 2: Alterações estruturais e biomecânicas em tendão calcâneo de ratos após tratamento com estatinas.....	57
5. CONCLUSÕES	78

RESUMO

As estatinas, inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase, são fármacos utilizados para o tratamento de hipercolesterolemia - níveis elevados de colesterol no sangue. Embora sejam considerados medicamentos seguros e eficazes, possuem inúmeros efeitos adversos como, por exemplo, miopatias e hepatopatias. Além disso, há relatos de lesões em tendões associadas ao uso destes medicamentos e os mecanismos responsáveis por este efeito adverso não estão bem esclarecidos. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar as possíveis alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais no tendão calcâneo de ratos após tratamento crônico com estatinas. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: tratados com a atorvastatina (A-20 e A-80), sinvastatina (S-20 e S-80), carboximetilcelulose utilizado como o veículo (V) e um grupo que não recebeu tratamento (ST). As doses de atorvastatina e sinvastatina foram calculadas utilizando extrapolação alométrica com base nas doses de 20mg/dia e 80 mg/dia, recomendadas para os seres humanos. Os ratos foram sacrificados após dois meses de tratamento e os tendões foram coletados para análises morfológicas, bioquímicas e funcionais. Para as análises morfológicas em microscopia de luz os cortes de tendões foram corados com Hematoxilina-eosina e Azul de Toluidina. Foram realizadas medidas de birrefringência através da microscopia de polarização. Para análises bioquímicas, os tendões foram processados e analisados de acordo com as seguintes técnicas: eletroforese em gel de agarose para análise de glicosaminoglicanos sulfatados; zimografia para detecção de metaloproteinases (MMPs) dos tipos -2 e -9; Western Blotting para colágeno I, dosagem de proteínas não-colagênicas, glicosaminoglicanos e hidroxiprolina. Os tendões também foram submetidos a testes biomecânicos. Todos os resultados foram analisados utilizando ANOVA-one-way, seguida pelo teste de Tukey, com exceção dos dados de birrefringência, que foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. A concentração de proteínas não-colagênicas em todos os grupos tratados com estatinas foi menor em relação ao grupo V. Houve um aumento significativo de pro-MMP-2 no grupo A-80 e MMP-2 ativa em S-20 comparado ao grupo ST. Foi observado também um aumento significativo de pro-MMP-9 nos grupos A-80 e S-20 e um aumento de MMP-9 ativa no grupo A-20 em relação ao grupo ST. O grupo A-20

apresentou menor quantidade de colágeno I quando comparado ao grupo ST e no grupo S-20 foi observada uma maior concentração de hidroxiprolina em relação aos grupos ST e V. A dosagem de glicosaminoglicanos mostrou um aumento significativo no grupo A-20 e o grupo S-80 apresentou menor concentração deste componente em relação ao grupo ST e V respectivamente. As medidas de birrefringência dos grupos A-20, A-80 e S-80 revelaram um menor grau de organização das fibras de colágeno nestes grupos em relação ao grupo V. Durante os ensaios biomecânicos os tendões dos grupos A-20, A-80 e S-20 foram menos resistentes à ruptura quando comparados com o grupo ST. Nossos resultados sugerem claramente que o tratamento com estatinas provoca notáveis alterações no tendão calcâneo de ratos. Além de promover o desequilíbrio entre a síntese e degradação de componentes da matriz extracelular e a desorganização das fibras de colágeno, as estatinas também trouxeram prejuízos às propriedades biomecânicas dos tendões, fatores que associados, podem tornar os tendões mais predispostos a rupturas e possivelmente induzir micro lesões.

ABSTRACT

Statins are inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. These drugs are used to treat hypercholesterolemia - high cholesterol levels in the blood. Although considered safe and effective drugs, they have numerous adverse effects such as myopathy and liver toxicity. In addition, there are reports of tendon lesions associated with statins and the mechanisms responsible for this adverse effect are not clear. Therefore, this study aimed to evaluate possible morphological, biochemical and functional alterations in Achilles tendon of rats after chronic treatment with statins. The rats were divided into the following groups: treated with simvastatin (S-20 and S-80), atorvastatin (A-20 and A-80), carboxymethylcellulose used as the vehicle (V) and a group that received no treatment (NT). Doses of statins were calculated using allometric scaling with reference to 80mg/day and 20mg/day doses recommended for humans. The rats were euthanized after two months of treatment and the tendons were collected for morphological, biochemical and functional analysis. For morphological analysis by light microscopy, sections of tendons were stained with hematoxylin-eosin and toluidine blue. Birefringence measurements were performed by polarizing microscopy. For biochemical analysis, the tendons were processed and analyzed according to the following techniques: Agarose gel electrophoresis for the analysis of sulphated glycosaminoglycans; zymography for detecting metalloproteinases (MMPs) -2 and -9; Western Blotting for collagen I, dosage of non-collagenous proteins, glycosaminoglycans and hydroxyproline. The tendons were also submitted to biomechanical tests. All of the results were analyzed by ANOVA-one-way followed by Tukey test, except the birefringence data that were analyzed by Mann-Whitney test. The concentration of non-collagenous proteins in all groups treated with statins was lower than in V group. There was a significant increase in pro-MMP-2 in A-80 group and active MMP-2 in S-20 compared to the ST group. We observed a significant increase in pro-MMP-9 in A-80 and S-20 groups. The A-20 group showed a significant increase in the levels of active MMP-9 in relation to the ST group. The A-20 group showed less collagen I when compared to the ST group and in the S-20 group was observed a higher concentration

of hydroxyproline in relation to the both ST and V groups. The dosage of glycosaminoglycans showed a significant increase in A-20 group and S-80 group showed lower concentration of this component in relation to the ST and V groups respectively. The birefringence measurements of the A-20, A-80 and S-80 groups showed a lower degree of organization of the collagen fibers in these groups than in the V group. During the biomechanical tests the tendons of the A-20, A-80 and S-20 groups were less resistant to rupture when compared to the ST group. Our results clearly suggest that treatment with statins causes remarkable changes in the Achilles tendon. Besides promoting the imbalance between the synthesis and degradation of extracellular matrix components and disorganization of collagen fibers, statins also brought losses to the biomechanical properties of tendons. These factors associated can make the tendons more prone to ruptures and possibly induce micro injuries.

1. INTRODUÇÃO

Os tendões são estruturas fibrosas, que promovem a união entre músculos e ossos. São formados por tecido conjuntivo denso modelado onde, feixes de colágeno estão dispostos paralelamente e cuja direção é determinada frente às trações impostas em um determinado sentido (O'BRIEN, 2005). Macroscopicamente, um tendão saudável possui cor branca, brilhante e uma textura fibroelástica (SHARMA & MAFFULLI, 2005).

Devido ao arranjo paralelo das fibras de colágeno, o tendão é capaz de resistir a altas forças de tensão e sua função básica é de suportar e transmitir forças entre músculos e ossos para promover o movimento articular, ou seja, a força exercida pelos músculos converge para o tendão e através deste, o osso é tensionado (JAMES *et al.*, 2008).

O tendão calcâneo ou tendão de Aquiles é o maior e mais resistente tendão do corpo humano, sendo um sítio comum de lesões (JUNGE, *et al.*, 1987) que geralmente ocorrem de 2 a 5 centímetros acima de sua inserção, uma área de pouca vascularização (O'BRIEN, 2005). Frequentemente este tipo de lesão ocorre em atletas de alto desempenho, durante suas atividades físicas (KANNUS & NIATRI, 1997), contudo na população geral, fatores como idade, sexo, sobrepeso ou a presença de doenças como diabetes e artrite reumatóide parecem estar envolvidos nas lesões do tendão calcâneo (SZARO, *et al.*, 2009).

Por outro lado, há também relatos de ruptura do tendão calcâneo relacionada ao uso de medicamentos, como por exemplo, corticosteroides (QUILLAN & GREGAN, 2005), fluoroquinolonas (KADER *et al.*, 2005; SEEGER *et al.*, 2006) e estatinas (PULLATT *et al.*, 2007; MARIE *et al.*, 2008; CARMONT *et al.*, 2009; MARIE & NOBLET, 2009; NESSELROADE & NICKELS, 2010; SAVVIDOU & MORENO, 2012). Considerando que as estatinas são medicamentos amplamente prescritos, com benefícios clínicos diversos, incluindo redução dos níveis séricos de colesterol, prevenção de infarto do miocárdio, bem como a redução da formação de placas ateroscleróticas (RANG *et al.*, 2007), seus efeitos sobre aspectos estruturais, bioquímicos e funcionais do tendão merecem atenção especial.

1.1 Anatomia do tendão calcanear

O tendão calcanear é constituído pela fusão das aponeuroses dos músculos gastrocnêmio (cabeça medial e lateral) e sóleo que formam a parte posterior da perna (panturrilha), possui ponto de inserção no osso calcâneo e ocupa o terço inferior da perna (JUNGE, *et al.*, 1987).

A região de inserção do tendão com o osso é chamada de junção osteotendínea e é caracterizada por uma transição gradual de tecido fibrocartilaginoso a ósseo lamelar. Em contrapartida, a área de conexão entre o tendão e o músculo é denominada junção musculotendínea, sendo que durante a transmissão da força de contração do músculo para o tendão esta região é submetida a um grande estresse mecânico (O'BRIEN, 2005).

O suprimento de sangue para o tendão se dá pelas junções musculotendínea e osteotendínea. Na junção musculotendínea a irrigação sanguínea se dá pelas veias do perimísio que são contínuas com as dos fascículos do tendão (SHARMA & MAFFULLI, 2005); já na junção osteotendínea, o suprimento de sangue fica limitado no ponto de inserção do tendão (KANNUS, 2000; KADER *et al.*, 2005).

O tendão recebe inervação de estruturas adjacentes, ou seja, as fibras nervosas atravessam a junção musculotendínea e entram no endotendão. Estas fibras possuem mecanorreceptores que detectam variações na pressão ou tensão exercidas sobre o tecido (SHARMA & MAFFULLI, 2005).

1.2 Características estruturais e bioquímicas do tendão

Histologicamente, quando comparados com outros tecidos musculoesqueléticos, os tendões possuem baixa celularidade e são pouco vascularizados (RAISER, 2001). Os elementos celulares do tendão são os tenoblastos que possuem numerosas organelas citoplasmáticas e maior atividade metabólica; e tenócitos que são células mais maduras e com uma atividade metabólica mais baixa (SHARMA & MAFFULLI, 2005). Estas células são finas e fusiformes, orientadas longitudinalmente entre as fibras de colágeno,

desempenham o papel fundamental de sintetizar os componentes da matriz extracelular como, por exemplo, o colágeno, que constitui a unidade estrutural básica do tendão (RAISER, 2001).

O tendão possui uma organização hierárquica, composto por moléculas de colágeno, fibrilas, feixes de fibras e fascículos que se dispõem paralelamente ao longo eixo do tendão (Figura 1) (WANG, 2006). O elemento estrutural fundamental no tendão é o colágeno do tipo I sob a forma de fibrilas. A unidade estrutural básica de colágeno é o tropocolágeno, uma proteína longa e fina produzida no interior do tenoblasto e secretada na matriz extracelular como procolágeno (SILVER *et al.*, 2003). O tropocolágeno vai se polimerizar para formar as fibrilas de colágeno que, por sua vez, vão se agregar e formar fibras de colágeno, visíveis ao microscópio de luz (SHARMA & MAFFULLI, 2005).

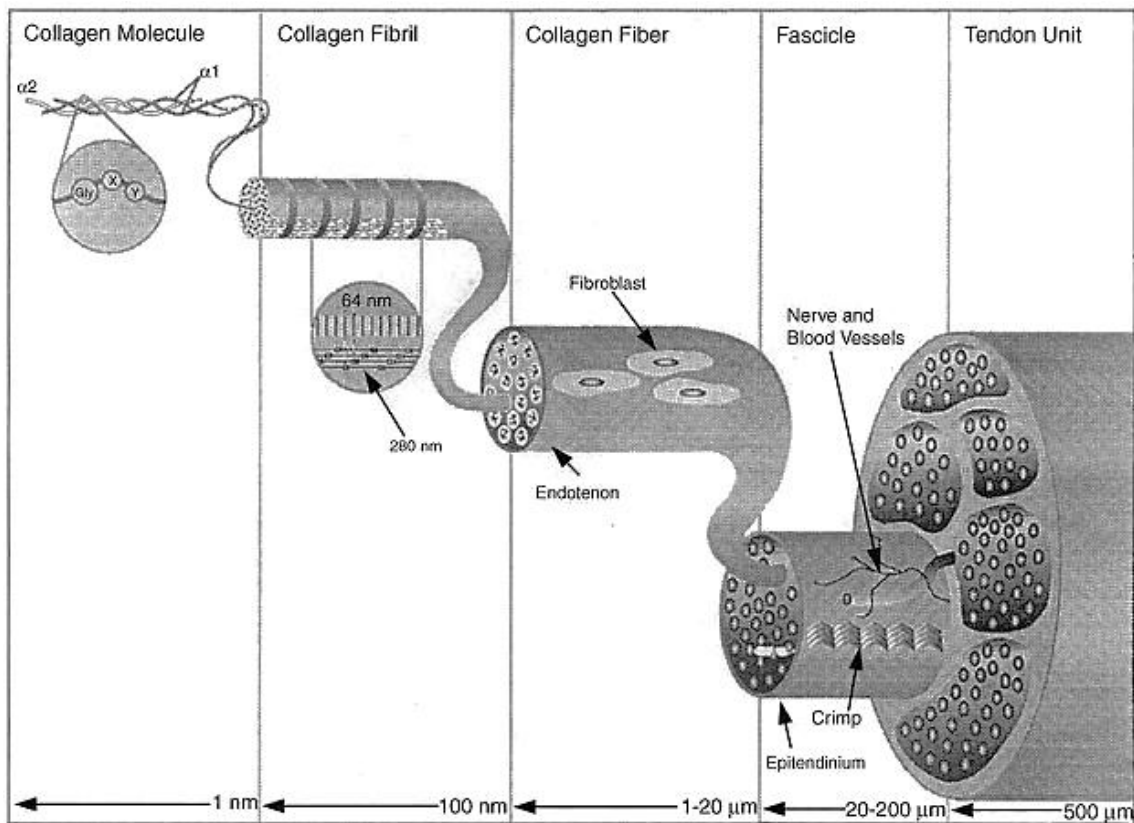


Figura 1. Organização hierárquica do tendão (SILVER *et al.*, 2003).

As fibras de colágeno são agrupadas em feixes e circundadas por uma bainha de tecido conjuntivo frouxo, denominada endotendão (O'BRIEN, 2005). O endotendão é composto por fibras de colágeno do tipo III que proporciona via de acesso para nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, importantes no aporte de nutrientes para as células do tendão. Cada feixe de fibras de colágeno circundado pelo endotendão recebe o nome de fascículo (KANNUS, 2000).

Os fascículos são revestidos pelo epitendão que contém fibras elásticas e colágenas arranjadas irregularmente (RAISER, 2001). O epitendão é revestido pelo paratendão o qual possui duas camadas: uma em contato direto com o epitendão e outra superficial. Entre o epitendão e o paratendão encontra-se uma fina camada de fluido para permitir o movimento do tendão com redução do atrito (KADER *et al.*, 2005). O arranjo do endotendão, epitendão e paratendão proporciona mínima resistência ao movimento de deslizamento através dos tecidos e é necessário que seja preservado a fim de manter a função do tendão (RAISER, 2001).

A matriz extracelular que constitui o tendão possui dois componentes principais: os elementos fibrosos e a substância amorfa que é um meio de difusão de nutrientes e gases. A porção fibrosa é composta principalmente de colágenos do tipo I e III, além de elastina que confere estabilidade e elasticidade aos tendões (KANNUS, 2000). Outros colágenos também estão presentes em tendões como, por exemplo, os tipos V e XIV envolvidos com o crescimento das fibrilas e os tipos II, VI, IX, X e XI encontrados principalmente na região de inserção do tendão (ZHANG *et al.*, 2005; WANG, 2006). A substância amorfa consiste em glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos como decorin e agregam, glicoproteínas estruturais e água, que corresponde em torno de 55% do peso do tendão e é responsável por facilitar o deslizamento e reduzir o atrito entre as fibras de colágeno (JAMES *et al.*, 2008).

Os proteoglicanos, formados por um esqueleto proteico covalentemente ligado a uma ou mais cadeias de GAGs, são os componentes principais da substância amorfa, possuem carga negativa e ao interagirem com moléculas de água formam uma estrutura tipo gel, agindo como um material de adesão entre as microfibrilas de colágeno (DAHLGREN, 2007). Proteoglicanos como, por exemplo, decorin, biglicam, fibromodulim e lumican desempenham um papel importante na fibrilogênese do colágeno,

orientando e estabilizando as fibrilas além de limitar o crescimento lateral do tendão (SILVER *et al.*, 2003; FRANCHI *et al.*, 2007).

Fibronectinas são glicoproteínas de alto peso molecular que desempenham um papel na adesão e migração celular por interagirem com hialuronato, um GAG, criando um arcabouço para a migração das células (KANNUS, 2000).

O componente fibroso mais importante do tendão é o colágeno tipo I (JAMES *et al.*, 2008). Uma molécula de colágeno é longa, rígida e apresenta uma fita tripla helicoidal, onde três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , estão enroladas entre si (BHATTACHARJEE & BANSAL, 2005).

Após a sua síntese em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso, as cadeias α sofrem uma série de modificações enzimáticas ainda no retículo endoplasmático. Como modificação pós-traducional, as hidroxilas são incorporadas às prolinas e lisinas presentes nas cadeias polipeptídicas de colágeno pelas enzimas prolil hidroxilase e lisil hidroxilase, respectivamente (GELSE *et al.*, 2003). A hidroxiprolina está envolvida na ligação de hidrogênio (intramolecularmente) entre as cadeias polipeptídicas e a hidroxilisina também, mas, além disso, a hidroxilisina está envolvida na ligação covalente (intermolecularmente) entre moléculas adjacentes de colágeno. As ligações cruzadas são importantes para aumentar a resistência à tração e tornam as moléculas de colágeno menos susceptíveis à ação de proteases (O'BRIEN, 2005; JAMES *et al.*, 2008). A proteína passa então do retículo endoplasmático rugoso para o complexo de Golgi e é secretada (GELSE *et al.*, 2003).

No meio intracelular a molécula de colágeno é denominada de procolágeno e no meio extracelular seus peptídeos de registro são eliminados e ela passa a ser chamada de tropocolágeno que se polimeriza para formar as fibrilas de colágeno (WANG, 2006).

Quase dois terços da molécula de colágeno consistem de três aminoácidos: glicina (33%), prolina (15%), e hidroxiprolina (15%). Cada cadeia alfa é constituída por três repetições de glicina e dois outros aminoácidos. Glicina é encontrada a cada três resíduos, enquanto prolina e hidroxiprolina ocorrem com frequência nas outras duas posições (O'BRIEN, 2005). Os grupamentos hidroxila destes aminoácidos formam pontes de

hidrogênio intercadeias que ajudam na estabilização da tripla hélice (RAMSHAW *et al.*, 1998).

Quando observados sob luz polarizada, os feixes de fibras de colágeno apresentam um padrão ondulado denominado “*crimp*”, com bandas transversais claras e escuras intercaladas. O *crimp* possibilita que o tendão se acomode frente a forças de tração, sem que as fibras sejam danificadas, e, além disso, atua como um amortecedor de choques ao longo do comprimento do tecido, oferecendo uma baixa rigidez a forças de compressão (KER, 2002; FRANCHI *et al.*, 2007).

Em um tendão normal há um equilíbrio entre processos anabólicos e catabólicos. Para a manutenção da homeostasia da matriz extracelular dos tendões é importante que haja equilíbrio entre metaloproteinases (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (DAHLGREN, 2007). As MMPs são membros de uma família de enzimas que requerem zinco para a atividade de seu sítio catalítico. As células do tendão secretam MMPs na forma de proenzimas inativas que, quando ativadas, são capazes de degradar diversos componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno, elastina e proteoglicanos (VISSE & NAGASE, 2003). Até hoje foram identificadas 23 MMPs que são subdivididas em quatro classes: colagenases, gelatinases, estromelinas e MMPs tipo membrana (MT-MMPs) (MAGRA & MAFFULLI, 2005). Sendo assim, estas enzimas são importantes na degradação e remodelação da matriz extracelular de tendões (SHARMA & MAFFULLI, 2005).

TIMPs são proteínas reguladoras da atividade de MMPs, que se ligam ao sítio ativo ou em sítios alternativos destas enzimas (MALEMUD, 2006). Um desequilíbrio entre a atividade de MMPs e TIMPs provoca distúrbios no colágeno, fazendo com que a integridade da matriz extracelular de tendões seja afetada (KAROUSOU *et al.*, 2008).

Durante o processo de reparo do tendão, há um aumento da atividade de MMPs que está relacionado com a degradação de colágeno desnaturado. Várias MMPs estão envolvidas nesse processo, sendo que a MMP-9 e MMP-13 apenas participam da degradação de colágeno, enquanto que a MMP-2, MMP-3 e MMP-14 participam da degradação e remodelação do colágeno (RILEY *et al.*, 2002).

1.3 Estatinas

As estatinas são agentes altamente eficazes na redução do colesterol e demonstraram reduzir a morbidade e mortalidade em pacientes com doenças cardiovasculares (SCHACHTER, 2004). Sendo assim, estes medicamentos são a primeira escolha para o tratamento de dislipidemias (CORSINI *et al.*, 1999).

A 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase é uma enzima que catalisa a conversão da HMG-CoA a ácido mevalônico, precursor do colesterol. Esta enzima é alvo para a intervenção farmacológica uma vez que ela atua na biossíntese do colesterol. Em nível celular, as estatinas inibem a conversão da HMG-CoA para mevalonato e como consequência, inibem a síntese hepática do colesterol (MAGALHÃES, 2005)

Devido à redução do colesterol intracelular há um estímulo para a célula aumentar a produção de receptores de LDL. Com o aumento do número de receptores de LDL, as células poderão captar uma maior quantidade de LDL circulante, e consequentemente baixar os seus níveis plasmáticos (SCHACHTER, 2004).

Atualmente sete estatinas são aprovadas para uso clínico: atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina. A cerivastatina foi retirada do mercado em 2001, por apresentar uma maior incidência de efeitos adversos como, por exemplo, miotoxicidade severa (McKENNEY, 2003; SRINIVASA *et al.*, 2011). As estruturas moleculares das diferentes estatinas estão mostradas na figura 2.

HMG-CoA analogue

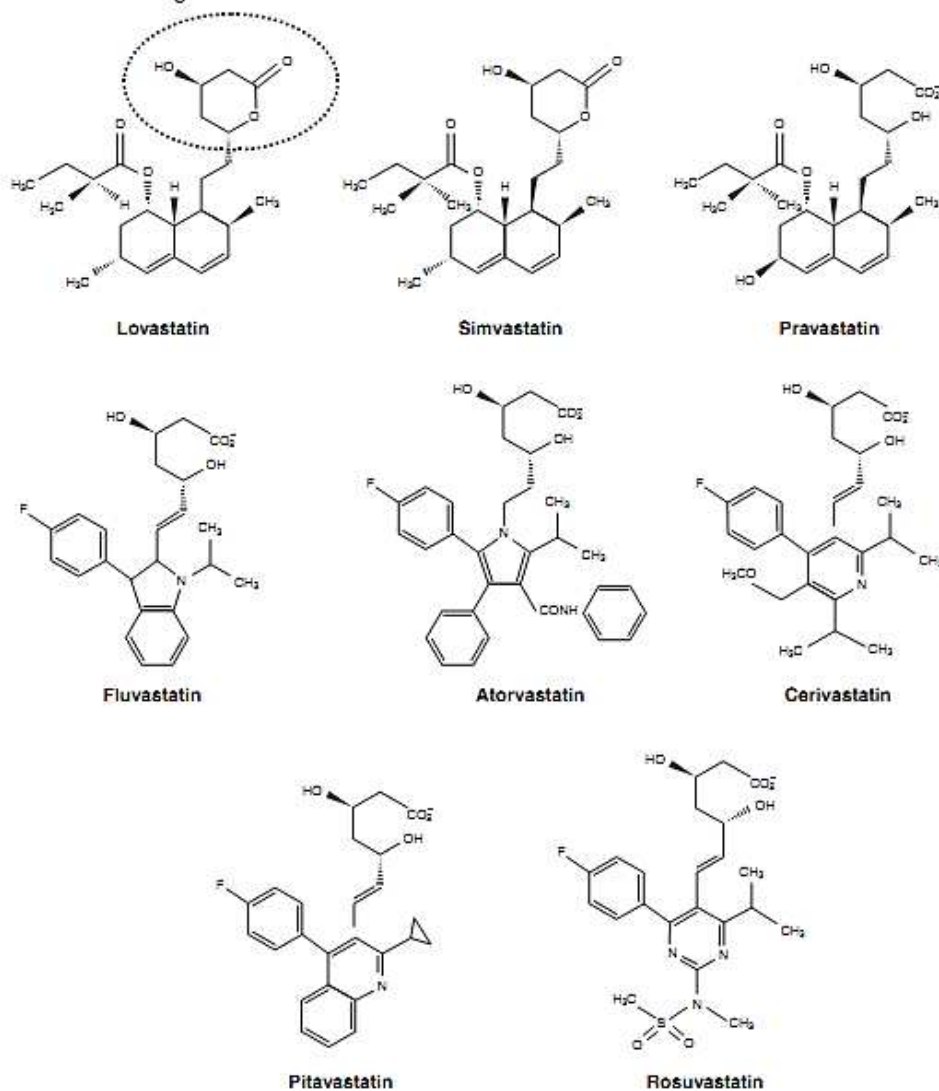


Figura 2. Estrutura de diferentes estatinas (SCHACHTER, 2004)

A absorção de estatinas ocorre no intestino e, posteriormente, são metabolizadas nas células hepáticas pelo citocromo P450 (SRINIVASA *et al.*, 2011). A lovastatina e sinvastatina são administradas como pró-fármacos e são hidrolisadas no fígado, sendo convertida a forma hidroxilada que possui atividade farmacológica. As demais estatinas são administradas na sua forma ativa (CAMPO & CARVALHO, 2007).

Com exceção da pravastatina, a maioria das estatinas apresenta grande ligação com as proteínas plasmáticas, resultando em mínima exposição sistêmica da droga

farmacologicamente ativa e, conseqüentemente, um risco reduzido de efeitos adversos sistêmicos (CORSINI *et al.*, 1999; McKENNEY, 2003).

Altas concentrações de estatinas no plasma não são esperadas, uma vez que a maioria destes medicamentos tem uma meia-vida de aproximadamente 2 ou 3 horas, com exceção da atorvastatina e rosuvastatina que possuem meia-vida entre 11 e 30 horas. As taxas de excreção renal das estatinas variam entre 2% e 60%, sendo que a pravastatina apresenta uma taxa de excreção renal mais elevada por ser um composto hidrofílico (IGEL *et al.*, 2002).

1.4 Efeitos adversos das Estatinas

Mesmo sendo medicamentos bastante eficazes, as estatinas apresentam alguns efeitos adversos, dentre os quais podemos citar: constipação, dores de cabeça, distúrbios no sono, e outros mais graves como: hepatotoxicidade e complicações musculoesqueléticas (O' SULLIVAN, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2012). Embora a incidência de miopatias seja muito baixa (cerca de 0,01%) ela aumenta proporcionalmente com as concentrações plasmáticas de estatinas (OMAR *et al.*, 2001). Raramente, uma elevação extrema de creatina fosfoquinase (CPK) pode ocorrer e estar associada à rabdomiólise e à insuficiência renal, especialmente em pacientes idosos e que fazem uso de estatinas em associação com determinados tipos de medicamentos como, por exemplo, fibratos e niacina (OMAR *et al.*, 2001; GOODMAN & GILMAN, 2006).

Recentemente, casos de tendinite e rupturas de tendão têm sido associados ao uso de estatinas (MARIE & NOBLET, 2009). Estas complicações em tendões são observadas em diversos sítios como, por exemplo, tendão distal do bíceps braquial (SAVVIDOU & MORENO, 2012), tendão patelar (BERI *et al.*, 2009), tendão do músculo quadríceps (NESSELROADE & NICKELS, 2010; RUBIN *et al.*, 2011) e tendão calcâneo (CHAZERAIN, *et al.*, 2001; BERI *et al.*, 2009; CARMONT *et al.*, 2009), que parece ser o mais acometido por lesões (MARIE *et al.*, 2008). Os mecanismos responsáveis por lesões e rupturas de tendões ainda não foram esclarecidos.

Sinvastatina e atorvastatina são algumas das estatinas mais empregadas em tratamentos de hipercolesterolemia, possuem alta eficácia e tolerabilidade (MARON *et al.*, 2000), porém, são as principais estatinas envolvidas em tendinopatias (MARIE *et al.*, 2008). As tendinopatias parecem ser um efeito adverso raro, mas há a hipótese de que este tipo de manifestação nem sempre é devidamente reportada aos órgãos de farmacovigilância (CHAZERAIN, *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

Gerais

O presente estudo foi projetado com o objetivo de verificar as possíveis alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais no tendão calcâneo de ratos após tratamento crônico com estatinas.

Específicos

- Avaliar morfológicamente o tendão calcâneo de ratos e principalmente, a organização dos feixes de colágeno.
- Quantificar os níveis de hidroxiprolina, glicosaminoglicanos e proteínas não-colagênicas da matriz extracelular dos tendões.
- Analisar em gel de agarose a presença dos glicosaminoglicanos condroitin sulfato e dermatan sulfato.
- Detectar possíveis alterações no perfil das isoformas das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.
- Avaliar por meio de Western Blotting a presença de colágeno I.
- Realizar uma análise funcional dos tendões por meio de testes biomecânicos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERI, A.; DWAMENA, F.C.; DWAMENA, B. A. Association Between Statin Therapy and Tendon Rupture: A Case–Control Study. **J Cardiovasc Pharmacol.** 53: 401–404, 2009.

BHATTACHARJEE, A.; BANSAL, M. Collagen Structure: The Madras Triple Helix and the Current Scenario. **IUBMB Life**, 57(3): 161 – 172, 2005.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**, 30(2): 425-430, 2007.

CARMONT, M. R.; HIGHLAND, A. M.; BLUNDELL, C. M.; DAVIES, M.B. Simultaneous bilateral Achilles tendon ruptures associated with statin medication despite regular rock climbing exercise. **Physical Therapy in Sport.** 10: 150–152, 2009.

CHAZERAIN, P.; HAYEM, G.; HAMZA, S.; BEST, C. ZIZA, J. Four cases of tendinopathy in patients on statin therapy. **Joint Bone Spine.** 68: 430-3, 2001.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics.** 84: 413–428, 1999.

DAHLGREN, L. A. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice.** 168 – 173, 2007.

FRANCHI, M.; TRIRÈ, A.; QUARANTA, M.; ORSINI, E.; OTTANI, V. Collagen Structure of Tendon Relates to Function. **TheScientificWorldJOURNAL.** 7: 404–420, 2007.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev.** 28;55(12): 1531-46, 2003.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. (eds.). Terapia Farmacológica para hipercolesterolemia e dislipidemia In: GILMAN, A. G. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11ª Ed. 2006. cap. 36, p. 837-868.

HOFFMAN, K. B.; KRAUS, C.; DIMBIL, M.; GOLOMB, B. A. A Survey of the FDA's AERS Database Regarding Muscle and Tendon Adverse Events Linked to the Statin Drug Class. **PLoS ONE**. 7(8): e42866, 2012.

IGEL, M.; SUDHOP, T.; BERGMANN, K. Pharmacology of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors (Statins), Including Rosuvastatin and Pitavastatin. **J Clin Pharmacol**. 42: 835-845, 2002.

JAMES, R.; KESTURU, G.; BALIAN, G.; CHHABRA, A. B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. **JHS**. 33A: 102-112, 2008.

JUNGE, C., AMBRÓSIO, J.D. & DEL SOL, C.M.: Contribuição para o estudo do tendão calcâneo no homem. **Anais Anat Nor** 5: 185-187, 1987.

KADER, D.; MOSCONI, M.; BENAZZO, F.; MAFFULLI, N. Achilles Tendon Rupture. **Tendon Injuries. Part II**. 187-200, 2005

KANNUS, P.; NATRI, A. Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. **Scand J Med Sci Sports**. 7: 107-112, 1997.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports**. 10: 312–320, 2000.

KAROUSOU, E.; RONGA, M.; VIGETTI, D.; PASSI, A.; MAFFULLI, N. Collagens, Proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. **Clin Orthop Relat Res**. 466: 1577–1582, 2008.

KER, R. F. The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 133: 987–1000, 2002.

MAGALHÃES, M. E. C. Mecanismos de rabdomiólise com as estatinas. **Arq.Bras Cardiol**, 85: 42-44, 2005.

MAGRA, M.; MAFFULLI, N. Molecular Events in Tendinopathy: A Role for Metalloproteases. **Foot Ankle Clin N Am**. 10: 267 – 277, 2005.

MALEMUD, C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. **Frontiers in Bioscience**. 11: 1696-1701, 2006.

MARIE, I.; DELAFENÊTRE, H.; MASSY, N.; THUILLEZ, C.; NOBLET, C.; Tendinous Disorders Attributed to Statins: A Study on Ninety-Six Spontaneous Reports in the Period 1990–2005 and Review of the Literature. **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)**. 59(3): 367–372, 2008.

MARIE, I.; NOBLET, C. Drug-associated tendon disorders: After fluoroquinolones... here are statins! **La Revue de médecine interne**. 30: 307–310, 2009.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current Perspectives on Statins. **Circulation**. 101: 207-213, 2000.

McKENNEY, J. M. Pharmacologic characteristics of statins. **Clin. Cardiol**. 26: III-32–III-38, 2003.

NESSSELROADE, R. D.; NICKELS, L. C. Ultrasound Diagnosis of Bilateral Quadriceps Tendon Rupture After Statin Use. **West J Emerg Med**. 11(4): 306-309, 2010.

O'BRIEN, M. Anatomy of Tendons. **Tendon Injuries, Part I**. p. 3-13, 2005

OMAR, M. A.; WILSON, J. P.; COX, T. S. Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. **The Annals of Pharmacotherapy**, 35(9): 1096-1107, 2001.

O'SULLIVAN, S. Statins: A review of benefits and risks. **TSMJ**. 8: 52-56, 2007.

PULLATT, R. C.; GADARLA, M. R.; KARAS, R. H.; ALSHEIKH-ALI, A. A.; THOMPSON, P. D. Tendon Rupture Associated With Simvastatin/Ezetimibe Therapy. **Am J Cardiol**. 100: 152–153, 2007.

QUILLAN, R.; GREGAN, P. Tendon rupture as a complication of corticosteroid therapy. **Palliat Med**. 19: 352, 2005.

RAISER, A. G. Reparação do Tendão Calcâneo em Cães. **Ciência Rural**, 31(2): 351-359, 2001.

RAMSHAW, J. A. M.; SHAH, N. K.; BRODSKY, B. Gly-X-Y Tripeptide Frequencies in Collagen: A Context for Host–Guest Triple-Helical Peptides. **Journal of Structural Biology**. 122: 86–91, 1998.

RANG, H. P.; DALE, J. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier , 6^a Ed. 2007.

RILEY, G. P.; CURRY, V.; DEGROOT, J.; EL, B.; VERZIIL, N.; HAZLEMAN, B. L.; BANK, R. A. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. **Matrix Biology**. 21: 185–195, 2002.

RUBIN, G.; HADDAD, E.; BEN-HAIM, T.; ELMALACH I.; ROZEN, N. Bilateral, simultaneous rupture of the quadriceps tendon associated with simvastatin. **IMAJ**. 13: 185, 2011.

SAVVIDOU, C.; MORENO, R. Spontaneous Distal Biceps Tendon Ruptures: are they related to statin administration? **Hand Surgery**. 17: 167-171, 2012.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 19: 117–125, 2004.

SEEGER, J. D.; WEST, W. A.; FIFE, D.; NOEL, G. J.; JOHNSON, L. N.; WALKER, A. M. Achilles tendon rupture and its association with fluoroquinolone antibiotics and other potential risk factors in a managed care population. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**. 15: 784–792, 2006.

SHARMA, P, & MAFFULLI, N.: Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J Bone Joint Surg**. 87: 187-202, 2005

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; SEEHRA, G. P.; Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. **Journal of Biomechanics**. 36: 1529–1553, 2003.

SRINIVASA, R. K.; PRASAD, T.; MOHANTA, G. P.; MANNA, P. K. An Overview of Statins as Hypolipidemic Drugs. **Int J Pharm Sci Drug Res**. 3: 178–183, 2011.

SZARO, P.; WITKOWSKI, G.; SMIGIELSKI, R.; KRAJEWSKI, P.; CISZEK, B. Fascicles of the adult human Achilles tendon – An anatomical study. **Ann Anat**. 191: 586-593, 2009.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circ Res**. 92: 827-839, 2003.

ZHANG, G.; YOUNG, B. B.; EZURA, Y.; FAVATA, M.; SOSLOWSKY, L. J.; CHAKRAVARTI, S.; BIRK, D. E. Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**. 5(1): 5-21, 2005.

WANG, J. H. C. Mechanobiology of tendon. **J of Biomechanics**. 39: 1563-1582, 2006.

4. ARTIGOS

Artigo 1: Statins induce biochemical changes in the Achilles tendon

Artigo 2: Alterações estruturais e biomecânicas em tendão calcâneo de ratos após tratamento com estatinas

STATINS INDUCE BIOCHEMICAL CHANGES IN THE ACHILLES TENDON

Names of authors: L. P. Oliveira¹; C. P. Vieira¹; F. R. Guerra¹; M. S. Almeida¹; E. R. Pimentel¹.

Affiliation and address of the authors:

¹ Department of Functional and Structural Biology, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding Author: Letícia Prado de Oliveira, Department of Functional and Structural Biology, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, CP 6109; 13083-970, Campinas, SP, Brazil. *Telephone:* 55 (19) 3521-6117 / 55 (19) 3521-6115 *e-mail:* leprado.farm@gmail.com

Abstract

Background and purpose

Statins have been widely prescribed as lipid-lowering drugs and are associated with tendon rupture. Therefore, this study aimed to evaluate the possible biochemical changes in the Achilles tendon of rats after chronic treatment with statins.

Experimental approach

The rats were divided into the following groups: treated with simvastatin (S-20 and S-80), treated with atorvastatin (A-20 and A-80), treated with carboxymethylcellulose as the vehicle (V) and a group that received no treatment (NT). Dosages of statins were calculated using allometric scaling with reference to the 80mg/day and 20mg/day, dosages recommended for humans. The rats were euthanized after two months of treatment. The levels of non-collagenous proteins, glycosaminoglycans (GAGs) and hydroxyproline were quantified. Western blotting for collagen I was performed and the presence of metalloproteinases (MMPs) -2 and -9 was investigated by zymography. The GAGs were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Key results

The concentration of non-collagenous proteins in all of the groups treated with the statins was less than the V treated group. There was a significant increase in pro-MMP-2 in the A-80 group and in active MMP-2 in the S-20 group. A significant increase in pro-MMP-9 was observed in the both the A-80 and S-20 groups. In the A-20 group, there was a lower amount of collagen I. In addition, a higher concentration of hydroxyproline was found in S-20 group. The analysis of GAGs showed a significant increase in the A-20 group and a significant reduction in the S-80 group.

Conclusions and Implications

The treatment induced remarkable alterations in the Achilles tendon. The presence of MMP-2 and MMP-9 is evidence of the degradation and remodeling processes in the extracellular matrix of the tendons. Our results show that statins induce imbalance of extracellular matrix components and possibly induce micro damage in tendons.

Keywords

Simvastatin, atorvastatin, collagen, extracellular matrix

INTRODUCTION

Statins are a group of drugs prescribed for the treatment of hyperlipidemia, and they act by inhibiting 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, an enzyme involved in cholesterol production. HMG-CoA reductase catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonate, and therefore serves as a therapeutic target for the action of statins (Campo and Carvalho, 2007). Consequently, HMG-CoA reductase inhibitors induce a reduction of low-density lipoprotein (LDL) in the plasma, a reduction of intracellular cholesterol and an increase of the LDL receptors (Maron *et al.*, 2000).

Statins are widely prescribed medications with various clinical benefits, including the prevention of myocardial infarction and the formation of atherosclerotic plaques (O'Sullivan, 2007). Additionally, many studies have shown that the clinical benefits associated with statins are either independent of or indirectly dependent on a reduction in LDL-cholesterol (Campo and Carvalho, 2007). These pleiotropic effects, have been well-studied in an effort to identify additional potential uses for these drugs in the treatment of other pathologies (Liao and Laufs, 2005), such as hypertension (Yang *et al.*, 2005), Alzheimer's disease (Campo and Carvalho, 2007), sepsis (Giusti-Paiva *et al.*, 2004) and osteoporosis (Jadhav and Jain, 2006).

Despite being quite effective medicines, statins have some adverse effects, including constipation, headaches, sleep disturbances, and other more serious effects, such as hepatotoxicity and musculoskeletal complications (O'Sullivan, 2007; Hoffman *et al.*, 2012). More recently, cases of tendinitis and tendon ruptures have been associated with the use of statins (Marie and Noblet, 2009). These complications have been observed in several tendons, including the distal biceps (Savvidou and Moreno, 2012), the patellar (Beri *et al.*, 2009), the quadriceps (Nesselroade and Nickels, 2010; Rubin *et al.*, 2011) and the Achilles tendons (Chazerain, *et al.*, 2001; Beri *et al.*, 2009; Carmont *et al.*, 2009), the latter of which are commonly injured (Marie *et al.*, 2008).

Simvastatin and atorvastatin are some of the most widely used statins in the treatment of hypercholesterolemia, and they are highly efficacious and tolerable (Maron *et al.*, 2000). However, they can also result in tendinopathies (Marie *et al.*, 2008). Tendinopathies seem to be a rare adverse effect of statins, but it is also thought that many

of these types of adverse effects are left unreported to pharmacovigilance centers (Chazerain, *et al.*, 2001).

Recent studies have shown that statins are responsible for inhibiting the secretion of metalloproteinases (MMPs) in lung fibroblasts (Kamio *et al.*, 2010) and endothelial cells (Izidoro-Toledo *et al.*, 2011). Furthermore, they reduce the expression of collagen I in smooth muscle (Schaafsma *et al.*, 2010). Of note, tendons are formed primarily by collagen I, and MMPs play an important role in maintaining and remodeling the extracellular matrix in tendons (Kannus, 2000).

In addition to lowering cholesterol and inhibiting MMPs (Izidoro-Toledo *et al.*, 2011), statin use has also been shown to promote apoptosis in fibroblasts (Yokota *et al.* 2008), further suggesting an association between statin use and tendon rupture. Together, these factors can weaken the integrity of the tendon tissue and thus predispose the tendon to rupture.

Statins are widely prescribed drugs, and investigating the biochemical changes in tendons caused by statins may help to understand the causes of tendinitis and tendon rupture associated with the use of these drugs. Because there are no studies that address the effects of statins on the components of the extracellular matrix in tendons, this study was designed to investigate the effects of chronic oral statin treatment on the Achilles tendon in rats. We found that chronic use of statins triggered notable changes in the extracellular matrix of the Achilles tendon and therefore, statins should be used with caution especially in patients who have a history of tendinopathy.

METHODS

Experimental groups

Animal care was in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and was consistent with the ethical principles of animal experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of State University of Campinas, SP, Brazil and was filed under n° 2473-1.

We used male Wistar rats, with 45 days, weighing on average 300 grams. The rats were housed two per cage in a 12 h light:dark cycle at 23°C, with free access to standard rat chow and water.

The animals were divided into six experimental groups: rats treated with a daily dose equivalent to 20mg of atorvastatin (A-20) or simvastatin (S-20), rats treated with a daily dose equivalent to 80mg of atorvastatin (A-80) or simvastatin (S-80), a vehicle group (V) that received an aqueous solution of 0.5% carboxymethylcellulose, and the group that received no treatment (NT). The treatment lasted for two months and a gavage was used to administer the solutions (Camerino *et al.*, 2011).

We accounted for the metabolic rate of the animals and used allometric scaling to calculate the necessary drug dosage (Pachaly and Brito, 2001). Thus, it was necessary to use an animal model in which the pharmacokinetic and pharmacodynamics parameters of the drug of interest were known. In this study, we used as animal model the human and animal target Wistar rats. After two months of treatment, the animals were euthanized with isoflurane, and the tendons were collected for biochemical analysis.

Extraction procedures

The Achilles tendon was cut in small pieces and treated with 50 volumes of 4 M guanidine hydrochloride (GuHCl) containing 20 mM EDTA, 1 mM PMSF in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.8, for 24 h at 4°C with mild stirring (Heinergard and Sommarin, 1987). Afterwards, the material was centrifuged (13,000g, 25 min, 4°C) and the supernatant was used for non-collagenous proteins dosage (NCPs) and western blotting for collagen I.

Quantification of proteins

NCPs were quantified according to the Bradford method (1976), using bovine serum albumin as standard. The absorbance was measured at 595 nm.

Hydroxyproline quantification

After washing in PBS (Phosphate-Buffered Saline—5 mM phosphate buffer, 0.15 M NaCl and 50 Mm EDTA), fragments from the tendons were immersed into acetone for 48 h and then into chloroform:ethanol (2:1) for 48 h. Fragments were weighed and hydrolyzed in 6 N HCl (1 mL for each 10 mg of tissue) for 16 h at 110 °C. The hydrolysate was neutralized with 6 N NaOH, and 20 µL of each sample was treated with chloramine T solution, as described by Stegemann and Stalder (1967) and Jorge *et al.* (2008), with some modifications. The absorbance was measured at 550 nm in a spectrophotometer. Hydroxyproline concentrations from 0.2 to 6 µg/mL were used for a standard curve.

Agarose gel electrophoresis

The fragments of the tendons were dehydrated, and sulfated glycosaminoglycans were released from proteoglycans by digestion with a papain solution (Merck) (40 mg/g of dry tissue) containing 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, 40 mM EDTA, and 80 mM β-mercaptoethanol (Sigma) (Harab & Morão, 1989). The reaction was stopped by the addition of 4 mM iodoacetic acid (Sigma) for 1 hr. The sulfated GAGs were precipitated in ethanol and separated by agarose gel electrophoresis (0.6%) in 0.05 M propylenediamine (Sigma) according to Dietrich and Dietrich (1976).

Quantification of sulfated GAGs

The samples digested by papain solution were used to quantify the GAGs of the tendons of the different experimental groups. The quantification was determined using the dimethylmethylene blue method (Farndale *et al.*, 1986) using chondroitin sulfate as the standard. The absorbance was measured at 540 nm using an Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom, Holliston, MA, USA).

Western Blotting for Collagen I

For collagen I detection, were precipitated 10 µg of total protein from the guanidine extract, using a solution containing 1M sodium acetate buffer pH 7.4 (100 mL) and 9 volumes of ethanol (1350 mL) for 24 hours at 4 ° C. After three washes (150 mL acetate buffer 1M sodium pH 7.4 and 1350 mL of ethanol), the precipitate

obtained was dried at 37 ° C and resuspended in reducing sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 26% glycerol, 20% SDS, 0.1% Bromophenol Blue). Proteins subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide (6%) were transferred to nitrocellulose membrane, as described by Towbin (1979).

The membranes were transferred to the device Snap i.d. (Millipore). They were blocked with BIØk-CH reagent for 15 seconds and then the membranes were incubated with primary antibody (C2456 - Sigma Aldrich for collagen I) at a dilution of 1:500 for 10 minutes. The membranes were washed three times in TBS. Incubation with secondary antibody (A8786 - anti-mouse Sigma Aldrich and A2306 – anti-rabbit Sigma Aldrich) was performed for 10 minutes and washed again. The revelation was performed with DAB (dimethylaminobenzaldehyde). The band densitometry was made using the Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation).

Zymography

Metalloproteinase analyses were made according to Marquetti *et al.*, (2006). The samples were incubated in extraction buffer (Tris-HCl 50mM pH 7.4, Na Cl 0,2 M, Triton X-100 0,1%, Ca Cl 2 10mM and protease inhibitor 100µl/10mL) at 4°C for 24 hours. For MMP-2 and MMP-9 analysis were applied 20 µg of proteins in each lane of sodium dodecyl sulfate (SDS) - 10% polyacrylamide gels prepared with 2 mg/mL gelatin. Then, the gel was incubated in incubation buffer (Tris-HCl 50mM pH 8.4, 5mM de CaCl₂ e 1µM de ZnCl₂) overnight at 37°C. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and bleached (methanol solution 30% and 10% acetic acid in water). Finally, the gel was placed in shrinking solution (30% methanol and 3% glycerol). The band densitometry was made using the Scion Image software Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation).

Statistical analysis

All results were expressed as mean ± standard deviation. The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA-one-way) followed by Tukey test. The level of significance was p <0.05. The analysis was carried out in GraphPad Prism 3.0 program. It was used n=5 per group for each technique.

RESULTS

Quantification of proteins

There was a significant reduction ($p < 0.05$) in non-collagenous proteins in all groups treated with statins relative to the V group and in the S-20 group relative to the NT group (Figure 1).

Hydroxyproline quantification

The quantification of hydroxyproline (Figure 2), which indirectly measures the total collagen content in the tissue, revealed a significant increase ($p < 0.05$) in the S-20 group compared to both the NT and V groups. No significant differences were found among the other groups.

Quantification of sulfated GAGs

There was a significant increase ($p < 0.05$) in glycosaminoglycans (Figure 3) in the A-20 group compared to the NT group; additionally, the S-80 group showed a minor amount in glycosaminoglycans relative to the V group ($p < 0.05$). Statistical analysis also revealed differences between the A-20 group and the A-80 group and between the S-20 group and the S-80 group ($p < 0.05$); there were lower levels of GAGs in the groups that received dosage equivalent to 80mg/day relative to those that received dosage equivalent to 20 mg/day.

Agarose gel electrophoresis

The analysis of GAGs using agarose gels showed the presence of dermatan sulfate in all groups (Figure 4). Densitometric analysis of the bands showed no significant differences (data not shown).

Western Blotting for Collagen I

Analysis of the Western blotting for collagen I (Figure 5A) showed that the A-20 group had a smaller band than other groups. Densitometric analysis of the bands (Figure

5B) revealed a statistically significant reduction ($p < 0.05$) of collagen I in the A-20 group compared to the NT group. No significant differences were found in the other groups relative to NT group.

Zymography

In zymography, the presence of active MMP-9 and pro-MMP-9 was detected in all of the groups except for the NT group (Figure 6A). Densitometric analysis of the bands of the MMP-9 isoforms (Figure 6B) showed that groups A-80 and S-20 had significantly more pro-MMP-9 relative to the NT group ($p < 0.05$). The A-20 group showed a significant increase ($p < 0.05$) in the levels of active MMP-9 compared to the NT group. Although no significant differences were found among other groups, it is noteworthy that there was an increase in the levels of active MMP-9 in all of the groups treated with statins; moreover groups A-20 and S-20 showed higher levels of this isoform than groups A-80 and S-80.

Both active MMP-2 and pro-MMP-2 were observed in all of the groups (Figure 6A). The densitometric analysis of the bands (Figure 6C) showed a significant increase ($p < 0.05$) in pro-MMP-2 in the A-80 group and active MMP-2 in the S-20 group relative to the NT group.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Statins belong to a class of drugs prescribed for the treatment of dyslipidemia. These drugs are effective and relatively safe with few adverse effects (O'Sullivan, 2007). However, there have been reports of tendon complications because of statin therapy (Pullatt *et al.*, 2007; Marie *et al.*, 2008; Beri *et al.*, 2009; Carmont *et al.*, 2009; Nesselroade & Nickels, 2010). Therefore, in this study, we analyzed the possible biochemical changes in the Achilles tendon of rats after chronic treatment with simvastatin or atorvastatin.

In this work, allometric scaling was used to calculate the appropriate dosage of drug to administer to the rats to mimic the dosage administered in man (Pachaly and Brito, 2001). In humans, pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of statins are well established. The dosages of 20mg/day and 80mg/day were determined because they

correspond to the minimum and maximum dosages, respectively, employed in human therapy (Goodman and Gilman, 2006).

After treatment with statins, there was a significant reduction in levels of non-collagenous proteins in the tendons of the groups treated with simvastatin and atorvastatin, thus indicating protein degradation or reduced protein synthesis in tenocytes. Of note, there is an increase in protein degradation associated with tendinopathies (Karousou *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2011), and probably this protein degradation may be increased due to treatment with statins.

MMPs are enzymes that participate in the maintenance of tissue homeostasis of various organs (Malemud, 2006). The presence of MMP-2 and MMP-9 are signs of degradation and matrix remodeling, and if their activities are not properly regulated, the integrity of the tissue can be affected, which makes the tendon more susceptible to injury (Karousou *et al.*, 2008). It has been reported that simvastatin inhibits the expression of MMPs, an effect mediated by a reduction in the intermediates of the HMG-CoA reductase pathway, such as the isoprenoid farnesyl pyrophosphate and geranylgeranyl pyrophosphate. These intermediates are important in the post-translational modification of proteins such as Rho, which is present in signaling pathways for the secretion of MMPs (Turner *et al.* 2005). Nevertheless, in our study, we found an increase of pro-MMP-2 and active MMP-2 in the A-80 and S-20 groups, respectively. These groups also showed a significant increase in pro-MMP-9. *In vitro* experiments conducted by Lee *et al.* (2012) demonstrated that atorvastatin and simvastatin can increase the expression of MMP-9 in macrophages, thereby increasing the phosphorylation of MAP kinases that are involved in the signaling pathway mediated by lipopolysaccharides. Thus, depending on the cell signaling pathway and tissues involved, these drugs appear to exert different effects on the activity of MMPs.

The active isoform of MMP-9 is generally involved in inflammatory processes and tendon rupture. In these cases, there is an increase in the expression of MMP-9 (Jones *et al.*, 2006). The A-20 group showed a pronounced increase of this enzyme in comparison to the NT group. Although we did not find significant differences in the remaining groups that received statins, both active MMP-9 and pro-MMP-9 were present. An excess of MMPs proteolytic activities can lead to progressive tendon degeneration, weakening of the tendon

extracellular matrix, and a consequent reduction in the biomechanical properties of the tendon (Karousou *et al.*, 2008). Thus, based on the profile of pro-MMPs and active MMPs found in our study, an inflammatory process may have been induced by statin treatment that detrimentally affected the integrity of the tendon.

Our results showed an increase in hydroxyproline in the S-20 group, which is consistent with the analyses of total collagen content in patellar tendinopathy, in which greater amounts of hydroxyproline in lesion regions have been observed (Samiric *et al.*, 2009). The highest concentration of hydroxyproline was found in the S-20 group and may be a result of an increase in collagen fragments resulting from the increased activity of MMPs -2 and -9 (Vieira *et al.*, 2011). Furthermore, if statins caused injuries to the tendons analyzed in this study, it was expected that tenocytes would synthesize more collagen to restore the normal composition of the tendons.

Although only the A-20 group showed a significant reduction in collagen I, trend toward a reduction in collagen I in the remaining groups that received statins was observed. Morphological analysis of atherosclerotic plaques performed by Cherpachenko *et al.* (2009) showed a decrease in collagen fibers in the plaques of patients who used statins for the treatment of hyperlipidemia. In another study, it was found that simvastatin inhibited the synthesis of collagen I in smooth muscle cells, an effect that is closely related to the reduction of intermediate isoprenoids in the cholesterol synthesis pathway (Schaafsma *et al.*, 2010). Therefore, our results suggest that atorvastatin was mainly responsible for drastically inhibiting the synthesis of type I collagen in tendon. Type I collagen is the major extracellular matrix component of tendons; it forms highly oriented fibrils that confer the tensile strength of this tissue (Gelse *et al.*, 2003). Therefore, any imbalance between collagen synthesis and degradation may weaken the tissue and thereby predispose the tendon to micro damage and ruptures (Riley *et al.*, 2002).

As mentioned previously, in the A-20 group, MMP-9 showed augmented activities; therefore, the reduction of collagen type I found in the same group may be due to the proteolytic activity of this enzyme. It is important to note that collagen I is one of the substrates of the MMP-9 and that this enzyme degrades fragments of collagen after tendon rupture (Chakraborti *et al.*, 2003; Riley *et al.*, 2002).

There are no reports that statins may directly affect the synthesis of GAGs. However, in our study, we observed a greater amount of sulfated glycosaminoglycans in the A-20 group relative to the NT group. It is possible that the increased MMPs found in the A-20 group caused degradation of the collagen, thereby inducing the tenocytes to synthesize more glycosaminoglycans to assist in the repair process. A biochemical analysis of patellar tendons in chronic degenerative processes showed an increase in the synthesis and deposition of GAGs compared to normal tendons (Samiric *et al.*, 2009). Conversely, in the S-80 group there was a reduction in GAGs compared to the V group. In acute inflammation, there is a striking degradation of the extracellular matrix in the tendon, and after induction of inflammation in the rat paws, a decrease of GAGs in the deep digital flexor tendon was observed (Vieira *et al.*, 2011). Thus, our results suggest that treatment with atorvastatin and simvastatin may be involved in acute and chronic disorders of tendons.

When administered orally, statins undergo intensive first-pass metabolism in the liver, and a small proportion of the administered dose is accumulated in extra-hepatic tissues (Blum, 1994; Corsini *et al.*, 1999). Despite having a low systemic bioavailability (Schachter, 2004), our results suggest that these drugs were active in the tendons.

Finally, our results clearly suggest that statins cause remarkable changes to the extracellular matrix in the Achilles tendon. The presence of MMP-2 and MMP-9 suggest that the degradation and remodeling of the extracellular matrix were triggered. Our results provide evidence indicating that statins promote an imbalance between the synthesis and degradation of several molecules, particularly collagen I, and possibly induce micro damage in the tendons. Therefore, it is necessary to monitor all patients using statins, especially those who have tendon complications or those that have potential risk of developing tendinopathy.

FIGURES AND TABLES

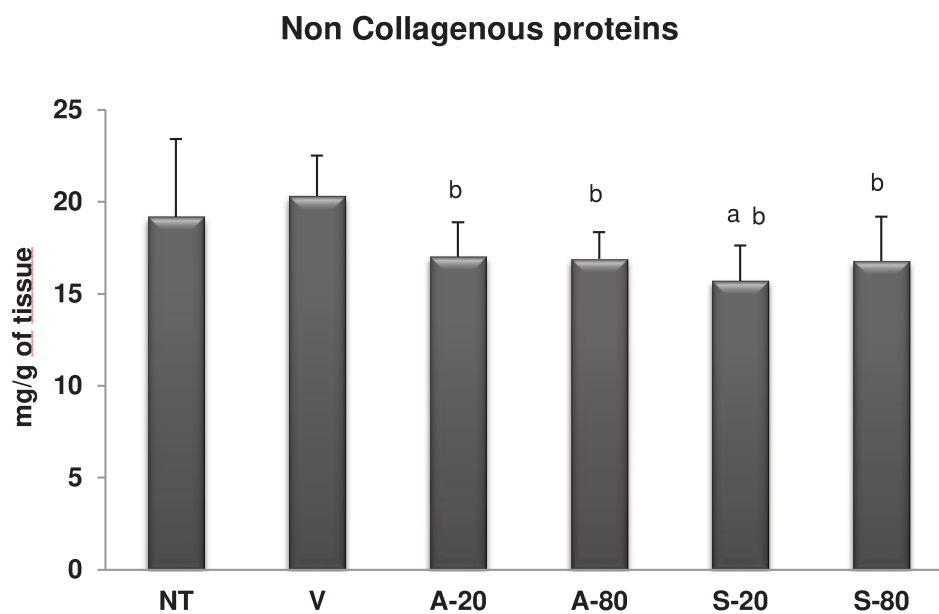


Figure 1. Concentration of non-collagenous proteins (mg/g wet tissue) in the different groups. There is a significant difference between all of the groups treated with statins compared to the V group. The S-20 group had smaller amounts of non-collagenous proteins compared to the NT group. (a) $p < 0.05$ relative to NT; (b) $p < 0.05$ relative to V.

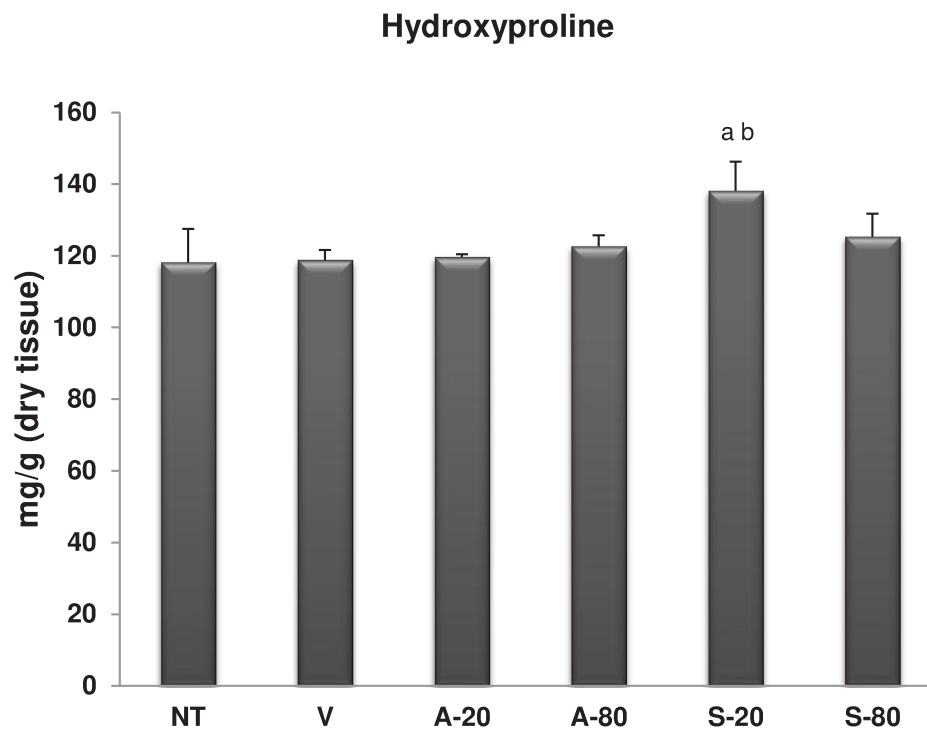


Figure 2. Concentration of hydroxyproline (mg/g dry tissue) in the different groups. A high concentration was detected in group S-20 compared to the NT and V groups. (a) $p < 0.05$ in relative to NT; (b) $p < 0.05$ in relative to V.

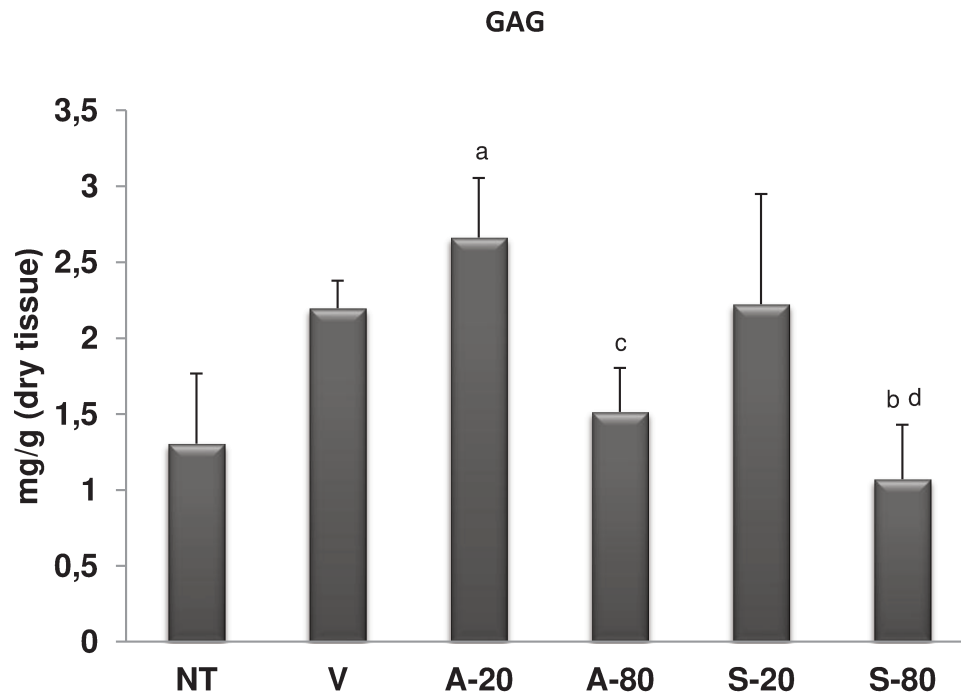


Figure 3. Concentration of sulfated glycosaminoglycans (mg/g dry tissue) in the different groups. In group A-20, there are higher concentrations of GAGs compared to the NT group. A smaller amount of GAGs was observed in groups that received statins equivalent to 80mg/day. (a) $p < 0.05$ in relative to NT; (b) $p < 0.05$ relative to V; (c) $p < 0.05$ between the A-20 and the A-80 groups; (d) $p < 0.05$ between the S-20 and S-80 groups.

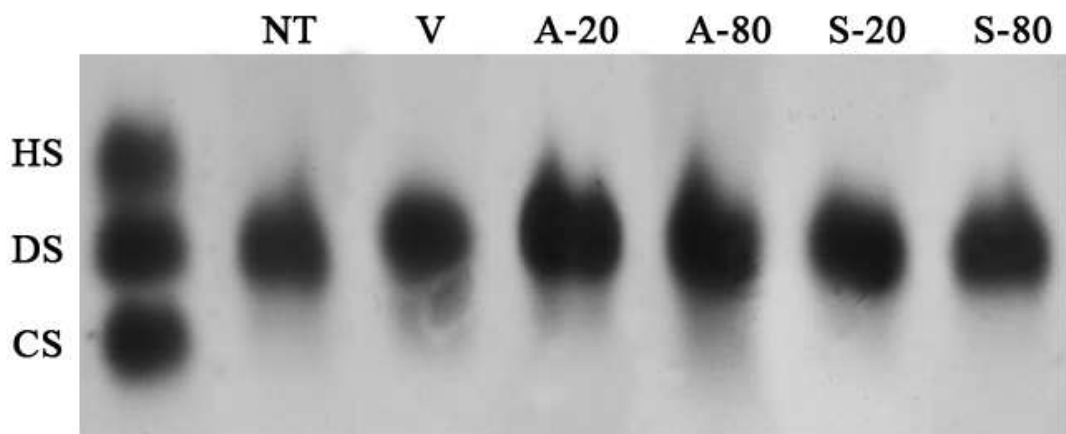


Figure 4. Agarose gel electrophoresis. HS (heparan sulfate), DS (dermatan sulfate), and CS (chondroitin sulfate) standards are shown on the left. No difference was detected between the groups after two months of treatment.

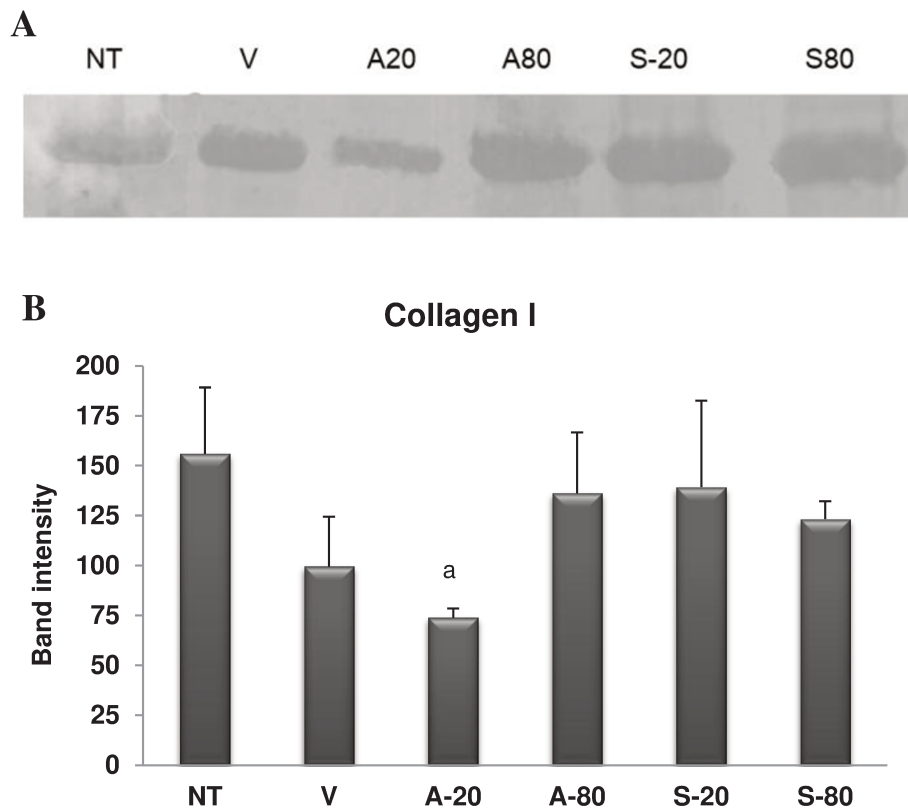


Figure 5. A: Western Blotting for collagen I. Collagen I is found in all of the groups. B: Densitometry of the bands corresponding to Collagen type I of the groups. (a) $p < 0.05$ relative to NT; Group A-20 had less type I collagen compared to group NT. When compared with group NT, all of the groups treated with statins had a tendency towards reduction of type I collagen.

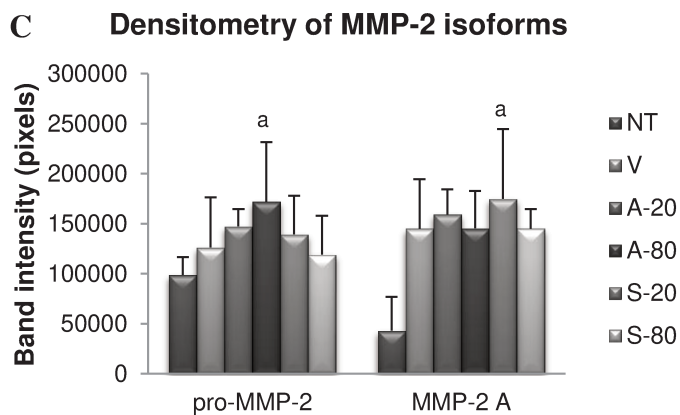
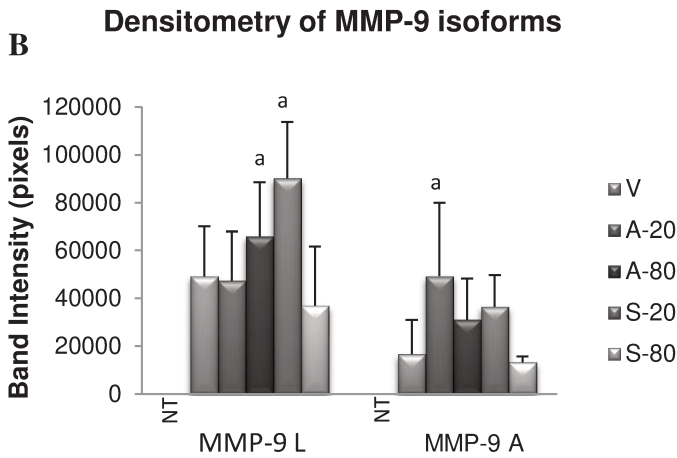
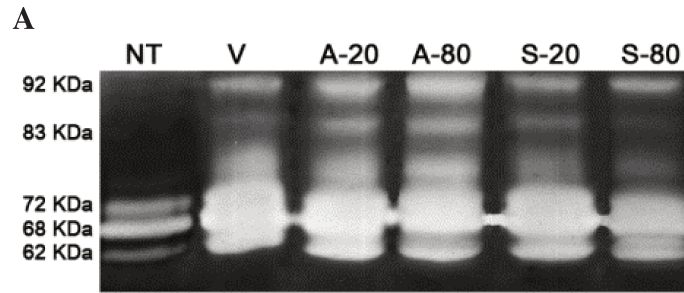


Figure 6. A: Zymography for analysis of MMP-2 and MMP-9. Observe the presence of pro-MMP-9 (92 kDa) and active MMP-9 (83 kDa) in the V, A-20, A-80, S-20 and S-80 groups. All groups studied show pro-MMP-2 (72 and 68 kDa) and active MMP-2 (62 kDa). B: Densitometry of the bands corresponding to the MMP-9 isoforms. The activity of pro-MMP-9 is elevated in the A-80 and S-20 groups compared to the NT group; a higher value was observed for the active MMP-9 in the A-20 group compared to the NT group. C: Densitometry of the bands corresponding to the MMP-2 isoforms; pro-MMP-2 is more

active in the A-80 group when compared to the NT group and active MMP-2 shows increased activity in the S-20 group. (a) $p < 0.05$ relative to NT.

REFERENCES

BERI, A.; DWAMENA, F.C.; DWAMENA, B. A. Association Between Statin Therapy and Tendon Rupture: A Case–Control Study. **J Cardiovasc Pharmacol.** 53: 401–404, 2009.

BLUM, C. B. Comparison of Properties of Four Inhibitors of 3-Hydroxy-3 Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. **Am J Cardiol.** 73: 3D-11D, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** 72: 248-254, 1976.

CAMERINO, G. M.; PELLEGRINO, M. A.; BROCCA, L.; DIGENNARO, C.; CAMERINO, D. C.; PIERNO, S.; BOTTINELLI, R. Statin or fibrate chronic treatment modifies the proteomic profile of rat skeletal muscle. **Biochem Pharmacol.** 1-11, 2011.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Hypolipemic statins and new therapeutic trends. **Quim. Nova.** 30(2): 425-430, 2007.

CARMONT, M. R.; HIGHLAND, A. M.; BLUNDELL, C. M.; DAVIES, M.B. Simultaneous bilateral Achilles tendon ruptures associated with statin medication despite regular rock climbing exercise. **Physical Therapy in Sport.** 10: 150–152, 2009.

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, M.; DAS, S.; MANDAL, A.; CHAKRABORTI, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol Cell Biochem.** 253: 269-85, 2003.

CHAZERAIN, P.; HAYEM, G.; HAMZA, S.; BEST, C. ZIZA, J. Four cases of tendinopathy in patients on statin therapy. **Joint Bone Spine.** 68: 430-3, 2001.

CHERPACHENKO, N.M.; DROBKOVA, I.P.; ZHDANOV, V.S. Morphological manifestations of the pleiotropic effect of statins on the human aorta in atherosclerosis. **Arkh Patol.** 71(4): 26-30, 2009.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics.** 84: 413–428, 1999.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal Biochem.**70: 645-647, 1976.

FARNDALE, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethyleneblue. **Biochim Biophys Acta.** 883: 173-177, 1986.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev.** 28;55(12): 1531-46, 2003.

GIUSTI-PAIVA, A.; MARTINEZ, M. R.; FELIX, J. V. C.; ROCHA, M. J. A.; CARNIO, E. C.; ELIAS, L. L. K.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Simvastatin decreases Nitric Oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Schok.** 21(3): 271-275, 2004.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. (eds.). Pharmacological therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia In: GILMAN, A. G. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11^a Ed. 2006. cap. 36, p. 837-868.

HARAB, R.C.; MORÃO, P.A.S. Increase of chondroitin sulfate concentration in the endochondral ossification cartilage of normal dogs. **Biochim. Biophys. Acta.** 992: 237-240, 1989.

HEINERGARD, D.; SOMMARIN. Isolation and characterization of proteoglycans. **Methods in Enzymol.** 144: 319-373, 1987.

HOFFMAN, K. B.; KRAUS, C.; DIMBIL, M.; GOLOMB, B. A. A Survey of the FDA's AERS Database Regarding Muscle and Tendon Adverse Events Linked to the Statin Drug Class. **PLoS ONE.** 7(8): e42866.

IZIDORO-TOLEDO, T. C.; GUIMARÃES, D. A.; BELO, V. A.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Effects of statins on matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in human endothelial cells. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.** 383: 547–554, 2011.

JADHAV, S. B.; JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 58: 3-18, 2006.

JONES, C.G.; CORPS, A. N.; PENNINGTON, C. J.; CLARK, I. M.; EDWARDS, D. R.; BRADLEY, M. M.; HAZLEMAN, B. L.; RILEY, G. P. Expression Profiling of Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Normal and Degenerate Human Achilles Tendon. **Arthritis & Rheumatism.** 54(3): 832–842, 2006.

JORGE MP, MADJAROF C, RUIZ ALTG, FERNANDES AT, RODRIGUES RAF, SOUSA IMO, et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica Verlot* extract. **J Ethnopharmacol.** 188: 361–6, 2008.

KAMIO, K.; LIU, X.D.; SUGIURA, H.; TOGO, S.; KAWASAKI, S.; WANG, X.; AHN, Y.; HOGABOAM, C.; RENNARD, S.I. Statins inhibit matrix metalloproteinase release from human lung fibroblasts. **Eur Respir J.** 35: 637–646, 2010.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports.** 10: 312–320, 2000.

KAROUSOU, E.; RONGA, M.; VIGETTI, D.; PASSI, A.; MAFFULLI, N. Collagens, Proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in Human Achilles Tendon Rupture. **Clin Orthop Relat Res.** 466: 1577–1582, 2008.

LEE, D. K.; PARK, E. J.; KIM, E. K.; JIN, J.; KIM, J. S.; SHIN, I. J.; KIM, B. Y.; LEE, H.; KIM, D. E. Atorvastatin and simvastatin, but not pravastatin, up-regulate LPS-induced MMP-9 expression in macrophages by regulating phosphorylation of ERK and CREB. *Cell Physiol Biochem.* 30(3): 499-511, 2012.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 45: 89-118, 2005.

MALEMUD, C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. **Frontiers in Bioscience.** 11: 1696-1701, 2006.

MARQUETI RC, PARIZOTTO NA, CHRIGUER RS, PEREZ SEA, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. **The American Journal of Sports Medicine.** 34(8): 1274-1280, 2006.

MARIE, I.; DELAFENÊTRE, H.; MASSY, N.; THUILLEZ, C.; NOBLET, C.; Tendinous Disorders Attributed to Statins: A Study on Ninety-Six Spontaneous Reports in the Period 1990–2005 and Review of the Literature. **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research).** 59(3): 367–372, 2008.

MARIE, I.; NOBLET, C. Drug-associated tendon disorders: After fluoroquinolones... here are statins! **La Revue de médecine interne.** 30: 307–310, 2009.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current Perspectives on Statins. **Circulation.** 101: 207-213, 2000.

NESSELROADE, R. D.; NICKELS, L. C. Ultrasound Diagnosis of Bilateral Quadriceps Tendon Rupture After Statin Use. **West J Emerg Med.** 11(4): 306-309, 2010.

O'SULLIVAN, S. Statins: A review of benefits and risks. **TSMJ.** v.8, p. 52-56, 2007.

PACHALY, J. R.; BRITO, H.F.V. Interspecific Allometric Scaling. In: Fowler ME, Cubas P.R. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**, Ames. 1^a ed. Iowa University Press; 2001. p.475-481.

PULLATT, R. C.; GADARLA, M. R.; KARAS, R. H.; ALSHEIKH-ALI, A. A.; THOMPSON, P. D. Tendon Rupture Associated With Simvastatin/Ezetimibe Therapy. **Am J Cardiol.** 100: 152–153, 2007.

RILEY, G. P.; CURRY, V.; DEGROOT, J.; VAN EL, B.; VERZIIL, N.; HAZLEMAN, B. L.; BANK, R. A. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. **Matrix Biology.** 21: 185–195, 2002.

RUBIN, G.; HADDAD, E.; BEN-HAIM, T.; ELMALACH I.; ROZEN, N. Bilateral, simultaneous rupture of the quadriceps tendon associated with simvastatin. **IMAJ.** 13: 185, 2011.

SAMIRIC, T.; PARKINSON, J. ILIC, M. Z.; COOK, J.; FELLER, J. A. HANDLEY, C. J. Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. **Matrix Biology.** 28: 230–236, 2009.

SAVVIDOU, C.; MORENO, R. Spontaneous Distal Biceps Tendon Ruptures: are they related to statin administration? **Hand Surgery.** 17: 167-171, 2012.

SCHAAFSMA, D.; DUECK, G.; GHAVAMI, S.; KROEKER, A.; MUTAWE, M. M.; HAUFF, K.; XU, F. Y.; MCNEILL, K. D.; UNRUH, H.; HATCH, G. M.; HALAYKO, A.

J. The Mevalonate Cascade as a Target to Suppress Extracellular Matrix Synthesis by Human Airway Smooth Muscle. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 44: 394–403, 2011.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** 19: 117–125, 2004.

STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin Chim Acta.** 18(2): 267-273, 1967.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 76(9): 4350-4354, 1979.

TURNER, N. A.; O'REGAN, D.J.; BALL, S. G.; PORTER, K. E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 Mrna levels. **The FASEB Journal.** 1-25, 2005.

VIEIRA, C. P.; ARO, A. A.; ALMEIDA, M.S.; MELLO, G. C.; ANTUNES, E.; PIMENTEL, E. R. Effects of Acute Inflammation Induced in the Rat Paw on the Deep Digital Flexor Tendon. **Connective Tissue Research,** 1: 1-9, 2011.

YANG, L.; GAO, Y. J.; LEE, R. M. The effects of quinapril and atorvastatin on artery structure and function in adult spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol.** 518: 145-151, 2005.

YOKOTA, K.; MIYOSHI, F.; MIYAZAKI, T.; SATO, K.; YOSHIDA, Y.; ASANUMA, Y.; AKIYAMA, Y.; MIMURA, T. High concentration simvastatin induces apoptosis in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** 35: 193-200, 2008.

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E BIOMECÂNICAS EM TENDÃO CALCANEAR
DE RATOS APÓS TRATAMENTO COM ESTATINAS**

Nomes dos autores: L. P. Oliveira¹; C. P. Vieira¹; F. R. Guerra¹; M. S. Almeida¹; E. R. Pimentel¹.

Endereço dos autores: ¹ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Autor correspondente: Letícia Prado de Oliveira, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, CP 6109; 13083-970, Campinas, SP, Brasil. *Telefone:* 55 (19) 3521-6117 / 55 (19) 3521-6115
e-mail: leprado.farm@gmail.com

RESUMO

As estatinas são medicamentos prescritos para o tratamento de hipercolesterolemia e geralmente não apresentam efeitos colaterais. Casos de tendinopatias e rupturas de tendão têm sido reportados como efeitos adversos associados ao uso de estatinas. Neste trabalho foram avaliadas possíveis alterações nas propriedades estruturais e biomecânicas de tendões de ratos submetidos ao tratamento crônico com estatinas. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: tratados com a atorvastatina (A-20 e A-80), sinvastatina (S-20 e S-80), carboximetilcelulose utilizado como veículo (V) e um grupo que não recebeu tratamento (ST). As doses de atorvastatina e sinvastatina foram calculadas utilizando extrapolação alométrica, com base nas doses de 20mg/dia e 80 mg/dia recomendadas para os seres humanos. Os ratos foram sacrificados após dois meses de tratamento e os tendões foram coletados para análises morfológicas e ensaios biomecânicos. Para as análises morfológicas em microscopia de luz os cortes de tendões foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) e Azul de Toluidina (AT). Foram realizadas também medidas de birrefringência através da microscopia de polarização. Nos grupos A-80 e S-80 a região de compressão apresentou uma metacromasia menos acentuada. As medidas de birrefringência dos grupos A-20, A-80 e S-80 revelaram um menor grau de organização das fibras de colágeno em relação ao grupo V. Durante os ensaios biomecânicos os tendões dos grupos A-20, A-80 e S-20 foram menos resistentes à ruptura. Portanto, as estatinas se mostraram prejudiciais após uma exposição prolongada, afetando a organização das fibras de colágeno e diminuindo a resistência biomecânica dos tendões, tornando-os mais predispostos a rupturas.

Sinvastatina, atorvastatina, colágeno, birrefringência

INTRODUÇÃO

As estatinas são análogos estruturais do 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), e sua função é inibir competitivamente a enzima HMG-CoA redutase, responsável pelo primeiro passo da via de biossíntese do colesterol (CAMPO & CARVALHO, 2007). Ao reduzir os níveis intracelulares de colesterol, ocorre uma maior expressão receptores de LDL (low-density lipoprotein) em células do fígado, levando a um aumento da captação de LDL da corrente sanguínea (SCHACHTER, 2004). As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana (FONSECA, 2005).

Em geral, as estatinas são bem toleradas e efeitos adversos graves são raros (BELTOWSKI *et al.*, 2009). Porém, alguns efeitos de menor gravidade são mais comuns, dentre eles podemos citar: desconforto gastrointestinal, perturbações no sono e aumento transitório de enzimas hepáticas (KIORTSIS *et al.*, 2007; O’SULLIVAN, 2007). O efeito adverso mais grave associado à terapia com estatinas é a miopatia, que se progredir para rabdomiólise pode ser fatal (SCHACHTER, 2004). Recentemente, muitos estudos associam o uso de estatinas com casos de tendinites e rupturas de tendão que, muitas vezes, não são devidamente reportados aos órgãos de farmacovigilância (CHAZERAIN, *et al.*, 2001; MARIE & NOBLET, 2009; NESSELROADE & NICKELS, 2010; RUBIN *et al.*, 2011; SAVVIDOU & MORENO, 2012).

As estatinas que parecem estar mais associadas com desordens em tendões são a atorvastatina e sinvastatina e o tendão calcâneo aparece como um dos tendões mais acometidos por lesões (MARIE *et al.*, 2008). Foi relatado que as estatinas são responsáveis por inibir a síntese de colágeno I em células musculares lisas (SCHAAFSMA *et al.*, 2010). O colágeno I é o principal constituinte da matriz extracelular de tendões, forma fibras bem orientadas, arrançadas em fascículos que conferem força e resistência aos tendões (WANG, 2006). Além disso, já foi demonstrado que as estatinas inibem a síntese e a atividade de metaloproteinases (MMPs) (TURNER *et al.*, 2005), enzimas responsáveis pela manutenção da homeostase da matriz extracelular de tendões (DAHLGREN, 2007).

Pouco se conhece a respeito do efeito das estatinas sobre os tendões e, atualmente, não existem investigações que correlacionem o uso destes medicamentos com as propriedades biomecânicas do tendão calcâneo. Do mesmo modo, os mecanismos pelos quais estes fármacos provocam desordens em tendões não estão bem esclarecidos.

Portanto, sabendo que muitos casos de tendinites e rupturas de tendões estão associados ao uso de estatinas e que estes medicamentos afetam a síntese de componentes fundamentais da matriz extracelular de tendões, no presente estudo foram avaliadas possíveis alterações estruturais e biomecânicas no tendão calcâneo de ratos Wistar, após tratamento crônico com inibidores de HMG-CoA redutase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupos experimentais

Os cuidados com os animais estiveram de acordo com a Convenção Européia para a Proteção dos Animais Vertebrados utilizados para fins experimentais ou outros fins científicos e é consistente com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), além de ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil e arquivado sob o n ° 2473-1.

Foram utilizados 110 ratos Wistar, machos, com 45 dias, pesando em média 300 gramas. Os ratos tiveram livre acesso à ração e água e foram mantidos num ciclo de claro:escuro de 12 h a 23°C.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: ratos tratados com atorvastatina (A-20 e A-80), sinvastatina (S-20 e S-80, que receberam doses diárias equivalentes a 20mg e 80mg da respectiva estatina, grupo veículo (V) que recebeu solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5% utilizado para administrar as estatinas; e o grupo sem tratamento (ST). O tratamento teve a duração de dois meses e foi utilizada gavagem para a administração das soluções (CAMERINO *et al.*, 2011).

Para calcular a dose dos medicamentos foi utilizado o cálculo de extrapolação alométrica (PACHALY & BRITO, 2001), levando em consideração a taxa metabólica do

animal. Dessa forma, é necessário ter como referência um animal modelo cujos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos do medicamento de interesse sejam conhecidos. Neste estudo, tomamos como animal modelo o homem e como animal alvo, ratos da linhagem Wistar. Depois de dois meses de tratamento os animais foram sacrificados por overdose de anestesia inalatória com Isoflurano, e os tendões foram retirados para análises morfológicas e testes biomecânicos.

Análises em microscopia de luz

Os tendões (n = 3) foram fixados com formaldeído a 4% em tampão Millonig (0,13 M fosfato de sódio, 0,1 M de NaOH, pH 7,4) durante 24 horas a 4°C. Em seguida, os tendões foram lavados em água, desidratados com etanol, diafanizados com xilol e embebidos em parafina (Histosec). Foram obtidos cortes longitudinais seriados de 7 µm de espessura.

Para uma visualização geral do tecido alguns cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) e outros com Azul de Toluidina (AT) (0.025%) em tampão McIlvaine (0.03M ácido cítrico, 0.04 M fosfato de sódio dibásico - pH 4.0). As secções foram analisadas com microscópio de luz Olympus BX53.

A birrefringência foi analisada com microscópio de polarização Olympus BX53 e as imagens foram capturadas e analisadas usando o analisador de imagens cellSens Dimension 1.6. Para a aquisição das imagens os cortes foram posicionados a 45° em relação ao polarizador e ao analisador. Foi avaliada a frequência do valor da média de cinza em pixels nas áreas analisadas. Quanto maior o valor em pixels, maior é a intensidade da birrefringência e, portanto, maior é a organização das fibras de colágeno. As medidas de cada grupo experimental foram feitas após a imersão dos cortes em água, uma condição na qual a birrefringência total é altamente detectável (VIDAL, 1980, 1986; VIDAL & MELLO, 2010).

Ensaio biomecânicos

Os testes foram realizados em um texturômetro, modelo TAXT2, marca Micro Stable Systems, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia

de Alimentos da UNICAMP, segundo Almeida *et al.* (2009). Foram utilizados cinco tendões de cada grupo. Os tendões foram mantidos em solução fisiológica até o momento do teste. Antes do teste, o comprimento, largura e espessura dos tendões foram medidos com um paquímetro, sendo que os dois últimos foram determinados no ponto médio da região distal de cada tendão, e a área da secção transversal foi calculada a partir destas medições. Adaptadores de metal acoplados ao equipamento prenderam os tendões por suas extremidades.

Durante o ensaio, os tendões foram submetidos a um aumento gradual de carga, a uma taxa constante de deslocamento de 1 mm/s, utilizando-se uma carga de 5 N até que o tendão fosse rompido. A tensão (MPa) foi calculada pela relação entre a carga (N) e a área de secção transversal (mm²). O deslocamento máximo foi determinado até o momento que o tendão pode resistir antes de romper.

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados da biomecânica foram analisados utilizando a ANOVA-one-way seguida pelo teste de Tukey. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise das medidas de birrefringência. O nível de significância foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 3.0.

RESULTADOS

O aspecto geral dos tendões pode ser visualizado nos cortes corados com HE (Figura 1), onde se observa que os grupos A-20, S-20 e S-80 apresentaram uma coloração mais pálida da matriz extracelular em comparação com o grupo ST, V e A-80. A análise dos cortes corados com AT (Figura 2) mostrou pouca diferença estrutural nas regiões de tensão dos tendões dos diferentes grupos, mas na região de compressão, onde ocorre maior presença de proteoglicanos, foram encontradas diferenças nos grupos S-20 e S-80, que apresentaram uma metacromasia menos acentuada quando comparados aos demais grupos.

A intensidade de birrefringência dos cortes foi medida em média de cinza e revelou diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 3). O grupo S-20 apresentou

maior birrefringência quando comparado com os grupos ST e V. Na figura 4 podem ser observadas áreas mais brilhantes no grupo S-20, indicando maior organização e agregação do colágeno. Nos grupos A-20, A-80 e S-80 as medidas de birrefringências foram significativamente mais baixas quando comparadas àquela encontrada no grupo V (Figura 3). Isto é evidenciado na figura 4, onde se pode observar um brilho menos intenso nestes grupos.

Nos testes biomecânicos não houve diferenças significativas com relação aos dados de deslocamento máximo e área transversal dos tendões entre os grupos estudados (Figuras 5A e 5B). A carga máxima (Figura 5C) foi estatisticamente menor nos grupos V, A-20, A-80 e S-20 comparados ao grupo ST. No que diz respeito à tensão máxima (Figura 5D), os grupos A-20, A-80 e S-20 foram significativamente menores comparados a ST. O grupo S-80 apresentou valores estatisticamente maiores em relação a S-20.

DISCUSSÃO

O uso de inibidores de HMG-CoA redutase implica em um risco de desenvolver desordens musculares como, por exemplo, rabdomiólise, uma condição patológica grave e muitas vezes assintomática (BALLANTYNE *et al.*, 2003). Recentemente, têm sido reportados efeitos adversos relacionados a casos de rupturas de tendão e tendinopatias (MARIE & NOBLET, 2009; NESSELROADE & NICKELS, 2010; RUBIN *et al.*, 2011; SAVVIDOU & MORENO, 2012). Estas lesões em tendões são mais frequentemente associadas ao uso de sinvastatina e atorvastatina, duas das estatinas mais utilizadas no tratamento de hipercolesterolemia (MARON *et al.*, 2000; MARIE *et al.*, 2008). Alguns estudos ainda indicam que o tendão calcâneo parece ser um dos sítios mais afetados pelas estatinas (CHAZERAIN, *et al.*, 2001; BERI *et al.*, 2009; CARMONT *et al.*, 2009).

As doses de estatinas utilizadas neste trabalho foram determinadas pelo cálculo de extrapolação alométrica (PACHALY & BRITO, 2001), adequando as doses dos medicamentos para os ratos, tomando como animal modelo o homem. As doses mínima e máxima recomendada na terapêutica em humanos são, respectivamente, de 20mg/dia e

80mg/dia e, portanto, foram as doses empregadas nos cálculos (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Em cortes de tendões normais corados com HE observa-se que a cor do colágeno é rosa avermelhado, mas em condições degenerativas, o colágeno apresenta uma coloração aparentemente mais pálida (TALLON *et al.*, 2001; MAFULLI *et al.*, 2012). Dessa forma, as características morfológicas encontradas nos grupos A-20, S-20 e S-80 são similares àquelas encontradas em processos degenerativos de tendões.

A observação de cortes corados com AT indica uma aparente redução de metacromasia grupos A-80 e S-80 quando comparados com os grupos ST e V, indicando uma possível redução de glicosaminoglicanos na região de compressão de tendões destes grupos. A metacromasia ocorre quando os radicais negativos presentes nos glicosaminoglicanos se associam com a molécula de azul de toluidina, de tal modo que o corante passa a absorver luz em comprimentos de onda diferentes, fazendo com que o corante mude de cor, sem mudar a sua estrutura química (SRIDHARAN & SHANKAR, 2012). Vieira e colaboradores (2012) induziram inflamação na pata de ratos e observaram uma extensa degradação de moléculas da matriz extracelular do tendão flexor digital profundo, sendo que o conteúdo de glicosaminoglicanos sofreu uma redução significativa. Neste sentido, é possível que os tendões dos grupos A-80 e S-80 tenham sofrido uma redução do conteúdo de glicosaminoglicanos principalmente na região de compressão, devido ao desenvolvimento de um processo inflamatório após o uso prolongado de estatinas.

Estudos sugerem que as tendinopatias do tendão calcâneo resultam em um tendão mecanicamente mais fraco, predisposto a rupturas (JAMES *et al.*, 2008; ARYA & KULIG, 2010; VOLETI *et al.*, 2012). Neste trabalho, os ensaios biomecânicos permitiram medir tensão máxima e a carga máxima suportada pelos tendões e assim, estabelecer uma comparação do efeito das estatinas nos tendões dos diferentes grupos. Os baixos valores de tensão e carga máximas encontrados nos grupos A-20, A-80 e S-20 sugerem que o tratamento com estatinas foi prejudicial às propriedades biomecânicas dos tendões, deixando-os mais susceptíveis à rupturas. Ainda não se sabe por que o grupo V apresentou baixos valores de carga máxima quando comparado ao grupo ST, tendo em vista que o

grupo V recebeu somente uma solução de carboximetilcelulose 0,5% que serviu de veículo para administração das estatinas. Estudos conduzidos por Shelanski & Clark (1948) mostram que a carboximetilcelulose é um agente fisiologicamente inerte e não tóxico e, portanto, não é esperado que provocasse alterações no tendão. Além disso, a análise bioquímica de tendões de grupos que receberam veículo não revelou nenhuma alteração na matriz extracelular destes tendões. Sendo assim, mais estudos são necessários para investigar o ocorrido nos ensaios biomecânicos.

Uma das propriedades anisotrópicas das fibras de colágeno é a birrefringência (VIDAL, 1986). Em diversos estudos a birrefringência vem sendo utilizada para mensurar o grau de organização das fibras colágenas (ARRUDA *et al.*, 2007; TOMIOSSO *et al.*, 2009; VIDAL & MELLO, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2012; ARO *et al.*, 2012). Nossos resultados de medidas de birrefringência revelaram que o tratamento com atorvastatina nas doses equivalentes a 20mg/dia e 80mg/dia e sinvastatina equivalente a 80mg/dia prejudicaram a organização das fibras de colágeno no tendão. Em tendinopatias do tendão calcâneo foi reportado que tendões observados ao microscópio de polarização possuíam birrefringência reduzida em relação aos tendões normais, com a perda do arranjo paralelo dos feixes de colágeno (KHAN *et al.*, 1999; MAFULLI *et al.*, 2012). Nossos resultados também são consistentes com análises histopatológicas de tendões que sofreram lesões, onde foi observada uma notável desorganização das fibras de colágeno (XU & MURRELL, 2008; MAFULLI *et al.*, 2012). Sendo assim, com base em nossos resultados, é possível inferir que o tratamento com estatinas desencadeou um processo degenerativo no tendão calcâneo de ratos.

Durante o reparo do tendão a matriz extracelular assume um aspecto desorganizado, resultando em um tendão com propriedades biomecânicas inferiores às de um tendão intacto (JAMES *et al.*, 2008; VOLETI *et al.*, 2012). A análise de birrefringência revelou uma desorganização das fibras de colágeno nos grupos A-20, A-80 e S-80 e nos testes biomecânicos, estes mesmos grupos sofreram ruptura mais facilmente. Estes resultados sugerem que os tendões de grupos tratados com estatinas poderiam estar sob um processo de reparo de sua matriz extracelular após uma possível lesão causada pelos medicamentos. Apesar do grupo S-20 apresentar uma melhor organização das fibras de colágeno, este foi o

grupo que apresentou a menor resistência durante os testes biomecânicos. Uma vez que a resistência dos tendões está diretamente relacionada ao alto grau de organização e agregação do colágeno (VILARTA & VIDAL, 1989), este resultado ainda não está claro e, portanto, mais análises devem ser realizadas para encontrar uma possível explicação para isso.

Uma análise bioquímica realizada anteriormente em nosso laboratório revelou que as estatinas foram responsáveis por notáveis alterações em componentes da matriz extracelular de tendões como, por exemplo, metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), glicosaminoglicanos e colágeno. Portanto, fica evidente que a ação direta das estatinas sobre a matriz extracelular dos tendões parece ser a principal causa de toxicidade observada no presente trabalho.

As propriedades farmacocinéticas das estatinas apresentam consideráveis diferenças entre si (FONSECA, 2005). Após a administração oral, as estatinas apresentam uma biodisponibilidade relativamente baixa, uma alta ligação a proteínas plasmáticas e um intenso metabolismo hepático (SCHACHTER, 2004). Ainda que os tecidos extra-hepáticos estejam expostos a uma pequena fração do medicamento (CORSINI *et al.*, 1999), todos os resultados encontrados oferecem indícios de que as estatinas prejudicam a estrutura e a biomecânica de tendões. Além disso, vale ressaltar que a atorvastatina e sinvastatina possuem metabólitos ativos (FONSECA, 2005), que também podem gerar danos à matriz extracelular de tendões.

Dado o exposto, este trabalho demonstrou que o tratamento com estatinas afeta negativamente os tendões. O prejuízo das propriedades biomecânicas e a desorganização das fibras de colágeno fazem com que os tendões se tornem mais predispostos a rupturas, oferecendo risco de lesões aos usuários de estatinas. Assim sendo, durante o tratamento com algum medicamento desta classe de hipolipemiantes, os pacientes devem ser cuidadosamente monitorados quanto a sinais e sintomas relacionados à tendinopatia. Estudos futuros devem ser realizados para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia dos tendões submetidos ao tratamento com estatinas. Além disso, é necessário verificar se todas as estatinas têm o mesmo potencial de desencadear complicações em tendões.

FIGURAS

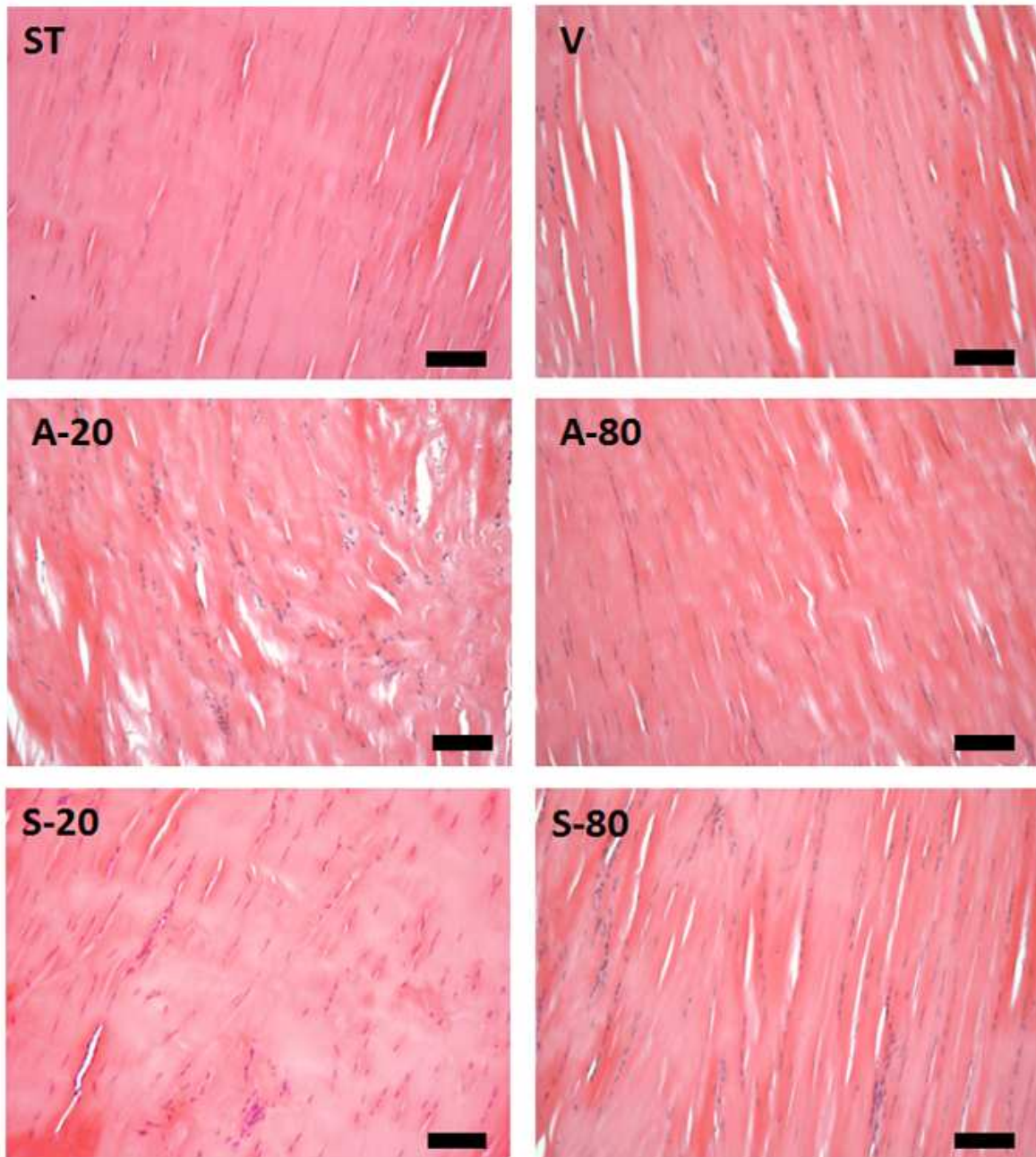


Figura 1. Cortes longitudinais da região de tensão de tendões corados com hematoxilina-
eosina (HE). Observa-se uma coloração mais pálida da matriz extracelular nos grupos A-
20, S-20 e S-80 em relação aos grupos ST e V. Barras: 100 μ m.

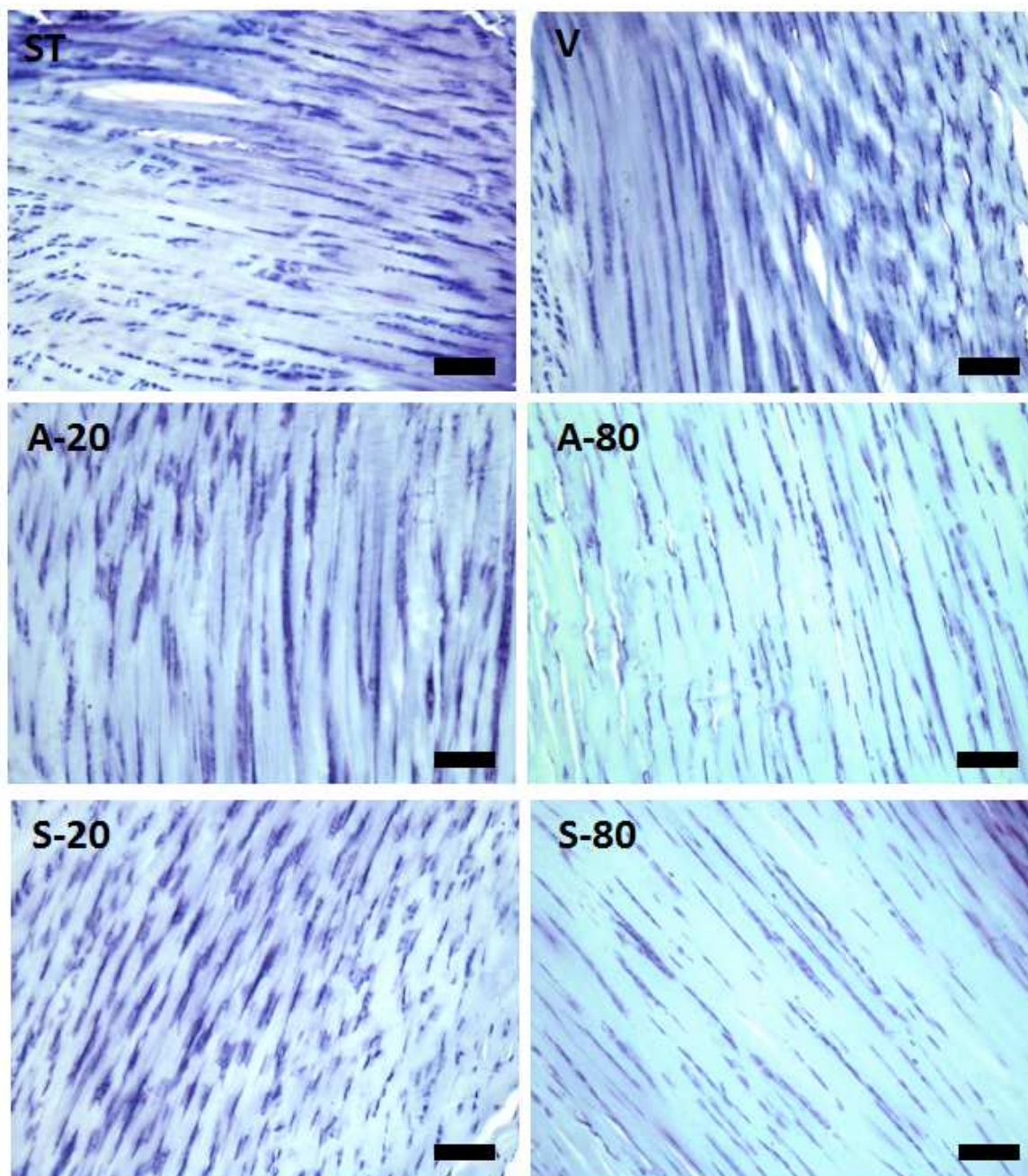


Figura 2. Cortes longitudinais da região de compressão de tendões corados com azul de toluidina (AT). Notar uma metacromasia menos acentuada nos grupos A-80 e S-80 em relação aos demais grupos. Barras: 100 μ m.

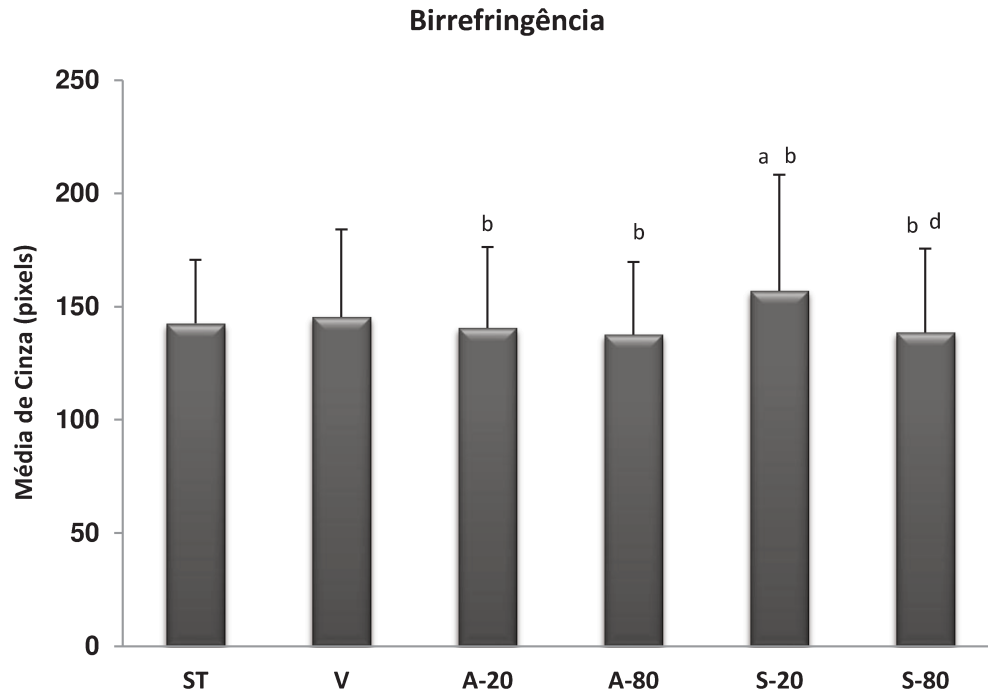


Figura 3. Valores da média de cinza da birrefringência obtidos das fibras de colágeno dos tendões após o eixo longo dos mesmos ter sido posicionado a 45° em relação ao plano da luz polarizada. Os grupos A-20, A-80 e S-80 apresentaram valores menores quando comparados a V. O grupo S-20 apresentou valores maiores comparados aos grupos ST, V e S-80. (a) $p < 0,05$ em relação a ST; (b) $p < 0,05$ em relação a V; (d) $p < 0,05$ entre S-20 e S-80.

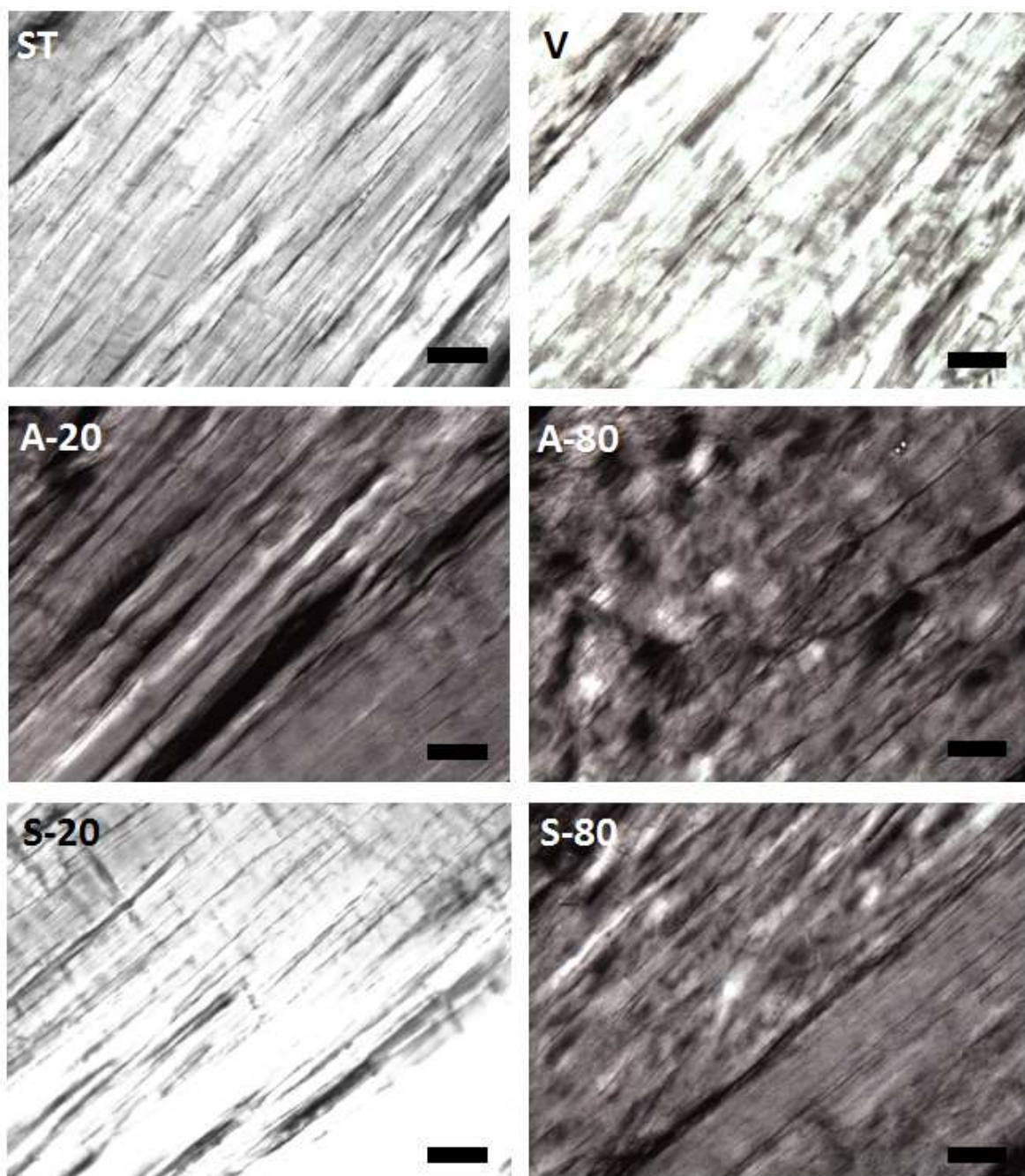


Figura 4. Imagens do brilho de birrefringência das fibras colágenas de seções de tendão usando microscopia de polarização. Os eixos maiores dos tendões foram orientados a 45° em relação ao plano da luz polarizada. Os grupos A-20, A-80 e S-80 apresentaram menor intensidade de birrefringência em relação ao grupo V. O grupo S-20 apresentou maior intensidade de birrefringência em comparação com os demais grupos. Barras: 100 μm .

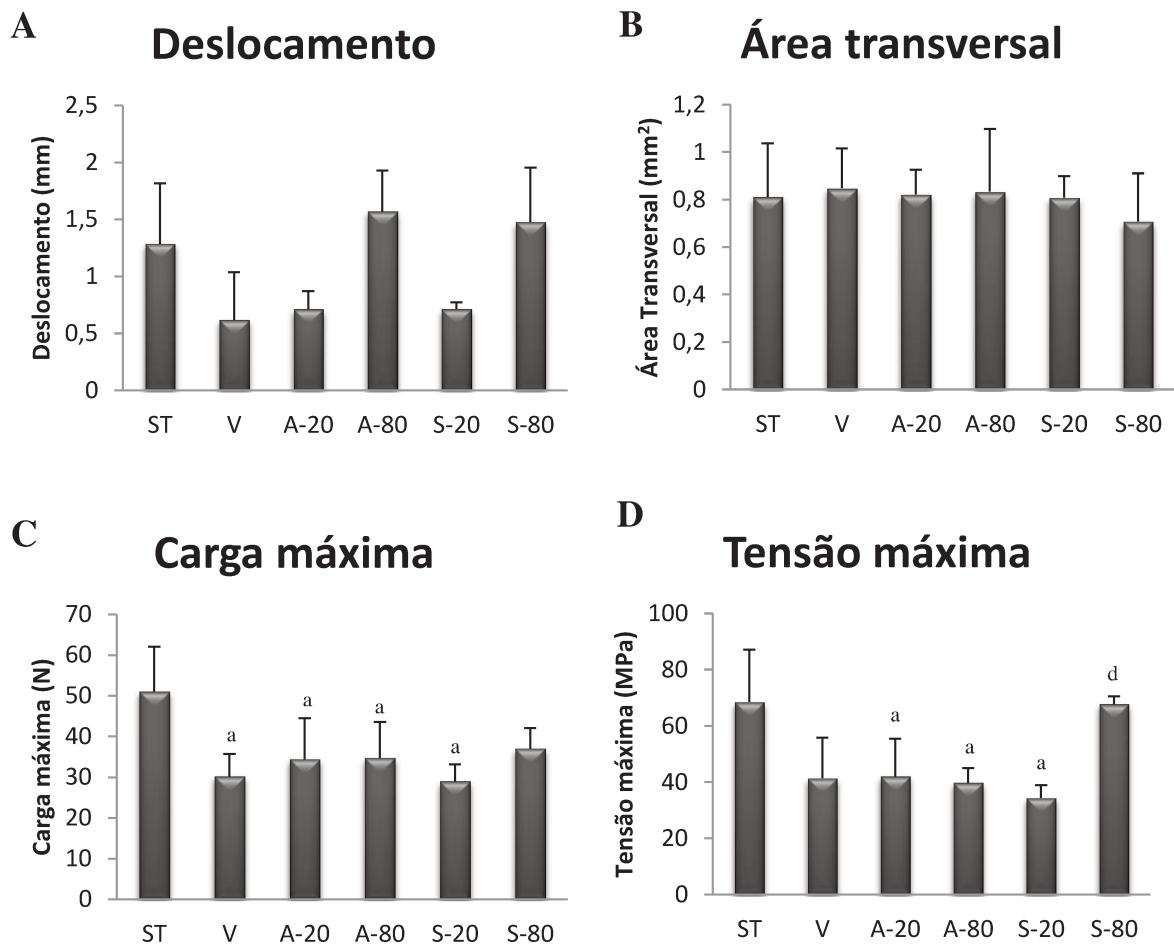


Figura 5. Propriedades biomecânicas dos tendões calcaneares dos diferentes grupos. Não foram encontradas diferenças significativas na área transversal e no deslocamento. A carga e tensão máximas foram menores nos tendões dos grupos V, A-20, A-80 e S-20 quando comparados a ST. Houve também diferenças significativas na tensão máxima entre os grupos S-20 e S-80. (a) $p < 0,05$ em relação a ST; (d) $p < 0,05$ entre S-20 e S-80.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. M.; TOMIOSSO, T. C.; NAKAGAKI, W. R.; GOMES, L.; MATIELLO-ROSA, S. M. G.; PIMENTEL, E. R. Effects of Passive Stretching on the Biochemical and Biomechanical Properties of Calcaneal Tendon of Rats. **Connective Tissue Research**. 50: 279–284, 2009.

ALMEIDA, M. S.; ARO, A. A.; GUERRA, F. R.; VIEIRA, C. P.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Electroacupuncture Increases the Concentration and Organization of Collagen in a Tendon Healing Model in Rats. **Connective Tissue Research**. 1–6, 2012.

ARO, A. A.; NISHAN, U.; PEREZ, M. O.; RODRIGUES, R. A.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; GOMES, L.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Structural and biochemical alterations during the healing process of tendons treated with Aloe vera. **Life Sciences**. 91: 885–893, 2012.

ARO, A. A.; VIDAL, B. C. PIMENTEL, E. R. Biochemical and anisotropical properties of tendons. **Micron**. 43: 205–214, 2012.

ARRUDA, E. R. B; RODRIGUES, N. C; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N. A. Influences of different low level laser therapy wavelengths in rat tendon regeneration after tenotomy. **Rev. bras. fisioter**. 11(4): 247-252, 2007.

ARYA, S.; KULIG, K. Tendinopathy alters mechanical and material properties of the Achilles tendon. **J Appl Physiol**. 108: 670–675, 2010.

BALLANTYNE, C. M.; CORSINI, A.; DAVIDSON, M. H.; HOLDAAS, H.; JACOBSON, T. A.; LEITERSDORF, E.; MÄRZ, W.; RECKLESS, J. P. D.; STEIN, E. A. Risk for Myopathy With Statin Therapy in High-Risk Patients. **Arch Intern Med**. 163(5): 553-564, 2003.

BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A. Adverse Effects of Statins - Mechanisms and Consequences. **Current Drug Safety**. 4, 209-228, 2009.

BERI, A.; DWAMENA, F.C.; DWAMENA, B. A. Association Between Statin Therapy and Tendon Rupture: A Case–Control Study. **J Cardiovasc Pharmacol**. 53: 401–404, 2009.

CAMERINO, G. M.; PELLEGRINO, M. A.; BROCCA, L.; DIGENNARO, C.; CAMERINO, D. C.; PIERNO, S.; BOTTINELLI, R. Statin or fibrate chronic treatment modifies the proteomic profile of rat skeletal muscle. **Biochem Pharmacol**, 1-11, 2011.

CAMPO, V.L. ; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**.30(2): 425-430, 2007.

CARMONT, M. R.; HIGHLAND, A. M.; BLUNDELL, C. M.; DAVIES, M.B. Simultaneous bilateral Achilles tendon ruptures associated with statin medication despite regular rock climbing exercise. **Physical Therapy in Sport**. 10: 150–152, 2009.

CHAZERAIN, P.; HAYEM, G.; HAMZA, S.; BEST, C. ZIZA, J. Four cases of tendinopathy in patients on statin therapy. **Joint Bone Spine**.; 68: 430-3, 2001.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**. 84: 413–428, 1999.

DAHLGREN, L. A. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**. 168 – 173, 2007.

FONSECA, F. A. H. Pharmacokinetics of statins. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 85:9-14. Suplemento V, 2005.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. (eds.). Terapia Farmacológica para hipercolesterolemia e dislipidemia In: GILMAN, A. G. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 11ª Ed. 2006. cap. 36, p. 837-868.

JAMES, R.; KESTURU, G.; BALIAN, G.; CHHABRA, A. B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. **JHS**. 33A: 102-112, 2008.

KHAN, K. M.; COOK, J. L.; BONAR, F.; HARCOURT, P.; ASTROM, M. Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. **Sports Med**. 27: 393-408, 1999.

KIORTSIS, D.N.; FILIPPATOS, T.D.; MIKHAILIDIS, D.P.; ELISAF, M.S.; LIBEROPOULOS, E.N. Statin-associated adverse effects beyond muscle and liver toxicity. **Atherosclerosis**. 195: 7–16, 2007.

MAFFULLI N.; BUONO, A. D.; SPIEZIA, F.; LONGO, U. G.; DENARO, V. Light microscopic histology of quadriceps tendon ruptures. **International Orthopaedics (SICOT)**, 2012.

MARIE, I.; DELAFENÊTRE, H.; MASSY, N.; THUILLEZ, C.; NOBLET, C.; Tendinous Disorders Attributed to Statins: A Study on Ninety-Six Spontaneous Reports in the Period 1990–2005 and Review of the Literature. **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)**. 59(3): 367–372, 2008.

MARIE, I.; NOBLET, C. Drug-associated tendon disorders: After fluoroquinolones... here are statins! **La Revue de médecine interne**. 30: 307–310, 2009.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current Perspectives on Statins. **Circulation**. 101: 207-213, 2000.

NESSELROADE, R. D.; NICKELS, L. C. Ultrasound Diagnosis of Bilateral Quadriceps Tendon Rupture After Statin Use. **West J Emerg Med.** 11(4): 306-309, 2010.

O'SULLIVAN, S. Statins: A review of benefits and risks. **TSMJ.** 8: 52-56, 2007.

PACHALY, J. R.; BRITO, H.F.V. Interspecific Allometric Scaling. In: Fowler ME, Cubas P.R. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**, Ames. 1^a ed. Iowa University Press; 2001. p.475-481.

RUBIN, G.; HADDAD, E.; BEN-HAIM, T.; ELMALACH I.; ROZEN, N. Bilateral, simultaneous rupture of the quadriceps tendon associated with simvastatin. **IMAJ.** 13: 185, 2011.

SAVVIDOU, C.; MORENO, R. Spontaneous Distal Biceps Tendon Ruptures: are they related to statin administration? **Hand Surgery.** 17: 167-171, 2012.

SCHAAFSMA, D.; DUECK, G.; GHAVAMI, S.; KROEKER, A.; MUTAWE, M. M.; HAUFF, K.; XU, F. Y.; MCNEILL, K. D.; UNRUH, H.; HATCH, G. M.; HALAYKO, A. J. The Mevalonate Cascade as a Target to Suppress Extracellular Matrix Synthesis by Human Airway Smooth Muscle. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 44: 394-403, 2011.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** 19: 117-125, 2004.

SHELANSKI, H. A.; CLARK, A. M. Physiological action of sodium carboxymethylcellulose on laboratory animals and humans. **Food Res.** 13: 29-35, 1948.

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A. A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.** 16: 251-255, 2012.

TALLON, C.; MAFFULLI, N.; EWEN, S. W. B. Ruptured Achilles tendons are significantly more degenerated than tendinopathic tendons. **Med Sci Sports Exerc.** 33(12): 1983 – 90, 2001.

TOMIOSSO, T. C.; NAKAGAKI, W. R.; GOMES, L.; HYSLOP, S.; PIMENTEL, E. R. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. **Cell Tissue Res.** 337: 235–242, 2009.

TURNER, N. A.; O'REGAN, D.J.; BALL, S. G.; PORTER, K. E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 Mrna levels. **The FASEB Journal.** 1-25, 2005.

VIDAL, B. C. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles. Microphotometric measurements of textural birefringence. **Cell Mol Biol.** 32: 527–35, 1986.

VIDAL, B. C. The part played by proteoglycans and structural lycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. **Cell Mol Biol.** 26: 415–21, 1980.

VIDAL, B.C.; MELLO, M. L. S. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: an approach to spatially resolved supramolecular organization. **Acta Histochem.** 112: 53–61, 2010.

VIEIRA, C. P.; ARO, A. A.; ALMEIDA, M.S.; MELLO, G. C.; ANTUNES, E.; PIMENTEL, E. R. Effects of Acute Inflammation Induced in the Rat Paw on the Deep Digital Flexor Tendon. **Connective Tissue Research,** 1: 1-9, 2012.

VILARTA, R.; VIDAL, B. C. Anisotropic and Biomechanical Properties of Tendons Modified by Exercise and Denervation: Aggregation and Macromolecular Order in Collagen Bundles. **Matrix**. 91: 55-61. 1989.

VOLETI, P. B.; BUCKLEY, M. R.; SOSLOWSKY, L. J. Tendon Healing: Repair and Regeneration. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** 14: 47–71, 2012.

WANG, J. H. C. Mechanobiology of tendon. **J of Biomechanics**. 39: 1563-1582, 2006.

XU, Y.; MURRELL, G. A. C. The Basic Science of Tendinopathy. **Clin Orthop Relat Res**. 466: 1528–1538, 2008.

5. CONCLUSÕES

- As estatinas promovem um desequilíbrio entre a síntese e degradação de diversas moléculas, principalmente no que diz respeito ao colágeno I e possivelmente causa micro lesões em tendões.
- A presença de MMP-2 e MMP-9 é uma evidência de que os processos de degradação e remodelação estão ocorrendo na matriz extracelular em resposta ao tratamento com estatinas.
- O tratamento com estatinas traz prejuízo às propriedades biomecânicas dos tendões e também promove a desorganização das fibras de colágeno fazendo com que os tendões se tornem mais predispostos a rupturas.
- As estatinas causam notáveis alterações na matriz extracelular de tendões, após tratamento crônico.