

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**MORFOLOGIA E ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES - 2 e - 9 DO
TENDÃO DO CALCANEIO DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO
FÍSICO**

OLGA CRISTINA DE MELLO MALHEIRO

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, *Campus* de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de PG em
Biologia Geral e Aplicada**

BOTUCATU - SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**MORFOLOGIA E ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES - 2 e - 9 DO
TENDÃO DO CALCANEIO DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO
FÍSICO**

OLGA CRISTINA DE MELLO MALHEIRO

SERGIO LUIS FELISBINO

**Tese apresentada ao Instituto de
Bióciências, *Campus* de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de PG em
Biologia Geral e Aplicada**

BOTUCATU - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Malheiro, Olga Cristina de Mello.
MORFOLOGIA E ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES - 2 e - 9
DO TENDÃO DO CALCÂNEO DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO
FÍSICO/ Olga Cristina de Mello Malheiro. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Botucatu 2008

Orientador: Sérgio Luis Felisbino
AssuntoCAPES: 20601001

1. Biologia celular 2. Exercícios físicos

CDD 574.87

Palavras-chave: Exercício físico; Matriz extracelular; Metaloproteinase
Tendão; Zimografia

Data da defesa: 25/09/2008

Banca examinadora

Prof Dr: Sérgio Luis Felisbino _____

Profa Dra: Maeli Dal Pai Silva _____

Profa. Dra: Ana Liz Garcia Alves _____

Profa. Dra: Raquel Fantin Domeniconi _____

Profa. Dra : Patrícia Aline Boer _____

Agradecimentos

Meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino e a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a elaborar e desenvolver esta pesquisa... pois não foram poucos... e me ajudaram muito...

Muito obrigada a todos vocês.

SUMÁRIO

Resumo.....	07
Abstract.....	09
1. Introdução.....	10
1.1 Tendão do Calcâneo.....	10
1.2 A matriz extracelular dos tendões.....	11
1.3 A renovação e a degradação da matriz extracelular.....	14
1.4 Exercício físico e a matriz extracelular dos tendões.....	16
2. Objetivos.....	20
3. Material e Métodos	21
4. Artigo.....	27
5. Conclusões Finais.....	42
6. Referência Bibliográfica.....	43
7. Anexos.....	48

Resumo

Os tendões são estruturas dinâmicas que respondem a estímulos mecânicos alterando a matriz extracelular e a atividade celular. Neste processo de adaptação já foi demonstrado que ocorre aumento da síntese de colágeno e na atividade das enzimas que fazem as ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno. Além disso, também já foi demonstrado que ocorre um aumento do produto da degradação do colágeno após o exercício, sugerindo a participação das metaloproteinases de matriz (MMPs) neste processo. Foi observada maior atividade de MMPs -2 e -9 no tendão calcâneo após exercício físico. Entretanto, pouca atenção tem sido dispensada para as distintas forças mecânicas as quais as regiões proximal e distal deste tendão estão sujeitas. Neste estudo, nós avaliamos os efeitos de dois tipos diferentes de exercício físico sobre a morfologia e a atividade de metaloproteinases de matriz nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo de rato. Ratos Wistar machos com 90 dias de idade foram divididos em quatro grupos experimentais: controles sedentários; ratos submetidos à adaptação ao meio líquido; ratos adaptados ao meio líquido e submetidos a uma seção diária de 4 séries de 10 saltos verticais com sobrecarga de 50% do peso corpóreo (treinamento resistido); e ratos submetidos a uma seção diária de corrida em esteira com inclinação positiva de 5%, por 30 minutos e em velocidade de 13 m/s (treinamento de resistência). Os animais dos diferentes grupos experimentais foram sacrificados depois de um e quatro dias de treinamento físico sempre após 6 horas do fim do treinamento. A atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 foi analisada pela técnica de zimografia com gelatina. Algumas amostras dos tendões foram processadas para análises histológicas. Os tendões dos animais adaptados e treinados mostraram tendinócitos ativados com aspecto de células secretoras além de aumento da celularidade e vascularização do tecido peritendíneo, mas sem a presença de células inflamatórias. Na região proximal, ambas as formas da MMPs-2 pró e ativa, aumentaram com o treinamento de saltos, mas somente a MMP-2 pró, aumentou com a corrida em esteira. Em contraste, na região distal, ambos os tipos de exercício aumentaram a atividade das formas pró- e ativa da MMP-2, mas principalmente nos animais treinados em corrida em esteira, os quais aumentaram a atividade da MMP-2 ativa para aproximadamente 11 e 8 vezes após um e quatro dias de treinamento, respectivamente. Nenhuma atividade da MMP-9 foi observada em ambas regiões do tendão avaliadas nestes estudo. Concluindo, os resultados aqui apresentados sugerem que a MMP-2 é a principal gelatinase ativa nos tendões após o exercício físico, em condições de ausência de inflamação, e que a região

distal do tendão calcâneo responde com maior ativação da MMP-2 após o treinamento, principalmente com corrida em esteira. Esta maior ativação provavelmente está relacionada com o duplo estímulo de tensão e compressão ao qual esta região está sujeita durante os movimentos.

Abstract

Tendons present dynamic response to mechanical stimuli by changing its extracellular matrix. In this adaptation process has already been demonstrated that there is an increase of collagen synthesis and activity of the enzymes that make the cross-links between the molecules of collagen. Furthermore, has also been demonstrated that occurs an increase of the product of collagen degradation after exercise, suggesting the participation of matrix metalloproteinases (MMPs) in this process. Increased activity of MMP-2 and -9 were found in calcaneal tendon after physical training. However, little attention has been given to the distincts mechanical loading that proximal and distal regions of the calcaneal tendon are subjected. Here, we evaluated the effect of two kind physical activities on tendon morphology and matrix metalloproteinase activities in the both proximal (mainly tensile loading) and distal regions (tensile and compressive loading) of rat calcaneal tendon. Wistar rats from control, water adapted, vertical jumping; treadmill running groups were sacrificed after one and four days of physical exercise and six hours after the end of the exercise session. Metalloproteinases (MMPs) activities were analyzed by gelatin zymography. Some tendon samples were processed for histology. Tendons from adapted and trained animals showed active secretory cells and an increased cellularity of peritendinous sheath, but without inflammatory cells. In the proximal region, both pro- and active-MMP-2 were increased with vertical jumping, but only pro-MMP-2 was increased with treadmill running. In contrast, in the distal region, both kind of exercises increased the activity of pro- and active-MMP-2, but mainly treadmill running that increased the active-MMP-2 to about eleven and eight folds after one and four days of training, respectively. No activity of MMP-9 was observed in both tendon regions in this study. In conclusion, the results presented here suggested that MMP-2 is the main gelatinase active in tendon after physical training, in absence of inflammatory reaction, and that distal region of calcaneal tendon is most responsive to tissue remodeling after physical training, mainly by treadmill running. This higher activation is probably related with the double stimulus that this region is submitted during movements.

INTRODUÇÃO

1. O tendão do calcâneo – Tendão de Aquiles

O tendão de Aquiles, localizado junto à articulação do tornozelo é exposto a um considerável estresse mecânico. Por ser responsável por funções importantes, como a transmissão da força gerada pelos músculos ao osso e também pela mobilidade da articulação, ele é uma estrutura que se adapta a diferentes forças, da sua região proximal à distal. Justamente por estar em contato ou aderido a outros tecidos (ossos, músculos...) possui forma e composição diferentes para suportar e responder a estímulos específicos. Biewener & Roberts, (2000), relatam que tendões operam como fonte que armazena e libera energia de tensão elástica durante a locomoção.

Jozsa & Kannus, (1997) observaram que, cria-se estresse nas diferentes partes do tendão calcâneo, porque este absorve forças no plano sagital (flexão plantar e dorsal) e no plano frontal (inversão e eversão). Ressaltaram também, que as fibras de colágeno são orientadas de modo a oferecer o máximo de resistência às forças que normalmente atuam sobre o tecido, por isso essas fibras de colágeno são orientadas longitudinalmente, transversalmente e horizontalmente, com fibrilas de colágeno longitudinais formando cordões espirais. Esta complexa estrutura atribui ao tendão alta capacidade de equilibrar forças longitudinais, transversais, horizontais e rotacionais durante o movimento. De acordo com Kjaer, (2006), os tendões são estruturas com propriedades mecânicas distintas que podem variar dentro de um mesmo tendão humano, e até mesmo diferenças de gênero são mostradas em suas características.

O tendão do calcâneo se origina no final da junção miotendinosa dos músculos gastrocnêmio e soleo. Na junção miotendinosa, cada fibra muscular termina em um micro tendão, aderindo-se ao tendão propriamente dito. O tendão calcâneo é largo em sua região proximal tornando-se mais estreito e irregular distalmente, onde se insere na porção media posterior do osso calcâneo por meio de uma rígida expansão fibrocartilaginosa (BENJAMIN & RALPHS, 1998).

A inserção do tendão calcâneo no osso calcâneo ocorre através de uma estrutura denominada Entesis. Uma entesis é a região do tendão, ligamento ou cápsula articular atachada ou inserida no osso, isto é, “um local de inserção”. Biermann, (1957) e Knese & Biermann, (1958), há algumas décadas, verificaram que uma entesis tanto serve para equilibrar diferentes modulações elásticas do tendão e do tecido esquelético, como pode evitar um pico de tensão local. Podem ser fibrosas ou fibrocartilaginosas, de acordo com

a característica do tecido de interface do tendão com o osso, isto é, podem ser de tecido conjuntivo denso fibroso ou fibrocartilagem respectivamente, suas características são intermediárias, entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina (Benjamim & Halphs, 1997, 1998, 2000). É uma forma de cartilagem na qual a matriz contém feixes evidentes de espessas fibras colágenas que se colocam paralelamente às trações exercidas sobre eles, e seguem orientação aparentemente irregular entre os fibrocondrócitos ou arranjo paralelo ao longo dos condrócitos em fileiras. Essa orientação depende das forças que atuam sobre a fibrocartilagem. Geralmente, a presença de fibrocartilagem indica que naquele local o tecido precisa resistir à forças de compressão e de dobramentos (Benjamim and Ralfs, 1990). Além dos tendões que são sujeitos a forças compressivas possuem freqüentemente um arranjo irregular de fibrilas colágenas, estes são ricos em proteoglicanos (O'BRIEN, 1997).

1.2 A matriz extracelular dos tendões

O tendão é formado por fibroblastos e matriz extracelular (MEC), da qual fazem parte as proteínas fibrosas de colágeno e elastina, os proteoglicanos, as glicoproteínas e os glicosaminoglicanos, sendo o colágeno o maior componente da MEC abrangendo cerca de 86% a 95% do peso seco do tendão. Por sua conformação o tendão de Aquiles contém número relativamente pequeno de fibroblastos, no próprio tendão e em seu envoltório. Esses fibroblastos possuem processos que se estendem entre outros fibroblastos intratendinosos promovendo contato célula/célula e também com a MEC (McNEILLY et al. 1996).

As proteínas colagênicas, os constituintes mais abundantes da matriz extracelular da maioria dos tecidos, são constituídas em sua maioria, por três cadeias denominadas α , arranjadas de tal forma que aproximadamente 95% da molécula correspondem a tríplice hélice. Geralmente, as extremidades não estão em conformação helicoidal, favorecendo a ocorrência de ligações cruzadas. Cada cadeia contém repetições de uma seqüência característica de aminoácidos, formada por Gly-X-Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido, porém X é freqüentemente, uma prolina e Y uma hidroxiprolina. Essas moléculas são glicosiladas. A glicosilação ocorre nos resíduos de hidroxilisina e é variável de acordo com os diferentes tipos de colágeno. Parece haver correlação entre a quantidade de glicosilações e o diâmetro das fibrilas de colágeno, de forma que quanto maior o número de glicosilações tanto menor o diâmetro das fibrilas de colágeno. A hidroxilação dos resíduos de prolina e de lisina é um evento

de fundamental importância para a formação das moléculas de colágeno e para o desempenho de sua função. A hidroxilação da prolina, por exemplo, é necessária para a estabilidade da estrutura helicoidal da molécula. Já a hidroxilação da lisina é importante tanto para a glicosilação com a formação de galactosilidroxilisina e glicosilgalactosilidroxilisina como para a formação do derivado aldeídico, hidroxialisina, que juntamente com a lisina, participam do processo de formação de ligações cruzadas inter e intramoleculares. Essas ligações contribuem para aumentar a capacidade das fibrilas de colágeno de resistir às forças de tensão. As hidroxilações da prolina e da lisina são realizadas por duas enzimas, a prolil-hidroxilase e a lisil-hidroxilase. A atividade de ambas depende da presença de O₂, α- cetogluturato e de co-fatores, como ácido ascórbico e íon ferroso (CARVALHO & PIMENTEL, 2001).

A síntese do colágeno começa nos ribossomos aderidos à membrana do retículo endoplasmático, que a partir daí crescem para o interior do retículo. Formam-se, então, três cadeias polipeptídicas pró-alfa, com aminoácidos terminais pró-peptídeos. No retículo endoplasmático, estas três cadeias se enrolam uma sobre as outras e formam uma tríplice hélice, denominada pró-colágeno. A formação de fibrilas de colágeno inicia-se no meio extracelular, onde, as moléculas de colágeno sofrem ação de peptidases que removem os pró-peptídeos amino e carboxi-terminal. Esses pro-peptídeos impedem que as moléculas de colágeno associem-se em agregados no interior da célula, por meio de ligações cruzadas.

A formação de fibras colágenas com grande quantidade de ligações cruzadas, inter e intra-moléculas, resulta na conversão de colágeno fraco, líquido como dos tecidos embrionários, em colágenos sólidos, elásticos, resistentes que podem armazenar energia e trabalhar (SILVER et al., 2003).

A matriz extracelular tem papel importante na transmissão de forças geradas não só pela contração dos músculos, como também àquelas aplicadas externamente, como a força da gravidade (SARASA & CHIQUET, 2005).

Os tendões têm matriz extracelular abundante, rica em colágeno do tipo I associado ao do tipo V e XI, que fazem a ligação entre fibrilas e entre outros componentes da matriz. No tendão, as fibras colágenas são altamente alinhadas e usualmente organizadas em fascículos de fibras contendo unidades menores denominadas fibrilas (Enwemeka & Spielholz, 1992). O desenvolvimento sistemático desta hierarquia é fundamental para a integridade estrutural e funcional dos tendões (BIRK et al., 1997).

As fibras do sistema elástico, formadas por fibrilina (formam feixes de microfibrilas) e elastina (amorfa), também podem ser encontradas na matriz extracelular dos tendões e ligamentos. Podem ser chamadas de fibras oxitalâmicas quando apresentam somente microfibrilas dispostas em feixes. Chamam-se fibras elaunínicas quando seus feixes de microfibrilas possuem pouca elastina. E finalmente, denominam-se fibras elásticas maduras quando o conteúdo de elastina está bastante aumentado. Fibras do sistema elástico são encontradas entre os feixes de colágeno dos tendões, principalmente nas regiões sujeitas a forças de compressão (CARVALHO & CAMPOS VIDAL, 1995; COVIZI et al. 2001).

As fibras reticulares também presentes nos tendões, são formadas por colágeno do tipo III e tem grande quantidade de açúcares (6 a 12%), sendo mais finas que as fibras colágenas. Estas também são encontradas ao redor dos feixes de fibras colágenas do tendão, formando bainhas, denominadas endo, peri e epitendão e aumentam em quantidade durante um processo de reparo (WILLIAMS et al. 1984).

Além das microfibrilas de fibrilina, como descrito anteriormente, microfibrilas formadas pelo colágeno tipo VI também podem ser encontradas em tendões, ao redor das células principalmente (FELISBINO & CARVALHO, 1999).

Na matriz extracelular, em associação aos componentes fibrilares e microfibrilares, existem também os elementos não fibrilares, representados pelas glicoproteínas estruturais não colagênicas e pelos proteoglicanos. Os proteoglicanos diferenciam-se das demais glicoproteínas por possuírem, ao menos, uma cadeia de glicosaminoglicano, que são carboidratos formados por uma estrutura dissacarídea básica e repetitiva, característica para cada tipo. Suas cadeias são lineares e de comprimento variável, apresentando cargas negativas devido à presença de radicais carboxílicos e sulfatados. Embora algumas das propriedades gerais dos proteoglicanos estejam baseadas na presença das cadeias de glicosaminoglicanos, a proteína central (core protein) também apresenta aspectos importantes nas funções dessas moléculas. Além de representarem o molde para a ligação dos glicosaminoglicanos e serem responsáveis pelo seu tráfego intracelular, pela via-biossintética secretora, existem domínios específicos na molécula que permitem sua interação com outros açúcares, (como o ácido hialurônico), com outras proteínas (como colágeno) ou com as membranas celulares (como no caso dos proteoglicanos de superfície celular). Os proteoglicanos e os glicosaminoglicanos formam um gel altamente hidratado reforçado por fibras. A água nele contida é a chamada água de solvatação. Isto acontece devido à

carga negativa do gel, que atrai íons Na^+ , que por sua vez atraem água (Fernandez et al., 1991). Esta água de solvatação é essencial para a difusão de gases e nutrientes entre as células do tecido conjuntivo e entre os vasos e os outros tecidos.

A regulação da síntese de proteoglicanos, e de sua distribuição espacial pode ser a chave da sua função na morfogênese do tecido em termos de: responsividade do fator de crescimento, crescimento celular, e pela arquitetura da matriz extracelular. A família dos proteoglicanos de heparan sulfato é crucial na regulação da resposta celular para o FGF. O proteoglicano decorin é multifuncional, modulando a ação do $\text{TGF-}\beta$, as propriedades de crescimento celular e atuando na organização das fibrilas colágenas.

Os proteoglicanos constituem cerca de 1% da massa do tendão e são representados principalmente por pequenos proteoglicanos como o decorin e o fibromodulin (Vogel & Heinegard, 1985). Existe interesse particular nestes pequenos proteoglicanos porque evidências bioquímicas e morfológicas indicam que estes estão aptos para interagir com fibrilas de colágeno e dessa maneira podem ter papel específico e importante nas propriedades funcionais e estruturais das fibrilas, regulando, por exemplo, seu diâmetro (Vogel & Fischer, 1986). Grandes proteoglicanos também são encontradas no tendão, especialmente em regiões sujeitas a compressões e em volta do tendão (VISSER, et al. 1994; FELISBINO, 1999)

1.3 A renovação e a degradação da matriz extracelular - MMPs

A renovação dos componentes da matriz é executada principalmente pelos fibroblastos e por meio de uma classe de enzimas denominadas Metaloproteinases de Matriz (MMPs). Acredita-se que as moléculas de colágeno dos tendões e da derme sejam renovadas a cada 100 dias (KJAER, 2004).

As MMPs são endopeptidases dependentes de metais, principalmente zinco e cálcio, e são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Essas enzimas são secretadas na forma de um precursor latente e são ativadas no espaço extracelular por outras enzimas, tais como a plasmina, triptase, quimase, por outras metaloproteinases e também por autoclivagem e auto-ativação. As MMPs estão envolvidas em processos fisiológicos normais, tais como na embriogênese, na ovulação, na involução do útero e da mama, na erupção dental e na remodelação e renovação dos componentes da matriz extracelular. De acordo com o substrato que degradam, as MMPs são divididas em 5 grupos principais: 1) as collagenases intersticiais (MMP-1, -8 e -13); 2) as gelatinases

(MMP-2 e -9); 3) as estromelinas (MMP-3, -10 e -11); 4) as metaloproteinases de membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) e 5) MMPs que não se enquadram em algum dos grupos anteriores (MMP-7, -12, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -26, -27 e -28). As células também secretam proteínas inibidoras de MMPs. Esses inibidores são conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Assim, a atividade dessas enzimas é regulada por meio de sua ativação ou inibição (MATRISIAN, 1990).

Quatro membros da família do TIMP são caracterizados. TIMP-1 e TIMP-2 são capazes de inibir as atividades de todas as MMPs conhecidas. TIMP-2 é conhecido por inibir mais efetivamente a MMP-2, enquanto TIMP-1 tem uma alta afinidade para MMP-9 (GOMEZ et al., 1997).

A degradação do colágeno representa um passo obrigatório para o turnover e remodelação do tecido conjuntivo, para os fibroblastos e estruturas da matriz extracelular durante a sobrecarga mecânica (Everts et al. 1996). Inicialmente a degradação do colágeno é feita pelas MMPs (ou matrixins) extracelularmente, as quais estão presentes nos tecidos na maioria das vezes como pro-MMPs latente (ASAHI et al., 2000).

Há evidências que confirmam que as MMPs e TIMPs não têm um alto grau de envolvimento na fagocitose lisossomal intracelular, mas funcionam extracelularmente.

O processo de degradação do colágeno é bem descrito em situações de rápida remodelação, como inflamação ou lesão tecidual (Ishiguro et al., 1996), mas o aumento do turnover do tecido durante a estimulação fisiológica normal, como depois de uma sobrecarga mecânica, é pouco conhecido (ERLICHMAN et al., 2001).

As colagenases, enzimas da família das metaloproteinase de matriz (MMP), estão entre as relativamente poucas enzimas, capazes de clivar o colágeno fibrilar intacto. MMPs com atividade de colagenase incluem MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13 e MMP-14 (NAGASE & WOESSNER, 1999)

As colagenases (MMP-1 e MMP-8), tradicionalmente iniciam a degradação dos colágenos fibrilares tipo I e III, e desse modo são relevantes para o tendão. Entretanto, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) parecem também estar envolvidas na remodelação das fibrilas de colágeno (PATTERSON et al., 2001).

Desta forma, embora existam algumas preferências entre as diferentes MMPs com relação aos tipos de colágenos, não existe uma alta especificidade de substratos. Assim, a função total das MMPs no metabolismo da matriz do tecido parece ser ainda mais complexa (Nagase & Woessner, 1999). Nos tendões, as MMPs são produzidas a

partir de fibroblastos do endo, peri e epitendão (Ragoowansi et al., 2001). A regulação das MMPs em relação ao exercício físico está começando a ser entendida.

1.4 Exercício Físico e a matriz extracelular dos tendões

A sobrecarga crônica na forma de treinamento físico conduz os tendões e músculos a aumento do *turnover* de colágeno, como também, dependendo do tipo de colágeno em questão, á algum grau da síntese deste colágeno. Pesquisas relatam que a síntese dos colágenos tipo I e tipo III estão aumentadas após estímulos mecânicos por meio de exercício físico intenso no músculo (Langberg et al., 2001). Trabalhos também relatam que o exercício agudo induz a síntese do colágeno no tendão e no músculo, indicando resposta adaptável no tecido conjuntivo (HEINEMEIER et al., (2007).

O *turnover* do colágeno no sistema músculo esquelético é mais rápido que previamente pensava-se (Smith et al.,2007). Já foi documentado que o *turnover* da MEC é influenciado pela atividade física, e que a síntese de colágeno e das MMPs, aumenta com a carga mecânica, portanto, o exercício físico induz a aumento transitório na concentração intersticial do produto de degradação da ligação cruzada do colágeno tipo I, da carboxila-terminal e telopeptideo do colágeno tipo I. Estudos de Langberg et al., (2001), relatam que o exercício indica aumento na degradação do colágeno tipo I.

Olesen e colaboradores (2006^a) observaram que o aumento passageiro na degradação de colágeno parece ser um aspecto adicional à resposta do tecido dos tendões às cargas mecânicas, além disso, as metaloproteinases de matriz, MMP-2 e -9 que são capazes de degradar colágeno fibrilar intacto, podem estar envolvidas neste processo (VISSE & NAGASE, 2003).

Estas alterações modificam as propriedades mecânicas e as características viscoelásticas dos tecidos, diminuem sua susceptibilidade à tensão, e provavelmente os fazem mais resistentes às sobrecargas (Harwood & Aimel, 1992) Por outro lado, a inatividade por imobilização promove um marcante aumento do turnover do colágeno em ligamentos, tendões e músculos (AIMEL et al., 1982).

Heinemeier e colaboradores (2007), em um estudo com treinamento físico aplicado em ratos, envolvendo contrações concêntricas, excêntricas ou isométricas por 4 dias, notaram que a expressão do RNAm da MMP-2 , pareceu aumentar moderadamente (1- a 3 x), 24h após o treinamento no tendão e no músculo em resposta a todos os tipos de contração, embora não sendo significativo para o tendão com contração excêntrica nem para o músculo com contração concêntrica. O efeito do

treinamento excêntrico foi maior do que o concêntrico na expressão dos TIMPs-1 e -2 tanto no músculo, quanto no tendão.

Nos resultados de outro estudo, Mackey e colaboradores, (2004) notaram que uma única sessão de contrações excêntricas no músculo resultou em remodelação do colágeno endomisial do tipo IV, possivelmente através de MMPs.

Kjær, (2004) observou o fenômeno de lesões por *overuse* e sugere que há processos metabólicos que controlam o equilíbrio entre adaptação fisiológica e patológica para cargas mecânicas.

Sommer, (1987) encontrou em ratos, aumento na área de corte transversal do tendão de Aquiles como reação ao treinamento de velocidade, mas nenhum efeito de adaptação foi visto após o treinamento de resistência. Entretanto em seres humanos Rosager et al. (2002) observaram que os corredores interurbanos parecem ter área seccional transversa maior do tendão de Aquiles comparado aos não corredores.

Em outro estudo sobre os efeitos do exercício físico no tendão de Aquiles do rato, utilizando protocolo de saltos em água com sobrecarga de 70%, Marqueti et al., (2006) mostraram significativo aumento da atividade gelatinolítica das três bandas da MMP-2 (pró- intermediária – ativa) em todos os animais do grupo e da MMP-9 em alguns ratos. Entretanto, neste mesmo protocolo de treinamento com suplementação de esteróide anabólico-androgênico (Deca Durabolin) não houve aumento destas MMPs. Além disso, estes autores observaram processos inflamatórios no tecido peritendinoso dos animais submetidos ao exercício físico, com e sem suplementação. Desta forma, estes autores sugerem que o tratamento com esteróide anabólico-androgênico pode danificar a remodelação do tecido dos tendões dos animais que se submetem ao exercício físico diminuindo a atividade das MMPs da matriz, aumentando assim o potencial para lesão do tendão.

Por outro lado, em uma investigação com tendões humanos, utilizando a técnica de microdialise por cateter inserido no tecido peritendinoso do tendão de Aquiles, Koskinen et al., (2004) verificaram um significativo aumento da atividade da pro-MMP-9 após 6 horas do término de uma corrida em esteira por uma hora em velocidade alta de 12 km/h. Este aumento da pro-MMP-9 persistiu por 3 dias mesmo após nenhum treinamento físico adicional. Em contraste, a pro-MMP-2 só aumentou no terceiro dia após o treinamento físico. Estes autores não descartaram a participação da MMP-9 no processo de adaptação dos tendões ao exercício físico, mas ressaltaram que pode ter ocorrido um processo inflamatório induzido pela técnica de coleta por microdialise. Já

em relação a MMP-2, os autores também destacam que a técnica de coleta pode não refletir todo o conteúdo de MMPs do tendão visto que ela não atinge a produção das células internas do tendão.

Contudo, os estudos de Koskinen et al.,(2004) e Marqueti et al.,(2006) não avaliaram as duas regiões do tendão de Aquiles separadamente quando submetidos. Ao exercício físico. Desta forma, as regiões deste tendão, que pela sua localização estão sujeitas a forças de tensão e de compressão e que também são capazes de diferenciar suas estruturas e componentes quando submetidos a estímulos externos, merecem atenção especial no que se refere à importante atividade das metaloproteinases, procurando melhor entendimento das respostas adaptativas destas regiões do tendão de Aquiles a diferentes tipos de treinamento físico.

Os resultados dos principais estudos dos efeitos de diferentes tipos de exercícios físicos sobre a expressão e atividade de MMPs nos músculos e tendões estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Principais estudos sobre a expressão de MMPs nos tendões e músculos humanos ou de animais submetidos à diferentes condições experimentais e treinamentos físicos.

Tipos de exercício, estímulo mecânico ou lesão – organismo	Tendão	Músculo	Referências
Ruptura em tendões supraspinatus - humanos	MMP-1 ▲, MMP-2 ▼ MMP-3 ▼		Riley et al., 2002
Resposta inflamatória-ratos		MMP-9 ▲	Kherif et al., 1999
Regeneração de novas miofibrilas-ratos		MMP-2 ▲	
Exercício de alta intensidade de longa duração - ratos		RNA ^m MMP-9 ▼	Carmeli et al., 2005
Corrida de alta intensidade-ratos		MMP-9- ▲	Carmeli et al., 2007
Protocolo de saltos com tratamento de EAA -ratos		EDL MMP-2 ▼ Gastro e Soleo MMP-2=	Marqueti et al., 2008
Ratos velhos imobilizados (gastrocnemius /quadríceps)		MMP-2 ▲, MMP-9 =	Bar-Shai M et al., 2004.
Ratos jovens imobilizados (gastrocnemius / quadriceps)		MMP-2 ▲, MMP-9 ▲	
Corrida voluntária giratória-ratos	RNA ^m TIMP-1 ▲		Legerlotz, et al., 2007.
Uma sessão de exercícios- humanos		MMP-9 ▲ mRNA	Rullman et al., 2007
Sem sobrecarga- ratos	RNA ^m da MMP-9 ▼	RNA ^m MMP-9 ▼	Heinemeier et al., 2007.
Contração concêntrica, excêntrica ou isométrica-ratos	RNA ^m da MMP-2 ▲ TIMP-1 ▲ TIMP-2 ▲ mRNA	RNA ^m da MMP-2 ▲ TIMP-1 ▲ TIMP-2 ▲ RNA ^m	
	RNA ^m da MMP-9 ▼	RNA ^m da MMP-9 ▼	
Contração excêntrica -ratos	RNA ^m da MMP-2 ▼	RNA ^m da MMP-2 ▼	
Lesão por esmagamento -ratos		MMP-9 ▲ MMP-2 ▲	Zimowska et al., 2008.
Regeneração/Miolise/ Reconstrução-(Soleus)-ratos		MMP-9 ▲	
Regeneração/ Miolise (EDL) -ratos		MMP-9 ▼	
Reconstrução muscular (EDL)-ratos		MMP-2 ▲	
Esteróide anabólico-androgênico e salto vertical na água com sobrecarga - ratos	MMPs ▼		Marqueti et al., 2006
Contração excêntrica -ratos		MMPs TIMPs ▲ MMP-9 ▲ TIMP-1 ▲, MMP-2/TIMP-2 ▲ MMP-2= [] sérica mRNA MMP-9 ▼	Koskinen et al., 2001
Corrida excêntrica aguda - humanos		MMP- 2 ▲	Koskinen et al., 2002
Fluído do peritendíneo calcâneo 6 horas após corrida - humano	MMP-9 ▲, MMP-2 ▼ TIMP-1= TIMP-2=		Koskinen et al., 2004
Fluído do peritendíneo calcâneo 24 horas após corrida - humano	MMP-9 ▲, MMP-2 ▼ TIMP-1 ▲ TIMP-2 ▲		
Fluído do peritendíneo calcâneo 3 dias após corrida - humano	MMP-9 ▲, MMP-2 ▲ TIMP-1 ▲ TIMP-2 ▲		
Contração excêntrica máxima 8 dias após exercício-humanos		[]Sérica MMP 9 ▲	Mackey et al., 2004
Contração excêntrica máxima 1, 2, 3, 4, e 14 dias após exercício-humanos		[]Sérica TIMP1 ▲	

2. Objetivos

2.1 O presente trabalho teve como objetivo geral:

Descrever os aspectos morfológicos e relacioná-las com a atividade das metaloproteinases de matriz nas regiões de compressão e de tensão do tendão calcâneo do rato submetido a diferentes estímulos biomecânicos.

2.2 O presente trabalho teve por objetivo específico descrever e avaliar:

Os efeitos do exercício físico de resistência (corrida em esteira) na atividade de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) de matriz nas regiões de compressão e tensão do tendão calcâneo do rato.

Os efeitos do exercício físico resistido (salto vertical) na atividade de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) de matriz nas regiões de compressão e tensão do tendão calcâneo do rato.

As alterações morfológicas da região distal e proximal no tendão calcâneo do rato submetido ao exercício físico de resistência (corrida em esteira)

As alterações morfológicas da região distal e proximal no tendão calcâneo do rato submetido ao exercício físico resistido (salto vertical).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Na presente pesquisa foram utilizados ratos machos adultos (90 dias), da linhagem Wistar, mantidos em biotério de pequenos mamíferos do departamento de Morfologia do IB- UNESP, Campus de Botucatu, obtidos no Biotério Central da UNIFESP –SP. Permaneceram em grupos de 4 animais por gaiola (polietileno), com temperatura ambiente de $(22\pm 2^{\circ}\text{C})$ e luminosidade (ciclo claro/escuro de doze horas) controlados, com livre acesso à água e alimentação (ração padrão Labina da Purina, para ratos de laboratório). Todo o procedimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) sob o protocolo nº 63/07-CEEA Botucatu –SP. Para cada tipo de tratamento, foram utilizados 10 animais dos quais foram removidos os tendões de ambos os membros

Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos:

Grupo Controle: os animais do grupo controle permaneceram livres em suas gaiolas, com água e alimentação à vontade.

Grupo Treinado em Esteira Rolante: os animais deste grupo foram submetidos ao treinamento físico composto de uma sessão de corrida diária em esteira rolante (Caloi Fitness) com inclinação (5%) (Fig.1a) e velocidade (13 metros por minuto) constantes, durante 30min, por quatro dias consecutivos(Fig.1d,e)

Grupo Adaptado ao Meio Líquido: os animais deste grupo foram submetidos a adaptação ao meio líquido durante 3 dias (Tabela1, Fig.2a)

Grupo Treinado em Saltos: os animais deste grupo após a fase de adaptação ao meio líquido durante 3 dias, na seqüência, por quatro dias consecutivos, foram submetidos ao treinamento físico de uma sessão diária composta de 4 séries de 10 saltos em cuba para saltos (Fig.2b) de profundidade apropriada ao comprimento dos animais(Fig. 2e). Entre cada uma das séries de saltos foi feito um intervalo com a duração equivalente a 3 vezes o tempo gasto pelo animal para a realização de cada série, verificado por cronômetro. A sobrecarga utilizada foi constante, referente a 50% do peso corpóreo de cada animal (Fig.2c,d)

Tabela 1. PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO AO MEIO LIQUIDO

FREQÜÊNCIA (1 sessão dia)	INTENSIDADE Profundidade em cm	VOLUME (tempo em minutos)	SOBRECARGA (% do peso corporal)
1º	15	15	zero
2º	25	25	zero
3º	25	50	zero

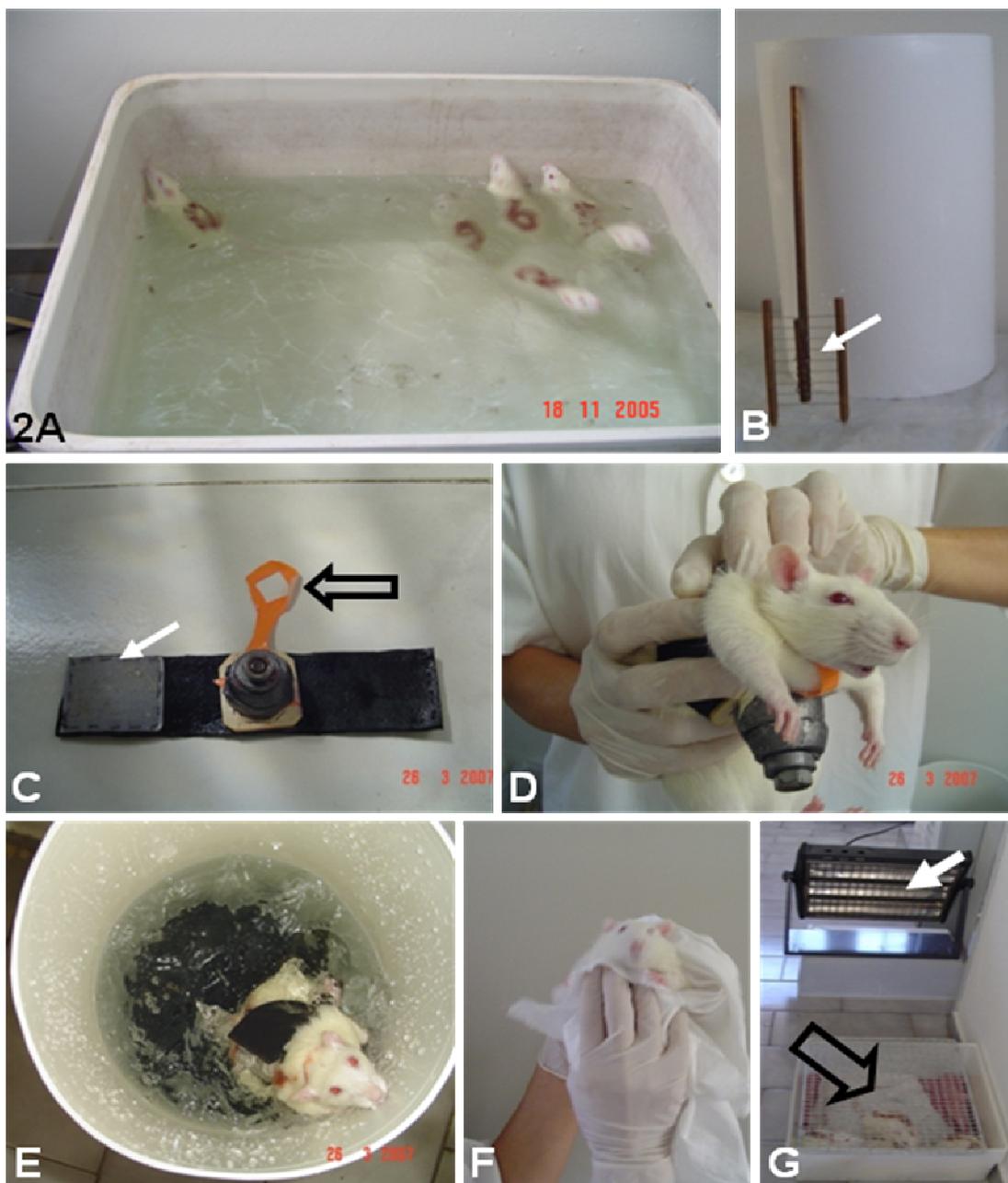


Figura 2. Treinamento de salto na água com sobrecarga. **A)** Reservatório de água utilizado para fazer a adaptação dos animais ao meio líquido. **B)** Tubo de PVC com um fundo antiderrapante para melhor realização dos saltos e a haste (seta) utilizada para retirada do animal da água após cada serie de saltos. **C)** Colete de borracha utilizado para acoplar a sobrecarga ao corpo do animal, contendo fecho de velcro (seta), parafuso fixo com rosca e porcas removíveis e colar de borracha (seta vazia). **D)** Imagem do colete já acoplado ao tórax do animal. **E)** Animal executando os saltos na água. **F)** Processo de retirada do excesso de água do pelo dos animais após o treinamento. **G)** Aquecedor elétrico (seta cheia), utilizado para secar o pelo dos animais, posicionado próximo à gaiola (seta vazia).

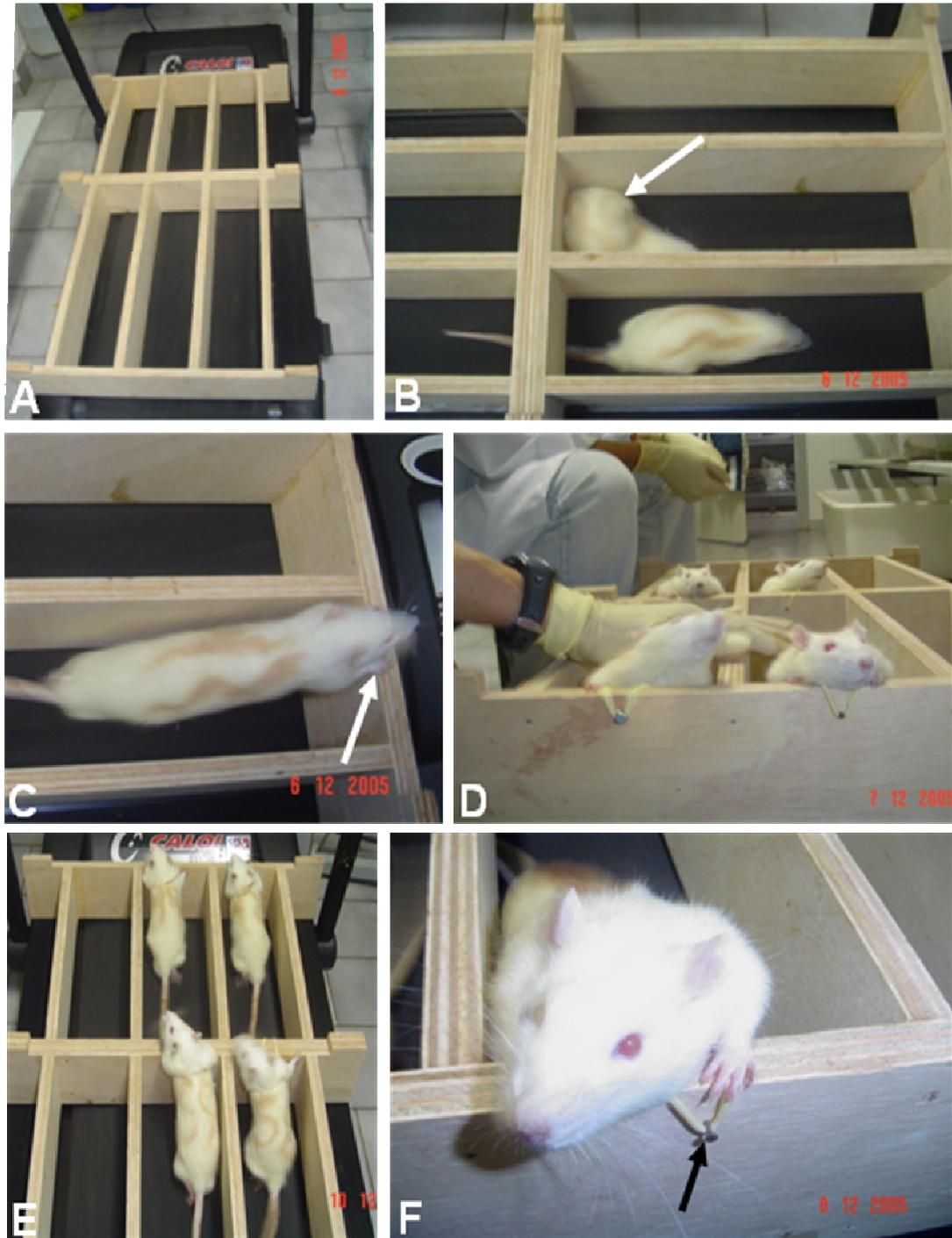


Figura 1. Treinamento em esteira. **A)** Esteira rolante (Caloi Fitness modelo CL 3502) com inclinação (5%) e velocidade ajustada para 13m por minuto. Os animais andavam em raias individuais feita em madeira medindo 15x40x15cm. **B)** No início do treinamento, a maioria dos animais se recusava andar na esteira, permanecendo parados no fundo da raia, provocando lesões. (seta). **C)** No 1º dia de treinamento, um dos animais começou a andar na posição bípede, apoiando as patas dianteiras na divisória frontal (seta). **D-E)** Mediante tal observação, optou-se por posicionar todos os outros animais na mesma postura. **F)** Para manter os animais nessa posição durante os 30 min de corrida, adaptou-se um parafuso na parte frontal da raia (seta) e com um elástico passado por debaixo das escapulas dos animais, foi feito um apoio par melhorar a acomodação na execução do treinamento.

escapulas dos animais, foi feito um apoio para melhor comodidade de execução do treinamento.

Coleta do material



Fig.2 Os animais foram submetidos à eutanásia nos diferentes períodos pré-estabelecidos (Tabela 2), e sempre após 6 horas do término do treinamento físico. Este tempo foi determinado a partir das observações de Koskinen et al., (2004). Após uma overdose de Pentobarbital sódico (100mg/kg), aplicada intraperitonealmente, foi removido o tendão do calcâneo e dividido em duas regiões (seta). Algumas amostras foram processadas para análises histológicas e outras imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises bioquímicas

Tabela 2. Período do Experimento

DIAS DE TREINAMENTO				1º	2º	3º	4º
GRUPO CONTROLE (GC)				C	C	C	C
EUTANÁSIA (E)				E			E
TREINADO EM ESTEIRA (ES)				ES	ES	ES	ES
EUTANÁSIA (E)				E			E
ADAPTADOS (ADP)	ADP	ADP	ADP				
EUTANÁSIA (E)			E				
TREINADO EM SALTOS (T)	ADP	ADP	ADP	T	T	T	T
EUTANÁSIA(E)			E	E		E	

Processamento Histológico

Os tendões foram fixados em paraformaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, por 48 horas. Após a fixação, o material foi lavado em água corrente, desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast (anexo 1) e em historresina (anexo 2). Cortes de 5 µm produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas selanizadas foram corados pela hematoxilina-eosina para uma análise geral da estrutura do tendão (anexo 3), e pelo Azul de toluidina 0,025% em pH 4,0 para glicosaminoglicanos (anexo 4). Pelo Mallory para o colágeno (anexo 5) Pela Reticulina para fibras reticulares (anexo 6).

Os cortes foram observados em luz normal e polarizada e fotomicrografados em microscópio Leica DMLB.

Extração das proteínas

O tendão foi dividido em duas porções: proximal (exclusivamente região de tensão) e distal (presença de fibrocartilagem de compressão e de inserção).

Para a extração das enzimas, uma proporção de 30 mg de tecido para cada 0,1 ml de uma solução de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, contendo 0,25% de Triton X-100 e 10 mM CaCl₂ foi triturada em um homogeneizador do tipo Politron por três ciclos de 5 segundos cada um. O homogeneizado foi incubado por 2 horas a 4°C para aumentar a eficiência da extração (Hashimoto et al. 1998). Após este período, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o conteúdo de proteínas quantificado pelo método de Bradford.

Zimografia

Amostras da extração (30µg de proteínas) e de metaloproteinases comerciais (100 nanogramas) foram submetidas à eletroforese, sob condições não-redutoras, em gel de poliacrilamida a 8% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Depois da eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS, seguindo-se por duas lavagens de 5 minutos em solução tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 5 mM CaCl₂ e 1 mM ZnCl₂. Posteriormente, os géis foram incubados 12 horas na mesma solução a 37°C. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. A massa molecular relativa das bandas foi determinada de acordo com o padrão de peso molecular e das enzimas comerciais utilizados na eletroforese. Foram realizadas análises semiquantitativas por densitometria das bandas.

Achilles tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running

Olga CM Malheiro¹, Camila T Giacomini², Luis A Justulin Jr², Flávia K Delella²,
Sérgio L Felisbino²

¹ São Paulo State University (UNESP), Faculty of Science and Technology, Department of Physical Education, Presidente Prudente, SP, Brazil

² São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, SP, Brazil

Correspondence to: Dr. Sergio L. Felisbino, Department of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University 18.618-000, Botucatu, SP, Brazil.

Telephone/fax: +55 0XX 14 3811 6264

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

This research was supported by an FAPESP and FUNDUNESP grants.

To be submitted to the Journal Applied Physiology

Abstract

Increased activity of MMP-2 and -9 were found in calcaneal tendon after physical training. However, little attention has been given to the distincts mechanical loading that proximal and distal regions of the calcaneal tendon are subjected. Here, we evaluated the effect of two kind physical activities on tendon morphology and matrix metalloproteinase activities in the both proximal (mainly tensile loading) and distal regions (tensile and compressive loading) of rat calcaneal tendon. Wistar rats from control, water adapted, vertical jumping; treadmill running groups were sacrificed after one and four days of physical exercise and six hours after the end of the exercise session. Metalloproteinases (MMPs) activities were analyzed by gelatin zymography. Some tendon samples were processed for histology. Tendons from adapted and trained animals showed active secretory cells and an increased cellularity of peritendinous sheath, but without inflammatory cells. In the proximal region, both pro- and active-MMP-2 were increased with vertical jumping, but only pro-MMP-2 was increased with treadmill running. In contrast, in the distal region, both kind of exercises increased the activity of pro- and active-MMP-2, but mainly treadmill running that increased the active-MMP-2 to about eleven and eight folds after one and four days of training, respectively. No activity of MMP-9 were observed in both tendon regions in this study. In conclusion, distal region of calcaneal tendon is most responsive to tissue remodeling after physical training, mainly by treadmill running, than proximal region and that MMP-2 plays a major role in this adaptive response.

Keywords: tendon, matrix metalloproteinases, physical training, exercise, compressive loading, zymography

Introduction

The most portion of the majority of the tendons are constituted of parallel bunches of collagen fibers interposed between elongated fibroblasts and fibrocytes, that support great traction forces (Birch, 2007). However, some tendons experience additional forces of compression or friction against bone or cartilages, and are known as wrap-around tendons (Benjamin & Ralphs, 1998). In these tendons, the areas that are subjected to the compressive forces develop a fibrocartilage-like tissue. Furthermore, tendon attachment to the bone also presents a fibrocartilage of insertions or entheses (Benjamin et al., 2006). The tendon's fibrocartilages present a different cell and extracellular matrix composition and organization. In contrast with typical tendon structures, tendon's fibrocartilages present chondrocyte-like cells surrounded by a basophilic pericellular matrix with a higher content of hyaluronan and large proteoglycans, such as aggrecan, and collagen type II fibrils and type VI microfibrils (Vogel et al., 1994; Felisbino & Carvalho, 1999; Covizi et al., 2001; Carvalho et al., 2006). This specialization guarantees to the tendon the ability to support compressive forces without to compromise muscle transmission force to the bone.

Among the several wrap-around tendons of the mammals, the calcaneal tendon or Achilles deserves a special interest in sports and medicine (Benjamin et al., 2004; Shaw & Benjamin, 2007). The calcaneal tendon presents a proximal region, closer to the muscle, with the typical tendon structure to resist tensile forces exclusively. However, the distal region, closer to the calcaneus bone, presents two fibrocartilage structures: the first it is a compressive fibrocartilage, which progresses to calcification in older animals, and the second it is the fibrocartilage of the enthesis (Covizi et al., 2001). This specialized and complex region of Achilles tendon has led Benjamin et al., (2004) to propose the concept of an "enthesis organ". Furthermore, the entheses are sites of stress concentration and, consequently, are commonly subjected to overuse injuries (enthesopathies) that are well documented in a number of sports (Benjamin et al., 2006).

Besides acute exercise and physical training have been demonstrated to increase type I collagen synthesis in peritendinous connective tissue of the Achilles tendon in humans, it induced a transient increase in interstitial concentration of the type I collagen degradation product also indicating a rise in type I collagen degradation with exercise (Langberg et al., 2001).

Collagen degradation is initiated extracellularly by a family of neutral zinc-containing endopeptidases named matrix metalloproteinases (MMPs), firstly by

collagenases, such as MMP-1 and MMP-8, and latterly by MMP-2 and MMP-9, which are presented in tissues mostly as latent pro-MMPs (Nagase et al., 2006). MMP-1 and -8 are generally considered to be the most effective at degrading the fibrillar types I and III collagen (Nagase et al., 2006). The gelatinases, MMP-2 and -9, digest the denatured collagens and exhibit specificity toward certain native collagen types. MMP-9, for example, is capable of digesting type IV, XI, and XIV collagens, and MMP-2 is active against a range of collagens, including types fibrillar collagens and IV (Aimes & Quigley, 1995). To control the activity of these MMPs, cells also produce another class of proteins called tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMPs) (Nagase et al., 2006).

Recently, it has been demonstrated that acute exercise resulted fast elevation of interstitial amounts of pro-MMP-9 and TIMP-1 and a late, 3 days after exercise, of pro-MMP-2 in human peritendinous calcaneal tendon tissue (Koskinen et al., 2004), which supports the view that MMPs (and their inhibitors) play a role in ECM adaptation to exercise in tendon tissue. Moreover, Marqueti et al., (2006) also showed a increase in the MMP-2 and MMP-9 in rat calcaneal tendon after five weeks of vertical jumping training with final overload of 70% of body weight. Interestingly, the activity of these MMPs were reduced when the animals received the anabolic AAS (Deca-durabolin 50 and Durateston 50, alternately) simultaneously with the training, suggesting that anabolic-androgenic steroid treatment can impair tissue remodeling in the tendons of animals undergoing physical exercise by down regulating matrix metalloproteinase activity, thus increasing the potential for tendon injury.

However, no previous studies also compared the effect of two different set of exercise in the calcaneal tendon with regardness to these two different regions. In this sense, it seems to be extremely relevant to investigate the effects of the physical exercise on morphology and activity of MMP-2 and MMP-9 in the compression and tension areas of the tendon calcaneal, for a better understanding of the participation of these enzymes in the "turn-over" of the molecules of ECM in normal and pathological physiologic situations in the tendons, submitted to two different set of exercises, resisted and resistance.

Material and Methods

Adult male Wistar rats (13 weeks-old) were employed in this study. Animals were obtained from the Central Stock breeder of the State University of Campinas - UNICAMP (Campinas, SP, Brazil) maintained under controlled temperature and lighting conditions, and had free access to rodent food and water. All animal procedure were performed in accordance with the National Research Council's Guide for Care and Use of Laboratory Animals (1996) e in accordance with the Ethical Principles in the Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Experimentation Animal (COBEA) and approved by the Commission of Ethics in the Animal Experimentation (CEEA) under the protocol n° 63/07-CEEA Botucatu - SP.

Experimental groups

The animals were divided randomly into four experimental groups ($n = 10$). Controls Group (CT): they stayed with free mobility in their cages, with free water and feeding. Adapted group (ADP): to reduce stress, the animals were adapted to water in the tree first days (without over-load). Vertical Jumps Group (VJ): For four consecutive days, they were submitted to a physical training of a daily session composed of 4 sets of 10 jumps into water (at $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$) tank of jumps of appropriate depth to the length of the animals. Among each one of the sets of jumps it was made an interval with equivalent duration to 3 times the time spent by the animal to complete each sets, verified by chronometer (a mean time of 20 seconds to complete each set of jumps followed by ~1 minute of interval). The used overload was regarding 50% of the body weight of each animal. Treadmill Running Group (TR): a group of rats were submitted to a daily session of 30 minutes of treadmill running with a speed of 13m/min with 5 degrees of inclination for four consecutive days.

The animals were submitted to the euthanasia with an overdose of sodium pentobarbital (100mg/kg), applied intraperitoneal, always 6 hours after of the end of the physical training. This time was choosing following the studies of Koskinen et al. (2004). The tendons were removed and some samples were processed for histological analysis and other immediately frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis.

Histology

The calcaneal tendons were immersed in 4% paraformaldehyde dissolved in phosphate buffer saline for 24h. Fixed samples were washed in PBS for 24h, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in glycol metacrylate resin (historesin embedding kit, Leica Heidelberg). Semi-serial sections (3µm) were obtained and stained with Toluidine Blue 0,025% pH 4,0 for morphological analysis.

The sections were analyzed in a Leica DMLB 80 microscope connected to a Leica DC300FX camera and the images were digitalized using image analyzer Leica Q-win software Version 3.1 for Windows™.

Zimography

Frozen samples of right calcaneal tendon were divided in two regions: proximal and distal from five different animals per experimental group and were mechanically homogenized in 50mM Tris buffer pH7.5 plus 0.25% triton-X 100 by Polytron for 30sec at 4°C. The homogenized were centrifuged and protein extracted on supernatant was quantified as per Bradford methods (Bradford, 1976). The extraction was made in duplicate with left tendons from the same five animals. Aliquots (25µg protein) from each extract were subjected to electrophoresis in gelatin-containing polyacrylamide (8% acrylamide) gels in the presence of SDS under no reducing conditions as previously described (Carvalho et al., 2006). The gelatin substrate was present at 0.1% final concentration in the gel. The gels (0.75mm thick) were electrophoresed for 2 hours at 100V, 4°C, in a Bio-Rad MiniProtean III system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA). Following electrophoresis, the gels were gentle shaking at room temperature with 2.5% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.4) (2 changes of 15 min). The gels were then incubated overnight (18h) in 50 mM Tris-HCl (pH 8.4) containing 5mM CaCl₂ and 1µM ZnCl₂ at 37°C. Following incubation, gels were stained with Coomassie Blue. Areas of proteolysis appeared as clear zones against a blue background. Molecular mass determinations were made with reference to prestained protein standards (Bio-Rad Laboratories, Inc.) coelectrophoresed in the gels. The gels were also made in duplicate.

Image gels were captured and the bands corresponding to each enzyme form were quantified by densitometry as Integrated Optical Density (IOD) in an Image Master VDS version 3.0 (Pharmacia Biotech). The values were analyzed statistically.

Statistical Analysis

Values are expressed as mean \pm SD. One-way Anova analysis of variance was performed to determine whether differences existed between all groups ($P < 0.05$), and then the Tukey-Kramer post-test was employed to determine the significance of the differences. A P value of < 0.05 was considered significant. The statistical tests were performed on InStat (version 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA).

Results

The histological analyses showed in the figure 1a-c the typical morphology of the rat calcaneal tendon of the control animals, showing the peritendinous sheath with few vessels and cells (Fig. 1a). In the inner of the tendon proximal region, the fibrocytes presented condensed and flattened nuclei with reduced cytoplasm (Fig. 1b). In contrast, the distal region presented the typical morphology of tendon compressive fibrocartilage, showing chondrocytes with spherical nuclei and ample cytoplasm surrounded by basophilic pericellular matrix (fig. 1c). After 3 days of water adaptation (Fig 1d-f), vertical jumping day 1 (not shown) and day 4 (Fig. 1g), treadmill running day 1 (not shown) and day 4 (Fig. 1h), showed an increase in the thickness, vascularity and cellularity of the peritendinous sheath. No inflammatory infiltrated were observed in any tendon structure or region in this study. In the inner of the tendons submitted to the both physical training, the cells from both proximal and distal regions presented characteristic of more active and secretory cells, such as loose chromatin and large well stained cytoplasm (Fig 1d and e).

The figure 2 shows the gelatinolytic activity of proximal and distal tendon regions of the different experimental groups. The relative molecular masses of clear bands were 72, 64 and 57 kDa which corresponds to the pro-, intermediate- and active-MMP-2, respectively. No clear bands around 92 or 81 kDa from pro- and active-MMP-9 were observed in this study. The analysis of the integrated optical density (IOD)

values, showed in the table 1, demonstrated that pro-MMP-2 gelatinolytic activity increased significantly in the proximal and distal regions of Achilles tendon after 6 hours and after 4 days of vertical jumping and treadmill running ($P < 0,05$). Water adaptation increase pro-MMP-2 activity only in the distal region. However, the active-MMP-2 gelatinolytic activity increased significantly in the proximal region only after vertical jumping ($P < 0,05$), while in the distal region all physical training increased active-MMP-2, but mainly with treadmill running, in which a eleven folds increase was archived after 6 hours of physical training ($P < 0,05$) against eight folds increase with VJ. Furthermore, active-MMP-2 remains eight fold increased after four days of treadmill running, while drops to four folds increase after VJ4 ($P < 0,01$).

Discussion

In addition to an increased collagen synthesis, the adaptation of tendon to loading involves changes in the quality of the tissue structure, such as an increased collagen cross-linking (Heinemeier et al., 2007). Furthermore, a study has revealed that MMPs-mediated collagen degradation also takes place in this process (Riley et al. 2001; Koskinen et al. 2004; Marqueti et al., 2006). However, as far as we know, no previous studies have attempted to well known tissue structure regional variation that are present in some tendons, such as Achilles tendon (Benjamin & Ralphs, 1998; Covizi et al., 2001) in responses to physical training.

In this study, we evaluated separately the two regions of rat Achilles tendon, proximal and distal, with regards to the gelatinolytic activity after two different kind of physical training. The results present here, suggest that, in despite differences in cell types, extracellular matrix composition and organization and mechanical loading, in control rats both tendon regions present the same gelatinolytic profile, with activities of pro- and intermediate- forms of MMP-2. However, after physical training, the two tendon regions exhibit different intensity of MMP-2 activation in response to the two kind of exercises. Vertical jumping induced MMP-2 activation in both tendon regions, but treadmill running, besides appearing with low intensity, was able to induce a high activation of MMP-2 in the distal region of Achilles tendon, but not in the proximal region, in which only pro-MMP-2 activity was increased. The reason for this absence of MMP-2 activation in the proximal region with treadmill running it not does mean that tendon are not responding to the mechanical stimulus, since tenocytes and peritendinous

sheath cells appeared activated. We may speculate that MMP-2 activation was still not required, but the increases in pro-MMP-2 tissue's stock could be further activated if mechanical loading stimulus to perdure.

Marqueti et al., (2006) also observed a significant increase in the gelatinolytic activity of all three forms of MMP-2 in rat Achilles tendon after five weeks of vertical jumping program with overloading. However the authors did not analyzed each band neither each tendon region, proximal and distal, separately.

In a study with human Achilles tendon submitted to intensive uphill running, microdialysis technique were used to measure the peritendinous tissue gelatinolytic activity (Koskinen et al., 2004). The authors observed that pro-MMP-2 was increased only after 3 days of exercise and suggested that the microdialysis technique could not reflect MMP-2 tissue levels very well, because at least part of MMP-2 is attached to membrane-anchored MMPs (NAGASE, 1998).

Besides its major role in removing denatured collagen, MMP-2 may also act directly in tendon collagen turnover, since it has been shown to have some activity against triplehelical type I collagen (Aimes and Quigley, 1995). Thus, in agreement with Riley et al., (2001) and Marqueti et al., (2006) we also suggested that MMP-2 is the main gelatinase in tendon, in which can be active after few hours of exercise.

Again, the results presented in this study contrast with observed by Koskinen et al., (2004) that found an increase in the pro-MMP-9 in peritendinous tissue after 6 hours of treadmill running and this increase remains for 3 days even yet without adictional training. The authors suggested that MMP-9, besides participating in tissue remodeling, could has a role in a potential inflammatory reaction in the peritendinous connective tissue of Achilles tendon induced by intensive exercise or in an inflammatory tissue reaction caused by mechanical lesion of microdialysis probe implantation. Marqueti et al., (2006) also observed some MMP-9 activity in rat Achilles tendon after 5 weeks of vertical jumping with 70% of body weight overloading, however, these authors also found inflammatory infiltrate at the peritendinous sheath. In our study, inflammatory infiltrate in the peritendinous sheath was not observed and this fact may be due to the physical training program used. We choose low intensity of treadmill running and vertical jumping without a progressive increase in overloading and with a generous rest interval between each set of jumping. We choose these training protocols just to avoid inflammatory reaction, which will contribute significantly with gelatinases activity

increase in tendon tissues. Thus, we believe that the absence of inflammation may be reason for the low level of MMP-9 activity observed in this study.

In despite any aspect of inflammation, here we found cellular and vascular changes in peritendinous tissue after exercise. Changes in vasculatization of tendon have been related by other as also adaptation to the exercise, in which is induced by an increased expression of VEGF (Gavin & Wagner, 2001; Pufe et al., 2005; Nakamura et al., 2008). Since, MMP-2 activity is frequently associated with the process of angiogenesis in several tissues (Lafleur et al., 2003; Rundhaug, 2005), the activation of MMP-2 after exercise observed here may also have relationship with changes in blood vessels at peritendinous sheath.

In conclusion, the present findings indicate that MMP-2 activation plays a major role in tendon adaptation to physical training and that different kind of exercises can stimulate differently the Achilles tendon regions, thus investigations on this tendon, always as possible, should not neglect such major characteristic.

Acknowledgements

This work was funded by FAPESP (Sao Paulo State Research Foundation; grants 04/13261-8, to SLF), by FUNDUNESP (Foundation for Development of Sao Paulo State University). This paper is part of the PhD Thesis presented by O.C.M.M. to the São Paulo State University – UNESP, Brazil. Special thanks are due to Dra. M. Dal Pai Silva and to Dr. H. F. Carvalho for collaboration and helpful discussions.

References

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 270: 5872–5876, 1995.

- Benjamin M, Moriggl B, Brenner E, Emery P, McGonagle D, Redman S.** The "enthesis organ" concept: why enthesopathies may not present as focal insertional disorders. *Arthritis Rheum* 50: 3306-13, 2004.
- Benjamin M, Ralphs JR.** Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load. *J Anat* 193: 481-494, 1998.
- Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S.** Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat* 208: 471-490, 2006.
- Birch HL.** Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *Int J Exp Pathol* 88: 241-248, 2007.
- Carvalho HF, Felisbino SL, Keene DR, Vogel KG.** Identification, content, and distribution of type VI collagen in bovine tendons. *Cell Tissue Res* 325: 315-324, 2006.
- Carvalho HF, Vidal BC.** The elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Ann Anat* 177: 397-404, 1995.
- Carvalho RF, Dariolli R, Justulin Junior LA, Sugizaki MM, Politi Okoshi M, Cicogna AC, Felisbino SL, Dal Pai-Silva M.** Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol* 87: 437-443, 2006.
- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF.** Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cell* 33: 483-490, 2001.
- Felisbino SL, Carvalho HF.** Identification and distribution of type VI collagen in tendon fibrocartilages. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31: 187-195, 1999.
- Gavin TP, Wagner PD.** Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene responses in rats. *J Appl Physiol* 90: 1219-1226, 2001.
- Koskinen SO, Heinemeier KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M.** Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Physiol* 96: 861-864, 2004.
- Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR.** Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev Mol Med* 5: 1-39, 2003.
- Langberg H, Rosendal L, Kjaer M.** Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 534: 297-302, 2001.

- Marqueti RC, Parizotto NA, Chrigher RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS.** Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. *Am J Sports Med* 34: 1274-1280, 2006.
- Nagase H, Visse R, Murphy G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-573, 2006.
- Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration.** *Cell Res* 8: 179-186, 1998.
- Nakamura K, Kitaoka K, Tomita K.** Effect of eccentric exercise on the healing process of injured patellar tendon in rats. *J Orthop Sci* 13: 371-378, 2008.
- Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN.** The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* 15: 211-222, 2005.
- Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, and Bank RA.** Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol* 21: 185-195, 2002.
- Rundhaug JE.** Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267-285, 2005.
- Shaw HM, Benjamin M.** Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise. *Scand J Med Sci Sports* 17: 303-315, 2007.
- Vogel KG, Sandy JD, Pogány G, Robbins JR.** Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol* 14: 171-179, 1994.

Figure legends

Figure 1. Longitudinal sections of rat calcaneal tendon stained by Toluidine blue. a) The proximal region from control animals presented elongated fibroblasts/fibrocytes (arrows) between very well longitudinally oriented collagen fibers. The peritendinous sheath (pe) showed few cells and blood vessels (arrowheads). b) Detail of fibrocytes from proximal region (arrow). c) The compression region presents groups of fibrochondrocytes (arrows) surrounded by a metachromatic pericellular matrix and a less oriented distribution of collagen fibers. d) Proximal region from 3 days water adapted animals showing an increase in the cellularity around blood vessels from peritendinous sheath (pe) and activated fibroblast in the inner of tendon (arrows). e) Proximal region detail of figure d showing activated fibroblasts with loose chromatin and large cytoplasm (arrow). f) Distal region from 3 days water adapted animals showing activated fibrochondrocytes (arrows). g) Proximal region from day 4 vertical jumping animals showing that peritendinous sheath (pe) appeared thicker with evident blood vessels (arrowhead). h) Proximal region from day 4 treadmill running animals showing that peritendinous sheath (pe) also appeared thicker and with many cells around blood vessels (arrowhead). Bars scale: a, d, g and h = 30 μm ; b, c, e and f = 10 μm .

Figure 2. Representative gelatin zymography showing that both tendon regions present clear bands with 72, 64 and 57 kDa that corresponds to the pro-, intermediate- and active-MMP-2, respectively.

Figure 1 Longitudinal sections of rat calcaneal tendon stained by Toluidine blue.

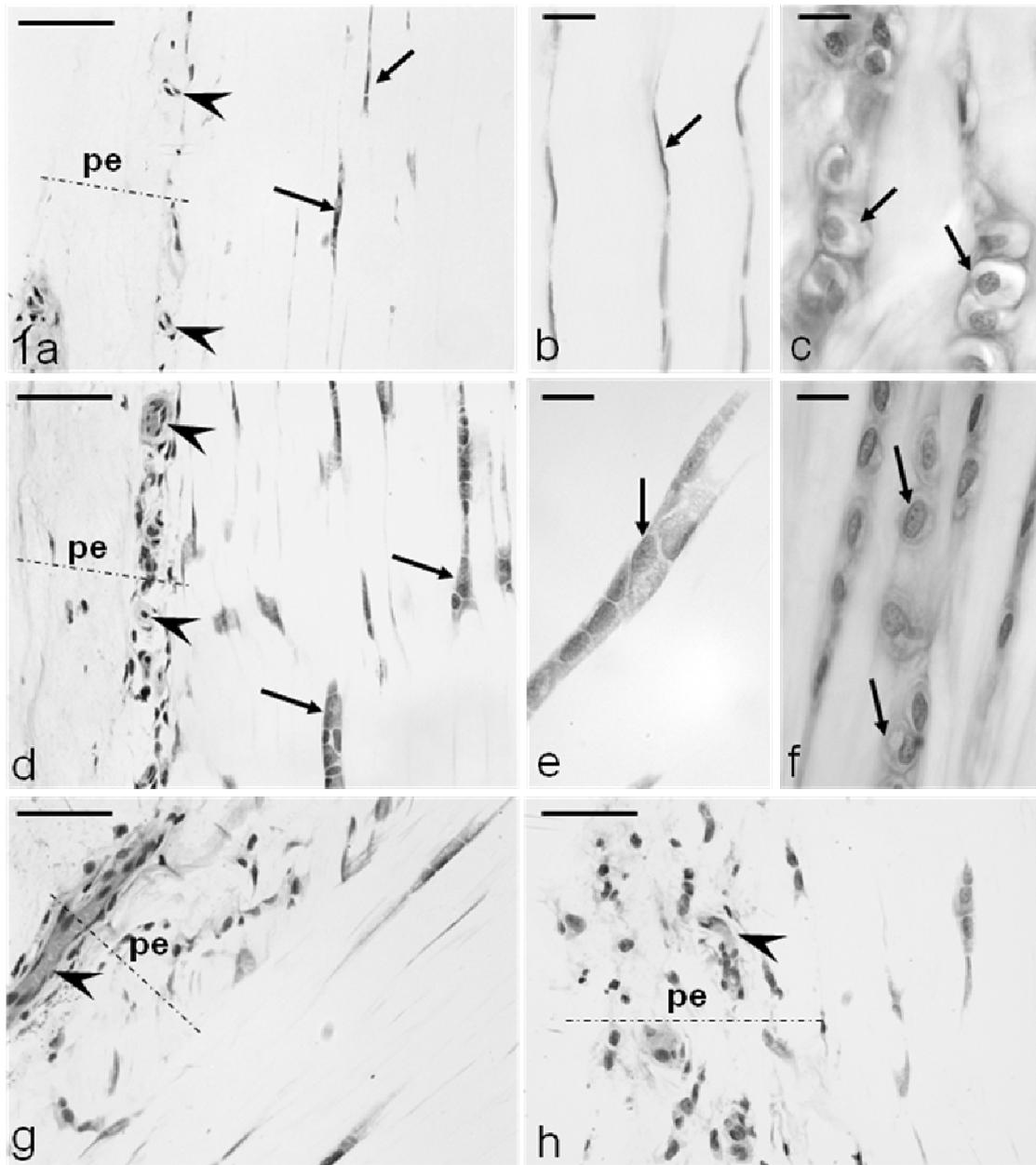


Figure 2. Representative gelatin zymography.

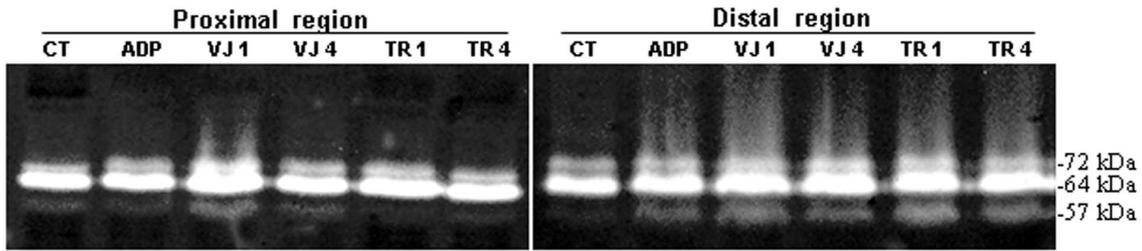


Table 1. Densitometric analysis of MMP-2 gelatinolytic bands from zymography of the rat calcaneal tendon proximal and distal regions. Values represent mean \pm SD X10,000.

Tendon regions and experimental groups	MMP-2 forms			
	pro-(72 kDa)	inter-(64 kDa)	active-(57 kDa)	
Proximal region	control	2,03 \pm 0,35 A	6,6 \pm 0,95	0,41 \pm 0,22 A
	Water adapted	2,76 \pm 0,41 AB	6,98 \pm 1,09	0,31 \pm 0,21 Aa
	Vertical jumping day 1	4,12 \pm 0,68 C	8,95 \pm 1,59	1,48 \pm 0,35 Ba
	Vertical jumping day 4	3,1 \pm 0,57 BC	7,99 \pm 1,37	1,28 \pm 0,32 B
	Treadmill running day 1	3,91 \pm 0,64 C	8,41 \pm 1,45	0,65 \pm 0,29 Aa
	Treadmill running day 4	3,14 \pm 0,61 BC	7,57 \pm 1,26	0,62 \pm 0,31 Aa
	Distal region	control	2,58 \pm 0,49 A	6,89 \pm 1,02
Water adapted		3,44 \pm 0,61 B	7,88 \pm 1,33	1,38 \pm 0,31 Bb
Vertical jumping day 1		4,21 \pm 0,78 B	8,38 \pm 1,48	2,45 \pm 0,52 Cb
Vertical jumping day 4		3,86 \pm 0,66 B	8,92 \pm 1,54	1,42 \pm 0,41 B
Treadmill running day 1		3,77 \pm 0,67 B	8,41 \pm 1,51	3,39 \pm 0,72 Cb
Treadmill running day 4		3,88 \pm 0,75 B	8,52 \pm 1,49	2,65 \pm 0,55 Cb

Superscript letters indicate statistically significant differences $P \leq 0.05$.

Upper cases compare the same tendon region in different experimental groups.

Lower cases compare different tendon regions in the same experimental group

5. Conclusões finais

- No tendão do calcâneo dos ratos do grupo controle, apesar das diferenças morfofisiológicas entre a região proximal e distal, não existe diferença significativa na atividade gelatinolítica da MMP-2;

- Após o exercício físico a atividade da MMP-2 é rapidamente aumentada, dentro de 6 horas, e participa do processo de adaptação dos tendões a este estímulo mecânico;

- A atividade de MMP-2 na região proximal do tendão de Aquiles é mais estimulada pelo treinamento com salto na água, enquanto que na região distal é o treinamento em esteira que induz maior atividade da MMP;

- Na ausência de processo inflamatório, a MMP-9, não participa da remodelação tecidual dos tendões após o exercício físico;

- Estudos envolvendo avaliações sobre os efeitos do exercício físico sobre o tendão de Aquiles devem considerar esta resposta diferencial das diferentes regiões deste tendão.

6. Referência Bibliográfica

- Aimel D, Woo SL, Harwood FL, Akeson WH.** The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. *Acta Orthop Scand* 1982;53:325-32.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, Del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH.** Role of matrix metalloproteinase 9 after cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1681–1689.
- Bar-Shai M, Carmeli E, Coleman R, Rozen N, Perek S, Fuchs D, Reznick AZ.** The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor- κ B in muscles of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 2005;126:289-297.
- Benjamin M, Ralphs JR.** Fibrocartilage in tendons and ligaments – an adaptation to compressive load. *J. Anat.* 1998;193:481- 494.
- Benjamin M, Ralphs JR.** Tendons and Ligaments – an overview. *Histol. Histopathol.* 1997;12:1135 – 1144.
- Benjamin M, Ralphs JR.** The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.* 2000;196: 8-130.
- Biermann H.** Die Knochenbildung im Bereich Periostaler – Diaphysär Sehnen- und Bandansätze. *Z. Zellforsch.* 1957;46, 635-671.
- Biewener AA and Roberts TJ.** Muscle and tendon contributions to force, work, and elastic energy savings: a comparative perspective. *Exerc Sport Sci Rev* 2000;28: 99–107.
- Birk DE, Zychband EI, Woodruff S, Winkelmann DA, Trelstad RL.** Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Developmental Dynamics* 1997;208:291-298.
- Carmeli E, Haimovitz T, Nemcovsky EC.** Cathepsin D and MMP-9 activity increase following a high intensity exercise in hind limb muscles of young rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2007;18:79-86.
- Carmeli E, Moas M, Lennon S, Powers SK.** High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol.* 2005;90:613–619.
- Carvalho HF, Vidal BC.** The elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Ann Anat.* 1995;177:397-404.

- Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF.** Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cel.*2001;33:483-90.
- Erlichman C, Adjei AA, Alberts SR, Sloan JA, Goldberg RM, Pitot HC, Rubin J, Atherton PJ, Klee GG, Humphrey R..** Phase I: study of the matrix metalloproteinase inhibitor, BAY 12–9566. *Ann Oncol* 2001;12: 389–395.
- Everts V, Van Der Zee E, Creemers L, Beertsen W.** Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *Histochem J* 1996;28: 229–245.
- Felisbino SL and Carvalho HF.** Identification and distribution of type VI collagen in tendon fibrocartilages. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1999;31:187–195.
- Fernandez MS, Dennis JE, Drushel RF, Carrino DA, Kimata K., Yamagata M, Caplan A. I.** The dynamics of compartmentalization of embryonic muscle by extracellular matrix molecules. *Dev.Biol.*1991;147:46–61.
- Gómez DE, Alanso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP.**Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74: 111-122.
- Harwood FL, Amiel D.** Differential metabolic responses of periarticular ligaments and tendon to joint immobilization. *J Appl Physiol* 1992;72:1687-91.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, Schjerling P.** Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol.* 2007;582:1303–1316.
- Ishiguro N, Ito T, Obata KI, Fujimoto N, Iwata H.** Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23:1599–1604.
- Jozsa L and Kannus P.** *Human Tendons.* Champaign, IL: Human Kinetics, 1997;1–576.
- Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdiere SM, Fardeau M, and Alameddine HS.** Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 1999;205:158–170.
- Kjær M** Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev* 2004;84:649–698.

- Kjær M, Magnusson P, Krogsgaard M, Møller JB, Olesen J, Heinemeier K, Hansen M, Haraldsson B, Koskinen S, Langberg BEH.** Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J. Anat.* 2006;208:445–450.
- Knese KH, Biermann H.** Die Knochenbildung an Sehnen- und Bandsätzen im Bereich Ursprungs und Chondraler Apophysen. *Z. Zellforsch.* 1958;49, 142-187.
- Koskinen SOA, Ahtikoski AM, Komulainen J, Matthijs K, Hesselink, Dros Maarten R, Takala TE.** Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology* 2002;444:59-72.
- Koskinen SOA, Heinemeier KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M.** Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Physiol.* 2004;96:861–864.
- Koskinen SOA, M. Höyhty, T. Turpeenniemi-Hujanen, V. Martikkala, T. T. Mäkinen, J. Oksa, H. Rintamäki, M. Löfberg, H. Somer, Takala TES.** Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scand J Med Sci Sports* 2001;11: 9–15.
- Lambert CA, Colige AC, Munant C, Lapiere CM, Nussgens BV.** Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol* 2001a;20:397–408.
- Langberg H, Rosendal L, Kjaer M.** Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 2001b;534: 297-302.
- Legerlotz K, Schjerling P, Langberg H, Brüggemann GP, Niehoff A.** The effect of running, strength, and vibration strength training on the mechanical, morphological, and biochemical properties of the Achilles tendon in rats. *J Appl Physiol.* 2007;102:515.
- Mackey AL, Donnelly AE, Turpeenniemi-Hujanen T, Roper HP.** Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions. *J Appl Physiol* 2004;97:197-203.
- Marqueti RC, Parizotto NA, Chrügner RS, Perez SE, Selistre-de-Araujo HS.** Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. *Am J Sports Med.* 2006;34:1274-1280.

- Marqueti RC, Prestes J, Stotzer US, Paschoal M, Leite RD, Perez SE, Selistre de Araujo HS.** MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 2008;29:559-63.
- Matrisian LM.** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trend Genet* 1990;6:121-125.
- McNeilly CM, Banes AJ, Benjamin M, Ralphs JR.** Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat.* 1996;189:593–600.
- Nagase H, Woessner JF.** Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–21494.
- O’ Brien M.** Structure and metabolism of tendons. *Scan. J. Med. Sci. Sports* 1997;7: 55 – 61.
- Olesen JL, Heinemeier KM, Gemmer C, Kjaer M, Flyvbjerg A, Langberg H.** Exercise -dependent IGF-I, IGF-BPs and type-I collagen changes in human peritendinous connective tissue determined by microdialysis. *J Appl Physiol.* 2006a;102:214–220.
- Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G.** Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett* 2001;503: 158–162.
- Ragoowansi R, Khan U, Brown RA, Mcgrouther DA.** Reduction in matrix metalloproteinase production by tendon and synovial fibroblasts after a single exposure to 5-fluorouracil. *Br J Plast Surg* 200;154: 283–287.
- Riley GP, Curry V, DeGroot J, Van EIB, Verzijl N, Halzleman BL, RA.** Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol* 2002;21:185-195.
- Robbins JR, Evanko SP, and Vogel KG.** Mechanical loading and TGF- α regulate proteoglycan synthesis in tendon. *Arch Biochem Biophys* 1997;342: 203–211.
- Rosager S, Aagaard P, Dyhre-Poulsen P, Neergaard K, Kjaer M, Magnusson SP.** Load- displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand J Med Sci Sports* 2002;12: 90–98,
- Rullman E, Rundqvist H, Wagsater D, Fischer H, Eriksson P, Sundberg CJ, Jansson E, Gustafsson T.** A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2007;102:2346–2351.

- Sarasa-Renedo A, Chiquet M.** Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Scand J Med Sci Sports*. 2005;15:223-230
- Silver FH, Freeman JW, Seehra GP.** Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech*. 2003; 36:1529-53.
- Smith K, Rennie MJ.** New approaches and recent results concerning human-tissue collagen synthesis *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10:582-90.
- Sommer HM.** The biomechanical and metabolic effects of a running regime on the Achilles tendon in the rat. *Int Orthop* 1987;11: 71–75,
- Visse R, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827–839.
- Visser NA, Vannkampenn GPJ, Dekoning MHMT, Vanderkorst JK.** The effects of loading on the synthesis of biglycan and decorin in intact mature articular cartilage in vitro. *Connect. Tissue Res*. 1994;0: 241-251.
- Vogel KG, Koob TJ.** Structural specialization in tendon under compression. *Int.rev. Cytol*1998;115, 267-293.
- Vogel K, Fischer LW.** Comparison of antibody reactivity and enzyme sensitivity between small proteoglycans from bovine tendon, bone and cartilage. *J. Chem. Biol.*1986;261; 11334-11340.
- Vogel KG, Heinegard D.** Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. *J. Chem. Biol.*, 1985;260: 9298-9306.
- Williams IF, McCullagh KG, Silver IA.** The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* 1984;12:211-27.
- Zimowska M, Brzoska E, Swierczynska M, Streminska W, Moraczewski J.** Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *Int J Dev Biol*. 2008;52:307-14.

7. Anexos

Anexol

Processamentos para inclusão em Parafina ou Paraplast

Pbs (solução estoque)

1) 5l – 10x concentrado

408,50 NaCl

18,0g NaH₂ PO₄ H₂ O (fosfato de sódio monobásico)

132,50g de Na₂ HPO₄ ,12 H₂O (fosfato de sódio bi-básico)

ou usar : Na₂ PO₄ 7H₂O (99,17g)

Na₂ HPO₄ (anidro –52,50g)

*diluir os sais gradualmente em 5 L de água destilada, o pH deve ser 7.2.

2) Solução de uso:

*diluir PBS 10x para 1x (100ml - 900ml de água destilada)

Solução estoque PBS – 1 L (10x)

Medir Ph 7.2

81,7g de NaCl

3,6g de NaH₂ PO₄H₂O

19,83g Na₂HPO₄ 7H₂O

a formalina tamponada deve ter o Ph final de 7.4

1) Fixação

Formol 10% em

PBS (tampão fosfato 10 mM pH7,4 + 8,5g de NaCl em 1l)

Fixar por 24 a 48 horas

2) Lavagem

Após as 24 horas fixados no formol, cada região dotendão foi colocado em um vasilhame de plástico identificado. Por conseguinte, esses órgãos ficaram imersos em água corrente por mais 24 horas, necessárias para remoção do excesso de fixador.

3) Desidratação

Para a retirada de água dos tecidos, o material coletado passou por uma série crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), já que o meio de inclusão mais utilizado é a parafina e, esse composto não é miscível em água.

- Álcool 70% = 12 horas no mínimo
- Álcool 80% = 20'
- Álcool 90% = 20'
- Álcool 95% = 20'
- Álcool 100% (1) = 40'
- Álcool 100% (2) = 40'
- Álcool 100% (3) = 40'

Obs.: Para a inclusão em historresina basta desidratar até o álcool 100% (1), não necessitando a posterior diafanização para a remoção do álcool, já que a resina é miscível em álcool.

4) Diafanização ou Clarificação

Esta etapa promove a retirada do álcool e permite que a parafina penetre no tecido (porque a parafina também não é miscível no álcool). Além disso, a diafanização remove a gordura dos tecidos, deixando-os translúcidos.

- Álcool-Xilol = 20'
- Xilol 1 = 20'
- Xilol 2 = 20'

5) Inclusão:

Nesta etapa utiliza-se a parafina líquida mantida à 60° C numa estufa onde serão incluídos os órgãos, para promover a entrada deste composto na intimidade dos tecidos à medida que o xilol evapora, para depois de solidificada, constituir o bloco histológico.

- Parafina 1 = 1 hora
- Parafina 2 = 1 hora
- Parafina 3 = 1 hora

6) Emblocagem

Após a infiltração, deposita-se o fragmento a ser estudado no interior de uma caixinha de papel ou plástico contendo parafina fundida e, à temperatura ambiente, formar-se-á um bloquinho, o qual será levado ao micrótomo para o feitiço dos cortes histológicos. Neste momento deve-se orientar o material biológico na caixinha, de maneira que se promovam os cortes adequados àquele tipo de tecido e estudo desejado.

7) Corte do Tecido

Essa técnica consiste em coletar o material, que deverá ser fino ou transparente o suficiente para que o mesmo possa ser colocado diretamente sobre uma lâmina, e, assim, permitir as técnicas subseqüentes de fixação e coloração. Esse tipo de procedimento é utilizado para obtenção de células inteiras, podendo inclusive ser feitas medidas e quantificações.

8) Distensão do corte

Após o corte do tecido efetuado no micrótomo, a fita de parafina obtida foi colocada em álcool 30% e depois em banho-maria (glicerina e água quente) para realizar-se a distensão e a pesca do corte em lâmina histológica.

9) Secagem

Esta etapa é realizada colocando-se as lâminas em estufa à 37° C. É necessária para a adesão dos cortes na lâmina.

10) Colorações

Seguem abaixo os diferentes protocolos utilizados nas práticas de colorações:

Anexo 2

Processamentos para inclusão em historresina:

Para o material ser incluído em historresina, ele passará por um processo diferente daquele que antecedeu a inclusão em parafina. Assim, teremos:

1º) Fixação e lavagem igual à descrita anteriormente (parafina)

2º) Desidratação :

- Álcool 70% = 1 hora
- Álcool 80% = 1 hora
- Álcool 90% = 1 hora
- Álcool 95% = 1 hora
- Álcool 100% = 1 hora

3º) Infiltração da resina no material:

- Resina líquida de infiltração = 12 horas
- *Resina líquida de infiltração + pó ativador (peróxido de benzoíla) = 4-12 horas

* Preparação: l envelope do pó ativador para cada 100ml da resina.

4º) Emblocagem :

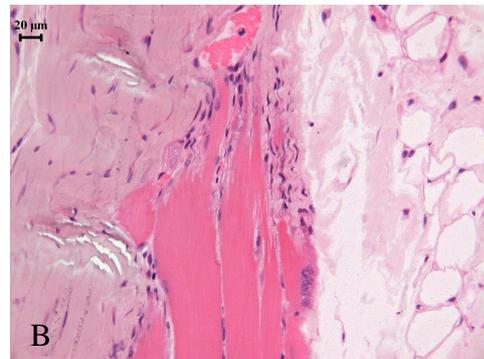
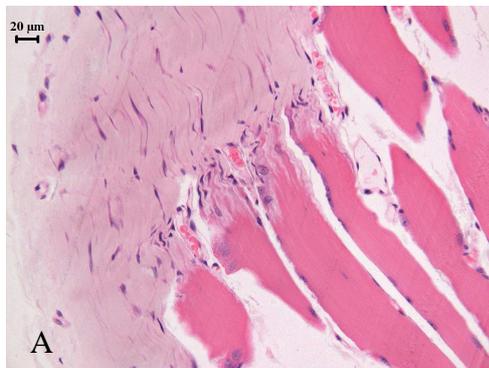
- Resina de emblocagem = resina + pó ativador + endurecedor.

Deixar em estufa 37º C até endurecer.

5º) Desenformar do molde e colar o bloco de historresina em uma “madeirinha”, com cola araldite.

-Coloração em historresina-

Hematoxilina/Eosina em historresina



(A e B) Corte longitudinal da região proximal (junção miotendinosa) do tendão do calcâneo do rato do grupo ADP mostrando fibras de músculo esquelético com fibras colágenas inseridas (H/E20x)

1º) Corar com hematoxilina por 15'

2º) Lavar em água por 10'.

3º) Corar com eosina : 2'.

4º) Lavar em água corrente : 2'.

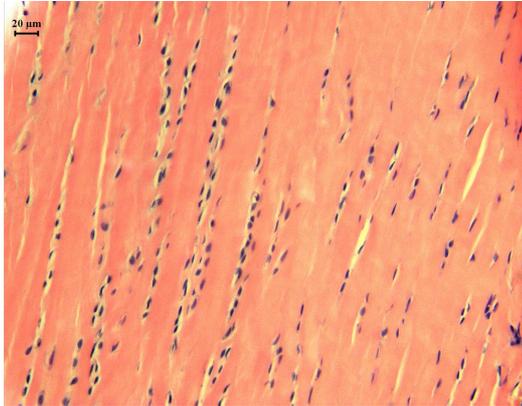
5º) Secar ao ar ou em estufa - 1 hora

6º) Montar

Permunt = para fixar a lamínula sobre o corte

Anexo 3

- Coloração pela Hematoxilina /Eosina (HE) (parafina /paraplast)



Corte longitudinal da região de compressão do tendão do calcâneo do rato do grupo ADP mostrando fibras colágenas paralelas com fibrocondrócitos enfileirados (HE 20x)

Os cortes já estendidos nas lamínas impregnados de parafina, devem ser deixados algumas horas, sempre verificando a parafina derretendo para sobrar apenas o corte na lamina. Na seqüência proceder da seguinte forma:

1°) Desparafinização

- Xilol 1 = 10'
- Xilol 2 = 10'

2°) Hidratação :

- Álcool 100% = 5'
- Álcool 100% = 5'
- Álcool 95% = 5'
- Álcool 70% = 5'
- Duas lavadas em água e permanecer lavando por 10' em água corrente

3°) Coloração:

- Hematoxilina = 5'
- Duas lavadas em água e permanecer lavando em água corrente até que apenas os núcleos fiquem corados em azul
- Passar no *diferenciador = 10 à 20s.
- Duas lavadas em água e permanecer lavando por 10' em água corrente
- Eosina = 2'
- Lavar em água = 5 à 6 vezes, para tirar o excesso do corante

* Diferenciador : álcool 70% / HCl 0,5% - para tirar o excesso do corante

4°) Desidratação:

- Álcool 95% = 5'
- Álcool 100% = 5'
- Álcool 100% = 5'

5°) Diafanização:

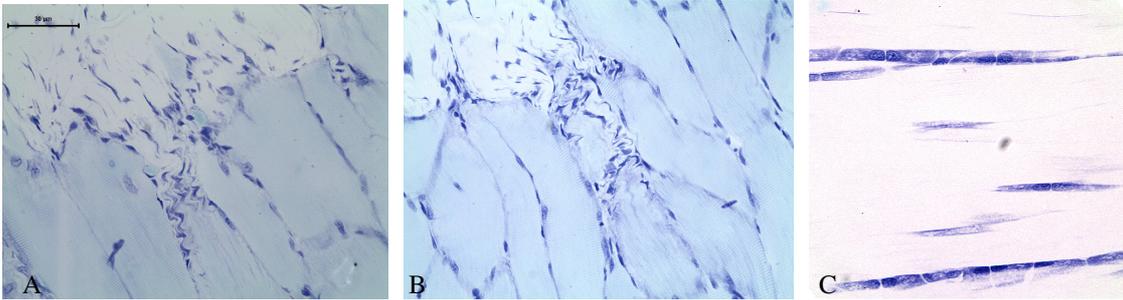
- Álcool-Xilol = 5'
- Xilol 11 = 5'
- Xilol 12 = 5'

6°) Montagem

- Permunt = para fixar a lamínula sobre o corte.

Anexo 4

- Coloração pelo Azul de Toluidina (AT)



(A e B)

Corte longitudinal da região proximal (junção miotendinosa) do tendão do calcâneo do rato do grupo ADP (AT 100x). (C) Corte longitudinal da região proximal do tendão do calcâneo do rato do grupo VJ4 mostrando fibroblastos em atividade. (AT 100x)

1º) Desparafinização (como no HE)

2º) Hidratação (como no HE)

3º) Coloração :-colocar AT 0,025% em tampão Citrato fosfato 0,1 M ph 4,0 por 15`.

4º) Lavar 5 vezes em água destilada

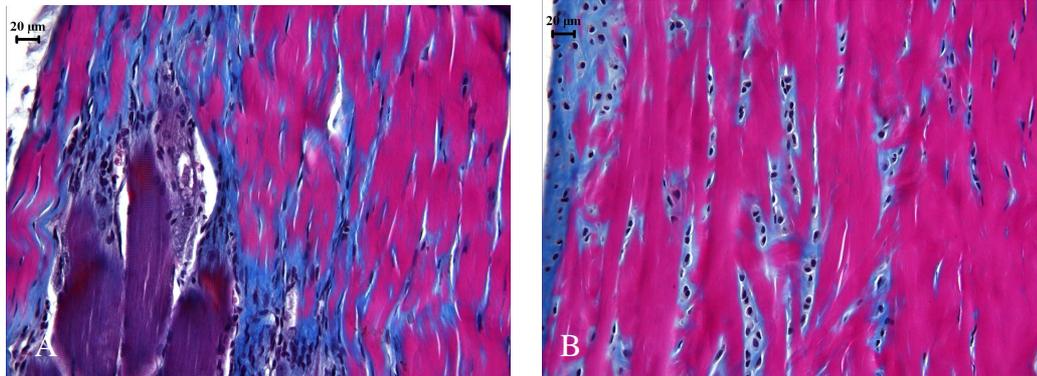
5º) Deixar secar ao ar por 12 horas

6º) Montar

Permunt = para fixar a lamínula sobre o corte.

Anexo5

- Coloração pelo Mallory



(A) Corte longitudinal da região proximal (junção miotendinosa) do tendão do calcâneo do rato do grupo ADP (20x). (B) Corte longitudinal da região de compressão do tendão do calcâneo do rato do grupo ADP mostrando fibras colágenas em rosa (Mallory 20x)

- 1º Desparafinização e hidratação (como no H.E)
- 2º Lavar os cortes em água
- 3º Passar no Hematoxilina – 5`
- 4º Mallory solução A – 5`
- 5º Mallroy solução B – 5`
- 6º Lavar em água corrente para retirar o excesso
- 7º Desidratar
 - Álcool 95% = 5`
 - Álcool 100% = 5`
 - Álcool 100% = 5`
- 8º) Diafanização:
 - Álcool-Xilol = 5`
 - Xilol 11 = 5`
 - Xilol 12 = 5`
- 9º) Montar
 - Permount = para fixar a lamínula sobre o corte.

Anexo 6

- Coloração pela Reticulina



(A e B) Corte longitudinal da região proximal (junção miotendinosa) do tendão do calcâneo do rato do grupo VJ4 mostrando fibras reticulares entremeadas com fibras musculares (Reticulina 100x)

Método de coloração: todas as substâncias devem ser gotejadas sobre os cortes histológicos. Após a reação, as lâminas devem ser muito bem lavadas, com a finalidade de evitar a formação de precipitado nos tecidos.

- 1º) Banhar em permanganato de potássio 1% por 5'.
- 2º) Lavar rapidamente em água destilada.
- 3º) Banhar em ácido oxálico 3% por 2'.
- 4º) Lavar rapidamente em água destilada.
- 5º) Banhar em alúmen de ferro 1% por 3'.
- 6º) Lavar rapidamente em água destilada.
- 7º) Banhar em prata amoniacal por 3'.
- 8º) Lavar bem em água destilada.
- 9º) Banhar em formol 10% por 3'.
- 10º) Lavar rapidamente em água destilada.
- 11º) Banhar em cloreto de ouro 0,2% = tempo indeterminado: gotejar a solução sobre o corte e observar o microscópio até que se atinja a tonalidade desejada.
- 12º) Lavar rapidamente em água destilada. Secar.
- 13º) Montar as lâminas em bálsamo do Canadá.

Preparo das soluções:

Permanganato de potássio 1%: dissolver 1g de permanganato de potássio (KmnO₄) em 100ml de água destilada.

Ácido oxálico 3%: dissolver 3g de ácido oxálico em 100ml de água destilada.

Alúmen de ferro 1%: dissolver 1g de alúmen de ferro em 100ml de água destilada.

Prata amoniacal:

- Nitrato de prata (AgNO₃) 10%
- Hidróxido de sódio 10%
- Hidróxido de amônio (P.A.)

Misturar o nitrato de prata ao hidróxido de sódio com o auxílio de um agitador magnético. Adicionar o hidróxido de amônio até a dissolução do precipitado (no máximo 4ml) e duplicar o volume da solução com água destilada.

Formol 10%: diluir 1ml de formol em 9ml de água destilada.

Cloreto de ouro 2%: dissolver 0,2g de cloreto de ouro em 100ml de água destilada.

Hipossulfito de sódio 2%: dissolver 2g de hipossulfito de sódio em 100ml e água destilada.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)