



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JOSETE MAZON

**“EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE
EXERCÍCIO RESISTIDO NA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DAS MMP-2 E MMP-9 E NA
ORGANIZAÇÃO DOS FEIXES DE COLÁGENO EM
TENDÃO CALCÂNEO DE RATO WISTAR”**

Campinas, 2015

JOSETE MAZON

**“EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE
EXERCÍCIO RESISTIDO NA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DAS MMP-2 E MMP-9 E NA
ORGANIZAÇÃO DOS FEIXES DE COLÁGENO EM
TENDÃO CALCÂNEO DE RATO WISTAR”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna *Josete Mazon* e orientada pelo Dr. Edson Rosa Pimentel.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES / FUMDES-SC

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

M458e Mazon, Josete, 1975-
Efeito de diferentes intensidades de exercício resistido na atividade biológica das MMP-2 e MMP-9 e na organização dos feixes de colágeno em tendão calcâneo de rato Wistar / Josete Mazon. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Colágeno. 2. Exercício. 3. Tendão calcâneo. 4. Matriz extracelular. I. Pimentel, Edson Rosa, 1949-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of different resistance exercise intensities in the biological activity of MMP-2 and MMP-9 and organization of collagen bundles in Achilles tendon Wistar rat

Palavras-chave em inglês:

Collagen

Exercise

Achilles tendon

Extracellular matrix

Área de concentração: Anatomia

Títuloção: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Edson Rosa Pimentel [Orientador]

Evanisi Teresa Palomari

Tatiana Carla Tomiosso

Bárbara Regina Alvarez

Cristiano Pedrozo Vieira

Data de defesa: 15-12-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 15 de dezembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel (Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Assinatura

Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso

Assinatura

Profa. Dra. Bárbara Regina Alvarez

Assinatura

Prof. Dr. Cristiano Pedrozo Vieira

Assinatura

Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Augusto Marretto Esquisatto

Assinatura

Profa. Dra. Gláucia Maria Tech dos Santos

Assinatura

AGRADECIMENTOS

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

A CAPES/PROAP, CNPq e FUMDES/SC pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Edson Rosa Pimentel, que aceitou orientar minha tese e permitiu que eu pudesse avançar mais um passo em minha carreira profissional. Agradecer também pela sua paciência e pela confiança, dizer o quanto lhe admiro e que tenho tentado trilhar minha conduta profissional inspirada na sua forma de condução, com generosidade, humildade e sabedoria! Muito, muito obrigada por tudo!!

À Andrea Aparecida de Aro, uma amiga muito querida que conquistei nestes anos... Andrea, além da amizade sincera que tenho por você, tenho também muita gratidão, muito obrigada por teres dedicado teu tempo e compartilhar comigo teus conhecimentos, auxílio no laboratório e nas análises. Também agradeço pelo ombro amigo de tantos desabafos...

Aos membros da banca e em especial a Evanisi Teresa Palomari, Cristiano Pedroso Vieira e Silvia Borges Pimentel de Oliveira que aceitaram avaliar e contribuir com minha tese desde a qualificação da mesma. Agradecer a Tatiana Carla Tomiosso e dizer que fiquei feliz que nossos caminhos se cruzaram novamente e da importância em contar com tua contribuição neste dia. E a Bárbara Regina Alvarez, minha grande amiga, muito obrigada por aceitar o convite, obrigada pelas palavras de incentivo, encorajamento e contribuições durante estes anos.

À Priscyla Waleska Targino de Azevedo Simões pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Lílíam A. Senne pelas orientações e a disponibilidade sempre em ajudar!

Ao Francisco Malatesta pelo auxílio técnico no laboratório durante os experimentos.

À Equipe do LAFIBE da Unesc, meus agradecimentos por permitir a utilização do espaço físico e dos equipamentos para o treinamento dos animais.

À Vanilde Dela Giustina (minha querida tia) que sempre me acolheu em sua casa e que torceu por mim durante estes anos, muito obrigada!

À minha mãe Otilia, pessoa humilde, mas muito sábia, meu profundo agradecimento por tudo! Te amo muito mãe!

Em especial aqueles que fazem parte da família que constituí, meus filhos Charles Filho e Tainan, e meu esposo Charles! Muito obrigada por lutarem junto comigo, por compreenderem os momentos difíceis, mas principalmente o apoio e amor incondicional. Vocês são e sempre serão minha fortaleza! Amo vocês demais!!

E a Deus... fonte de confiança e conforto!

RESUMO

Os diferentes protocolos ou métodos de treinamento resistido são os treinamentos de hipertrofia, de força e o de resistência. O treinamento resistido vem se tornando cada vez mais estudado por pesquisadores devido à importância para a manutenção da saúde e para o desempenho dos atletas. Este tipo de treinamento pode evitar possíveis lesões por meio do fortalecimento de músculos e tendões. Entre os vários tendões, o tendão calcâneo é um dos mais estudados na medicina esportiva. O tendão calcâneo possui matriz extracelular (MEC), constituída por fibras de colágeno e elastina, glicoproteínas não colagênicas e proteoglicanos, e capaz de se adaptar a diferentes estímulos biomecânicos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar a resposta de diferentes protocolos de treinamento resistido como hipertrofia, força e resistência, sobre a organização dos tendões calcaneares após treinamento. Ratos Wistar foram divididos nos grupos: não-treinado (NT), treinamento de resistência (TR), treinamento de hipertrofia (TH) e treinamento de força (TF). O protocolo de treinamento em plataforma de escalada vertical foi realizado três dias por semana, durante doze semanas para todos os grupos de treinamento. A quantificação de hidroxiprolina, que infere na concentração de colágeno total no tecido, mostrou maior concentração nos grupos TH e TR em relação ao grupo NT. Com relação à dosagem de proteínas não colagênicas foi observada maior concentração no grupo TR quando comparado aos demais grupos. Na microscopia de polarização as medidas de birrefringência para detecção da organização das fibras de colágeno nos tendões mostraram maior birrefringência no grupo TH e menor valor no grupo TF, quando comparados ao grupo NT. Na densitometria de bandas (pixels), o grupo TF apresentou maior valor para a isoforma latente da MMP-9 quando comparado com os grupos TH, TR e NT. A banda correspondente à isoforma ativa da MMP-9 foi mais proeminente no grupo TH. Na zimografia para MMP-2 a densitometria de bandas mostrou diferenças significativas da isoforma latente entre os grupos TH e NT. Na análise das isoformas intermediária e ativa foram encontrados resultados significativos quando comparados os grupos de treinamento ao grupo não-treinado. Nos cortes corados com azul de toluidina (AT), maior metacromasia foi observada na região distal dos tendões dos grupos TH e TR. Concluímos que estes protocolos promoveram diferentes respostas na MEC principalmente na concentração de colágeno total, quantidade de MMP-2 e MMP-9 e na organização dos feixes de colágeno, sugerindo que os protocolos promovem efeitos de remodelamento na MEC.

Palavras-chave: exercício resistido, tendão, matriz extracelular.

ABSTRACT

The calcaneal tendon has an fibrous extracellular matrix (ECM) consisting of collagen, glycoproteins and proteoglycans, and it is able to adapt to different biomechanical stimuli. In this sense, the objective of this study was to analyze the response of different resistance-training protocols, such as hypertrophy, strength and resistance, on the organization of the calcaneal tendon after training. Wistar rats were divided into the following groups: untrained (UT), resistance training (RT), hypertrophy training (HT), and strength training (ST). The training protocol in vertical climbing platform was performed thrice per week during twelve weeks. The quantification of hydroxyproline, which infers the total collagen concentration in the tissues, showed higher concentrations in the HT and RT groups compared with the NT group. Regarding the levels of non-collagenous proteins, a higher concentration was observed in the RT group when compared with the other groups. In polarization microscopy, the birefringence measures for the detection of collagen fibers organization in the tendons showed higher birefringence in the HT group and lower birefringence in the ST group when compared with the NT group. In densitometry of bands (pixels), the ST group showed a higher value for the latent MMP-9 isoform compared with the HT, UT and RT groups. The band corresponding to the active MMP-9 form was more prominent in the HT group. In zymography for MMP-2, the densitometry of bands showed significant differences of the latent isoform between the HT and UT groups. In the analysis of intermediate and active isoforms, significant results have been found when comparing the trained groups with the non-trained group. In sections stained with toluidine blue (TB), higher metachromasia was observed in tendon's distal region in the TH and TR groups, as this area is subject to compression forces, indicating greater amount of proteoglycans. We conclude that these protocols produced different responses in the ECM, especially in total collagen concentration, amount of MMP-2 and MMP-9, and in the organization of collagen bundles, suggesting that the protocols promote a remodeling effect on the ECM.

Keywords: Extracellular matrix, Matrix metalloproteinase, Exercise, Achilles tendon.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACSM – American College of Sports Medicine

AT – Azul de toluidina

BSA – Albumina sérica bovina

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

GAG – Glicosaminoglicano

HE – Hematoxilina-eosina

LAFIBE – Laboratório de fisiologia e bioquímica do exercício

MEC – Matriz extracelular

MMP – Metaloproteinase

NT – Não treinado

PG – Proteoglicano

PNC – Proteínas não colagênicas

RM – Repetição máxima

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase

TF – Treinamento de força

TR – Treinamento de resistência

TH – Treinamento de hipertrofia

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Exercício Resistido	11
1.1.1 Treinamento de resistência muscular	12
1.1.2 Treinamento de hipertrofia	13
1.1.3 Treinamento de força	14
1.2 Características estruturais e bioquímicas do tendão calcâneo	16
1.3 Metaloproteínas de Matriz Extracelular	18
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Gerais	20
3.2 Específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Animais	21
4.2 Grupos experimentais	21
4.3 Protocolo de exercício	21
4.3.1 Treinamento de resistência muscular (TR)	22
4.3.2 Treinamento de hipertrofia (TH)	23
4.3.3 Treinamento de força (TF)	23
4.4 Análises bioquímicas	24
4.4.1 Extração dos componentes da MEC do tendão	24
4.4.2 Quantificação de hidroxiprolina	25
4.4.3 Dosagens de proteínas não colagênicas	25
4.4.4 Zimografia para detecção de gelatinases MMP-2 e MMP-9	25
4.4.5 Quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados	26
4.5 Análises morfológicas	26
4.5.1 Análise da birrefringência	26
4.5.2 Análise em microscopia de luz comum	26
4.6 Análise Estatística	27
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o treinamento resistido ganhou ampla divulgação na sociedade sendo indicado tanto para a manutenção da saúde na população em geral (FISHER *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2014; PALOP MONTORO *et al.*, 2015), quanto para o aprimoramento do desempenho em atletas (MARQUES *et al.*, 2013; VAVERKA *et al.*, 2013). Portanto o treinamento resistido tem aplicabilidade para diferentes populações devido às adaptações morfológicas (aumento na área de secção transversa do músculo), neuromusculares (aumento do recrutamento das unidades motoras), fisiológicas (aumento da resistência elástica das fibras do sarcômero ao alongamento) e metabólicas (aumento da síntese protéica) que produz (ACSM, 2009; BARROSO *et al.*, 2005). Entretanto a repetição de determinados tipos de atividade com posições e movimentos habituais ou o período e a sobrecarga de treinamento promovem um processo de adaptação orgânica que podem resultar em efeitos deletérios como lesões musculares, articulares e ligamentares e ou efeitos benéficos como, por exemplo, a estabilidade articular e a absorção de forças externas atuantes nas articulações dos membros inferiores principalmente e para diversas estruturas anatômicas do corpo (CADOORE *et al.*, 2014). Neste contexto o treinamento resistido também é visto como um componente importante na reabilitação física, auxiliando na recuperação ou também atuando para a prevenção de doenças, especialmente no processo de envelhecimento (AARSKOG *et al.*, 2012).

1.1 Exercício Resistido

O treinamento resistido vem se tornando cada vez mais estudado por pesquisadores por sua importância tanto para a manutenção da saúde, na população em geral, quanto para o desempenho em atletas. (BARROSO *et al.*, 2005; FISHER *et al.*, 2011). É utilizado para descrever algum tipo de exercício que requer o movimento ou a tentativa de mover um músculo contra uma força oposta (FISHER *et al.*, 2011). Uma das principais adaptações associadas à prática do treinamento com peso é o aumento nos níveis de força muscular, relacionada a dois fatores principais: neurais e musculares (ARMSTRONG *et al.*, 1983; FAVIER *et al.*, 1986).

As adaptações neurais ocorrem principalmente devido a maior ativação do sistema nervoso central, a padrões de recrutamento neurais mais eficientes e a uma melhor

sincronização das unidades motoras, estas adaptações acontecem de forma mais acentuada durante as primeiras semanas de treinamento, sendo predominante no treinamento de força (FAVIER *et al.*, 1986). No treinamento de hipertrofia, as adaptações musculares são determinadas por fatores anatômicos e fisiológicos localizados na unidade músculo-articular e ocorrem após algumas semanas de treinamento (BARROSO *et al.*, 2005; MCARDLE *et al.*, 2008). Já o treinamento de resistência proporciona resultados positivos na função cardíaco-respiratória e no desempenho motor, também promove ganhos de força aumento da ativação da unidade motora (WAUGH *et al.*, 2014).

O tipo de contração muscular no treinamento resistido é isotônica de ação concêntrica e excêntrica. A ação concêntrica refere-se a trabalhos nos quais o músculo encurta-se e o comprimento diminui, quando a resistência (peso) é menor que a força. Ao contrário da ação concêntrica, no trabalho excêntrico o músculo alonga-se e o ângulo articular aumenta, ou seja, os trabalhos excêntricos fazem o músculo retornar ao comprimento original (FAVIER *et al.*, 1986). Assim a contração muscular por meio do estímulo mecânico, principalmente com peso, provoca adaptações que resultam em aumento da área de secção transversa no músculo e alterações nas características contráteis das fibras musculares e tendinosas (BARROSO *et al.*, 2005).

Para verificar os efeitos agudos e crônicos do exercício resistido os modelos experimentais que utilizam animais tem sido de suma importância ampliando o conhecimento em diversas áreas. Os modelos mais utilizados atualmente são exercício em esteira (CONTARTEZE *et al.*, 2008; MELLO MALHEIRO *et al.*, 2009; KE *et al.*, 2011), impulsão vertical (MELLO MALHEIRO *et al.*, 2009), natação (CONTARTEZE *et al.*, 2008; CAMBRI *et al.*, 2011) e escalada vertical (HORNBERGER & FARRAR, 2004; SCHEFFER *et al.*, 2012) os quais mimetizam o treinamento resistido em humanos (MARQUETTI *et al.*, 2008; AGUIAR *et al.*, 2010), entre estes o treinamento em escalada vertical foi desenvolvido por Hornberger e Farrar (2004) e demonstrou que oito semanas de treinamento induziu hipertrofia muscular esquelética em ratos Sprague-Dawley, sugerindo que o protocolo pode imitar o treinamento resistido progressivo de humanos (LEE & FARRAR, 2003; HORNBERGER & FARRAR, 2004).

1.1.1 Treinamento de resistência muscular

No contexto do treinamento resistido a resistência muscular é a capacidade que o músculo tem de realizar repetidamente, por um longo período de tempo e com cargas

moderadas, contrações dinâmicas (concêntricas/excêntricas) ou estáticas (isométricas) (BARROSO *et al.*, 2005). A resistência é obtida por repetidas contrações da fibra muscular, exigindo um contínuo suprimento de energia e ativação das fibras musculares. Portanto a força de resistência condiciona ao sistema neuromuscular sustentar níveis de força moderado por intervalos de tempo prolongado. Os testes para treinamento de resistência muscular são aqueles que diversas contrações são realizadas com cargas submáximas (MCARDLE *et al.*, 2008; MAYER *et al.*, 2011). Neste tipo de treinamento enfatiza-se um maior volume de repetições com menores cargas. O número de repetições varia de 13 a 20, utilizando cargas de 40 – 60% de 1RM (repetição máxima) (BARROSO *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2015). Neste tipo de treinamento, por exemplo, podem ser utilizados vários tipos de equipamentos e materiais na modalidade de circuito (Figura 1).



Figura 1. Equipamentos e materiais utilizados para treinamento de resistência em circuito. (Imagem do site www.lamiadolcevita.com.br).

1.1.2 Treinamento de hipertrofia

O treinamento resistido de hipertrofia desenvolve no músculo o aumento do tamanho das fibras individuais induzindo a marcantes alterações morfológicas (BARROSO *et*

al., 2005) e este aumento na tensão muscular (força) proporciona o estímulo primário dando início ao diferencial de volume no músculo esquelético (MCARDLE *et al.*, 2008, PARK *et al.*, 2015). Este aumento ocorre devido ao estresse mecânico que induz as proteínas sinalizadoras a ativarem os genes que estimulam a síntese protéica refletindo na adaptação biológica fundamental a uma maior carga de trabalho (MAYER *et al.*, 2011, PARK *et al.*, 2015). No treinamento de hipertrofia as repetições variam de 6 a 12 com um percentual da carga de 70-90% de 1RM (repetição máxima). Esta carga favorece o aumento das miofibrilas, da densidade capilar, maior quantidade de proteínas contráteis (actina e miosina), de enzimas e nutrientes armazenados, levando a um aumento na área transversal do músculo e conseqüentemente a uma hipertrofia muscular (FAVIER *et al.*, 1986; MAYER *et al.*, 2011). Este tipo de treinamento é muito utilizado, por exemplo, por atletas de fisioculturismo (Figura 2).



Figura 2. Atleta egípcio de fisioculturismo Mamdouh Elssbiay. (Imagem do site da International Federation of Bodybuilding and Fitness (IFBB, 2015)).

1.1.3 Treinamento de força

A força é a capacidade de superação da resistência externa e de ação oposta a esta resistência, por meio dos esforços musculares (ALESHINSKY & ZATSIORSKY, 1978; BARROSO *et al.*, 2005), portanto caracteriza-se pelo desenvolvimento de força máxima durante um esforço isolado, em que fatores neuromusculares ou neurais podem aumentar ou afetar os ganhos de força. É diretamente proporcional a capacidade contrátil dos músculos, que são dependentes da quantidade de proteína contrátil nas fibras musculares, e da capacidade de recrutamento de unidades motoras (GHORAYEB & BARROS, 1999).

Os mecanismos de adaptações neurais e morfológicas interagem no decorrer de um período de treinamento de força e nas etapas iniciais do treinamento (4-6 semanas) após esse período inicial, a contribuição das adaptações morfológicas aumenta, enquanto das neurais tende a diminuir. O ganho de força depende da otimização dessas adaptações durante o treinamento (FARTHING & CHILIBECK, 2003). Nesta modalidade de treinamento o número de repetições varia de 04 a 05, utilizando cargas de 70 – 100% de 1RM (BARROSO *et al.*, 2005). Podemos citar como um exemplo para este tipo de treinamento os atletas da confederação brasileira de levantamento de pesos (Figura 3).



Figura 3. Atleta brasileiro de levantamento de peso Fernando Reis. (Imagem do site da Confederação Brasileira de Levantamento de Pesos (CBLP, 2015)).

Portanto para os envolvidos no esporte, o treinamento resistido pode evitar possíveis lesões por meio do fortalecimento de músculos e tendões (FISHER *et al.*, 2011).

Entre os vários tendões, o tendão calcâneo tem despertado especial interesse devido à sua importância na medicina esportiva (BENJAMIN *et al.*, 2004; SHAW & BENJAMIN, 2007).

1.2 Características estruturais e bioquímicas do tendão calcâneo

O tendão calcâneo se origina da junção das aponeuroses dos músculos gastrocnêmios lateral e medial e do sóleo que constituem o músculo tríceps sural e insere no osso calcâneo da região tarsal do pé (KOSKINEN *et al.*, 2004) É um dos mais resistentes tendões do corpo humano (SIMONSEN *et al.*, 1995; KOSKINEN *et al.*, 2004) e recrutado constantemente durante as atividades diárias ou em atividades esportivas. Em sua estrutura anatômica o tendão é circundado por tecido conjuntivo frouxo, que permite o seu movimento contra os tecidos vizinhos abaixo deste tecido. Todo o tendão é circundado por uma fina bainha de tecido conjuntivo, que envolve cada fibra do tendão e une essas fibras individuais, formando grandes unidades de feixes de fibras de colágeno (O'BRIEN, 1997; KJAER, 2004).

No tecido conjuntivo do tendão calcâneo há um predomínio de matriz extracelular (MEC) em relação à quantidade e tipos de células. A MEC do tecido conjuntivo consiste de um conjunto de macromoléculas localizadas fora da célula que se integram e interagem de forma altamente organizada para que o tecido exerça suas propriedades fisiológicas e biomecânicas (KJAER, 2004).

A MEC dos tendões é composta de colágeno e elastina, proteoglicanos e glicoproteínas não-colagênicas, possuem de 55 a 70% de água e o peso seco do tendão é de 60 a 85% de colágeno. Colágeno desempenha importante papel para o tendão calcâneo e neste há predomínio do colágeno do tipo I organizado em fibrilas, fibras, feixes de fibras e fascículos (Figura 4) que são organizados em um arranjo helicoidal ao longo do maior eixo do tendão (O'BRIEN, 1997; KJAER, 2004). Outros tipos diferentes de colágeno também são encontrados em tendões, os tipos II, III, IV, XI, XIV (O'BRIEN, 1997). A heterogeneidade do colágeno é relacionada à composição dos aminoácidos e conseqüentemente os tipos de cadeias em tríplice hélice formadas, determinando assim, uma série de estruturas diferentes (JAMES *et al.*, 2008).

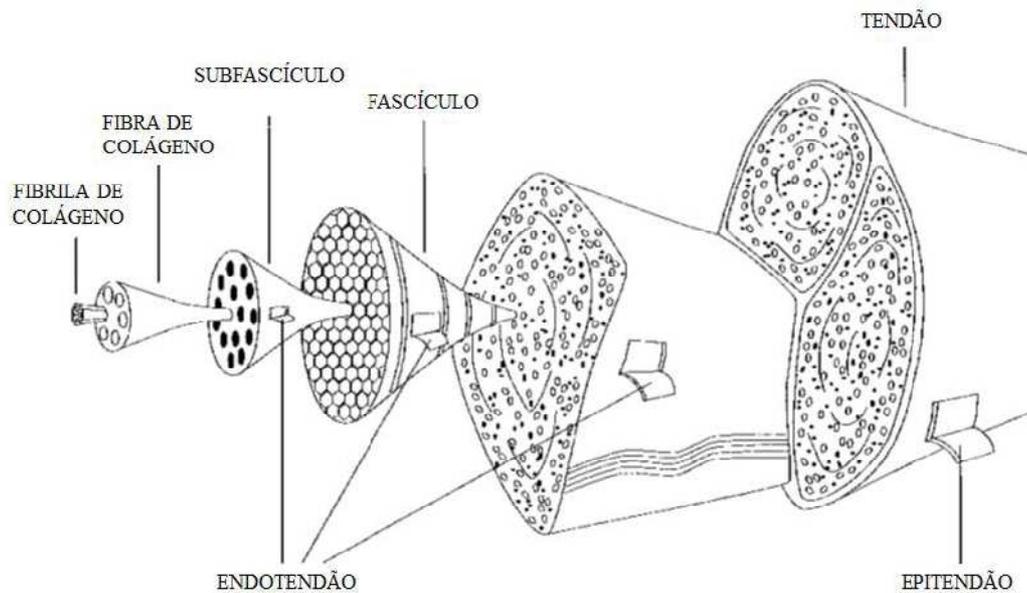


Figura 4: Organização hierárquica do tendão (adaptado de (Kannus, 2000)).

No tendão as fibrilas exibem um padrão ondulado, denominado *crimp* (GATHERCOLE & KELLER, 1991; VIDAL, 1995, 2003), que permite o tendão, como um todo, se adaptar a diferentes situações de estresse e deformação, (FRANCHI *et al.*, 2007), assim o aspecto ondulado permanece enquanto o tendão está relaxado, mas desaparece quando o tendão é submetido a uma carga tensional (COMPER, 1996). Portanto, há variações na organização do *crimp* nas diferentes regiões do mesmo tendão (VIDAL, 1995), que podem ser vistas na microscopia de luz polarizada (VIDAL, 2003) e estas regiões de *crimp* favorecem adaptação dos feixes de colágeno do tendão quando submetidos a forças de tensão que promovem estresse e deformação nas fibras (GATHERCOLE & KELLER, 1991).

O desenvolvimento e remodelamento adequado desta hierarquia das fibras de colágeno são fundamentais para a integridade estrutural e funcional dos tendões (RILEY *et al.*, 2002). A funcionalidade e as propriedades biomecânicas dos tendões são determinadas tanto pela associação entre o colágeno e os outros elementos da matriz extracelular, como também, pelo diâmetro e orientação de suas fibras e feixes (VIDAL & CARVALHO, 1990). As forças de compressão e atrito adicionadas à de tensão normal exercida pelos músculos, levam a variações regionais na morfologia e composição dos tendões (CARVALHO & VIDAL, 1994). Desta forma, a MEC se adapta a diferentes forças biomecânicas, apresentando diferenças regionais em termos de composição e organização ao longo do tendão. Nas regiões onde a tensão é exercida em todas as direções, os feixes de colágeno estão dispostos sem

orientação regular, enquanto que em regiões onde a tensão é exercida apenas em uma direção, as fibras demonstram uma disposição ordenada e unidirecional (O'BRIEN, 1997).

Além das moléculas de colágeno também está presente na MEC uma pequena quantidade de fibras elásticas que se organizam de forma ordenada e paralela às fibras de colágeno, permitindo aos tendões suportar cargas unidirecionais a que são submetidos durante a contração muscular no exercício ou em outras atividades diárias (AQUINO *et al.*, 2005). Os componentes não fibrilares da MEC são os proteoglicanos (PGs) e glicoproteínas não colagênicas. Os PGs consistem de um esqueleto central de proteína e pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAG) ligada covalentemente (ESQUISATTO *et al.*, 2003). Os PGs estão presentes especialmente em regiões de compressão (VOGEL & HEINEGÅRD, 1985), pois são estruturas altamente hidratadas por uma espessa camada de água de solvatação que envolve a molécula, tornando o tecido viscoso (FEITOSA *et al.*, 2002). As fibras elásticas posicionam-se paralelamente as fibras de colágeno nas regiões de tensão, enquanto que na região de compressão, as fibras elásticas e colágenas estão distribuídas em várias direções, imersas em grande quantidade de proteoglicanos (VIDAL & CARVALHO, 1990; FEITOSA *et al.*, 2002). Entre as proteínas não-colagênicas a fibronectina e laminina servem de mediadores da adesão celular com outros componentes da matriz (JOHANSSON, 1996). A fibronectina é a glicoproteína de adesão mais abundante no tecido conjuntivo, é sintetizada por fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, células gliais e miócitos, e pode se ligar às integrinas, aos proteoglicanos, ao colágeno e a fibrina (PIEZ & REDDI, 1984).

A manutenção da integridade e organização da matriz envolve, portanto a síntese e degradação dos componentes da MEC. A síntese e o remodelamento da maior parte dos constituintes da MEC envolvem também uma classe de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) (SUMMERS & KOOB, 2002; MAGNUSSON *et al.*, 2003). Estas enzimas estão presentes na forma latente, as quais são ativadas no espaço extracelular por enzimas (plasmina, triptase, quimase e outras metaloproteinases) e outros mecanismos (auto clivagem e auto-ativação) (MOTT & WERB, 2004; PAGE-McCAW *et al.*, 2007).

1.3 Metaloproteinases de Matriz Extracelular

As MMPs são membros de uma família de mais de 30 enzimas (KUPAI *et al.*, 2010) que requerem zinco para a atividade de seu sítio catalítico (APTE & PARKS, 2015). As células do tendão secretam MMPs na forma de proenzimas inativas que quando ativadas, são

capazes de degradar diversos componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno, elastina e proteoglicanos (STERNLICHT & WERB, 2001; VISSE & NAGASE, 2003; PAGE-McCAW *et al.*, 2007). A família das MMPs é subdividida em quatro classes: collagenases, gelatinases, estromelinas e MMPs tipo membrana (CHAKRABORTI *et al.*, 2003; PARKS *et al.*, 2004). Portanto, estas enzimas são importantes na degradação e remodelação da matriz extracelular de tendões (PAGE-McCAW *et al.*, 2007).

Um desequilíbrio entre a atividade de MMPs e TIMPs (inibidor tecidual de metaloproteinases) provoca degradação no colágeno e faz com que a integridade da matriz extracelular de tendões seja afetada (KAROUSOU *et al.*, 2008). TIMPs são proteínas reguladoras da atividade de MMPs, que se ligam ao sítio ativo ou em sítios alternativos destas enzimas (MALEMUD, 2006). Durante o processo de reparo do tendão, há um aumento da atividade de MMPs que está relacionado com a degradação de colágeno desnaturado. As MMPs do tipo gelatinases envolvidas nesse processo são a MMP-9 que participa da degradação de colágeno, e a MMP-2 participa da degradação e remodelação do colágeno (RILEY *et al.*, 2002; MOTT & WERB, 2004). Devido às funções diversas, as MMPs têm sido consideradas fatores regulatórios importantes na homeostasia da matriz extracelular (TAKALA & VIRTANEN, 2000; STERNLICHT & WERB, 2001; PARKS *et al.*, 2004; PAGE-McCAW *et al.*, 2007).

No entanto a resposta das MMPs do tendão ao exercício tem sido mostrada em situações de exercício agudo (corrida em esteira) em que, após o término do exercício houve elevação dos valores intersticiais de Pro-MMP-9, e 3 dias após o exercício, o aumento de pró-MMP-2 no tecido do tendão calcâneo em humanos (KOSKINEN *et al.*, 2004), assim como aumentos na MMP-2 e MMP-9 também foram encontradas após exercício com salto vertical no tendão calcâneo de ratos (MARQUETI *et al.*, 2006), mostrando que as MMPs (e seus inibidores) desempenham papel importante na adaptação da MEC no exercício (KOSKINEN *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A sobrecarga crônica na forma de treinamento físico conduz os tendões e músculos a aumento do *turnover* de colágeno. Pesquisas relatam que a síntese dos colágenos

tipo I e tipo III aumenta após estímulos mecânicos por meio de exercício físico intenso no músculo (LANGBERG *et al.*, 1999; MELLO MALLHEIRO *et al.*, 2009). Trabalhos também relatam que o exercício agudo induz a síntese do colágeno no tendão e no músculo, indicando resposta adaptável no tecido conjuntivo (HORNBERGER & FARRAR, 2004; HEINEMEIER *et al.*, 2007). Porém não se sabe se o treinamento físico que leva a um aumento de colágeno resulta em aumento na organização dos feixes de colágeno, de mesmo modo também não se sabe se ocorre aumento de proteoglicanos e proteínas não colagênicas.

O *turnover* do colágeno no sistema músculo esquelético é rápido (SMITH & RENNIE, 2007) e já foi documentado que na MEC é influenciado pela atividade física. 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 (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Estudos relatam que o exercício indica aumento na degradação do colágeno tipo I (LANGBERG *et al.*, 1999).

Desta forma, o tendão calcâneo, que pela sua localização está sujeito à forças de tensão e de compressão e que é capaz de modificar suas estruturas e componentes quando submetido à estímulos, merece atenção especial no que se refere à importante atividade das metaloproteinases da MEC. A realização da pesquisa justifica-se devido a escassez de estudos que demonstram as respostas adaptativas das regiões do tendão calcâneo a diferentes tipos de treinamento físico resistido a longo prazo.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a resposta dos diferentes protocolos de treinamento resistido sobre a matriz extracelular e identificar presença de metaloproteinases-2 e -9 em tendão calcâneo.

3.2 Específicos:

a) Analisar a organização estrutural, através da microscopia de luz comum e de polarização, do tendão calcâneo em resposta ao treinamento resistido de força, hipertrofia e resistência;

- b) Quantificar proteínas, GAGs sulfatados e hidroxiprolina do tendão calcâneo em resposta ao treinamento resistido de força, hipertrofia e resistência;
- c) Identificar a presença e a atividade enzimática das metaloproteinases-2 e -9 do tendão calcâneo em resposta ao treinamento resistido de força, hipertrofia e resistência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos, adultos jovens (60 dias), pesando em média 250 gramas, provenientes do Biotério da Universidade do Extremo sul Catarinense (UNESC). Os animais foram divididos em 4 grupos (n=15 para cada grupo) e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em cama de maravalha, com livre acesso à água e ração e temperatura ambiente de 23°C, com ciclo de claro e escuro de 12h.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram manipulados de acordo com as normas e aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da UNESC (em anexo) sob protocolo 096-2014-01. Os animais foram divididos em Grupo NT – Não treinado, Grupo TR - Treinamento de Resistência Muscular, Grupo TH – Treinamento de Hipertrofia, Grupo TF – Treinamento de Força.

4.3 Protocolo de Exercício

Os animais (n= 60) foram distribuídos, aleatoriamente, nos 4 grupos descritos anteriormente, após um período de familiarização dos animais com a plataforma de escalada (1.1 X 0.18 m e 80° de inclinação) (Figura 5, A e B) (HORNBERGER & FARRAR, 2004; SCHEFFER *et al.*, 2012). A carga foi fixada à base da cauda dos ratos utilizando fita flexível Micropore 3M (Figura 5, C e D). Durante a primeira semana de treinamento os animais carregavam uma carga de 5% da sua massa individual corporal (período de adaptação). A

repetição foi considerada bem sucedida quando o animal subiu da parte inferior da plataforma para o topo. Após o período de adaptação, os animais iniciaram o período de treinos três dias na semana, com pausa de 48 horas, durante 12 semanas. O tempo de exercício foi de 30 minutos.

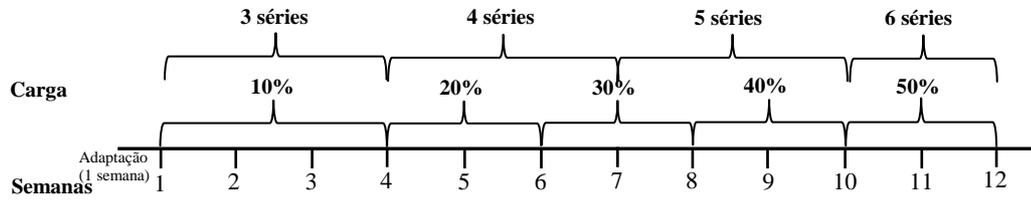


Figura 5: Aparato e pesos utilizado para o Treinamento resistido em Escala vertical, (A) vista frontal e (B) vista lateral, (C) pesos utilizados, (D) posicionamento do animal na escalada.

4.3.1 Treinamento de resistência muscular (TR)

TR consistia em subir a plataforma carregando uma carga de 10% do peso do corpo, que foi progressivamente aumentado para 20%, 30%, 40%, e 50%, 12-15 repetições, 2 minutos de intervalo, 3 dias por semana, durante 12 semanas (Figura 6) (SCHEFFER *et al.*, 2012).

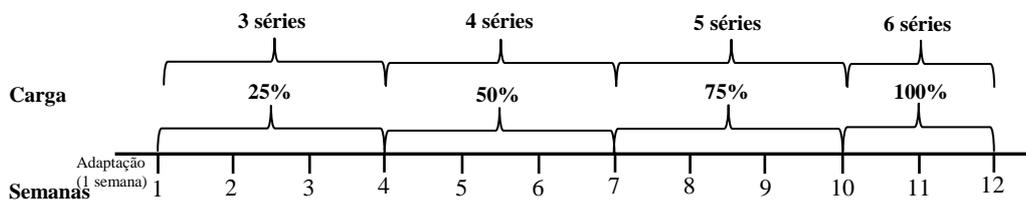
Figura 6. Treinamento de resistência muscular.



4.3.2 Treinamento de hipertrofia (TH)

TH consistia em subir a plataforma carregando uma carga inicial que foi de 25% do peso do corpo, aumentando progressivamente para 50%, 75% e 100%, 8-10 repetições, 2 minutos de intervalo, 3 dias por semana, durante 12 semanas (Figura 7) (SCHEFFER *et al.*, 2012).

Figura 7. Treinamento de hipertrofia.

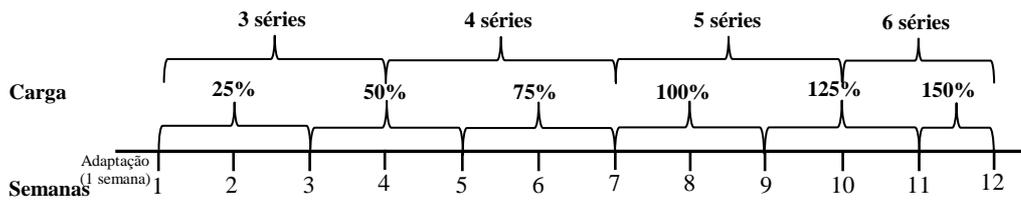


4.3.3 Treinamento de força (TF)

TF consistia em subir a plataforma carregando uma carga inicial de 25% do peso do corpo, que foi progressivamente aumentado para 50%, 100%, 125% e 150% de 4-5

repetições, 2 minutos de intervalo, 3 dias por semana, durante 12 semanas (Figura 8) adaptado de SCHEFFER *et al.*, 2012.

Figura 8. Treinamento de força.



4.4 Análises Bioquímicas:

4.4.1 Extração dos componentes da MEC do tendão

Os componentes da MEC foram obtidos após extração do tendão calcâneo (Figura 9) com cloreto de guanidina 4 M (contendo 0,05 M EDTA e 1mM de PMSF em tampão acetato de sódio 0,05 M - pH 5,8) durante 24h e a 4° C em constante agitação, de acordo com o método de Heinergård e Sommarin (1987). Após centrifugação por 1h, a 10.000 rpm e a 4° C (centrífuga Beckman J2-21 - Rotor JA-20) o sobrenadante foi estocado em temperatura de -8°C para as diferentes análises bioquímicas.

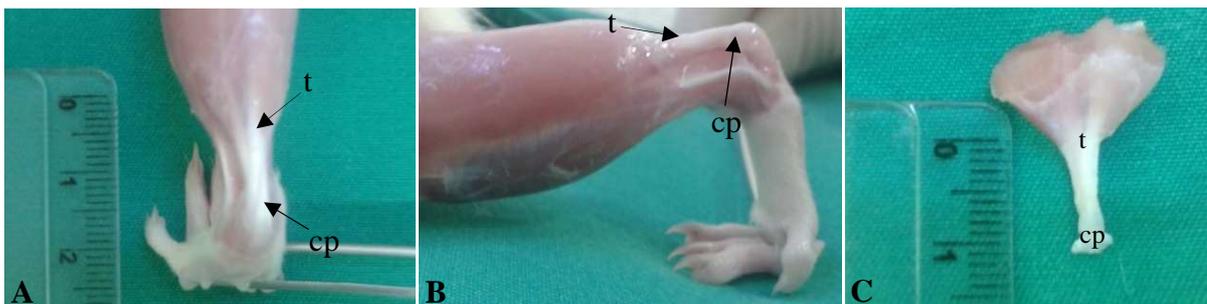


Figura 9: Tendão calcâneo de rato Wistar, (A) vista dorsal (B) vista lateral e (C) tendão dissecado. Observe as regiões de tensão (t) e compressão (cp) do tendão.

4.4.2 Quantificação de hidroxiprolina

Após lavagem em PBS (0,15 M de NaCl e 50 mM de EDTA em 5 mM de tampão fosfato), os tendões foram picados e imersos em acetona durante 48 horas e, em seguida, em clorofórmio: etanol (2:1) durante 48 h. Os fragmentos foram pesados e hidrolisado em HCl 6 N (1 mL para cada 10 mg de tecido) durante 16 horas a 110°C. O hidrolisado foi neutralizado com NaOH 6 N, e 20 µL de cada amostra foi tratada com uma solução de cloramina T, como descrito por Stegemann e Stalder (1967) com algumas adaptações. A absorbância foi medida em 550 nm em espectrofotômetro. Soluções de hidroxiprolina em concentrações de 0,2 a 6µg/mL foram usadas para a curva padrão.

4.4.3 Dosagens de proteínas não colagênicas

O extrato total do tendão foi utilizado para quantificar proteínas pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit BioRad (BioRad protein assay) e albumina sérica bovina (BSA) como padrão, nas concentrações 1, 2, 4, 8 16 µg/ µL . A leitura das amostras foi feita a 595 nm, em espectrofotômetro Ultrospec, modelo 2100 Pro da Amersham Biosciences.

4.4.4 Zimografia para detecção das gelatinases MMP-2 e MMP-9.

Os tendões foram fragmentados e imersos em solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.1% Triton e 1% de coquetel de inibidor de protease (Sigma) para extração de proteínas (100 µL de tampão de extração para 30 µg de tecido), a 4°C durante 2h (MARQUETI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008). Depois dessa primeira extração, as amostras foram incubadas adicionando-se 1/3 do volume da mesma solução descrita anteriormente, a 60°C durante 5 minutos. Após quantificação de proteínas totais de acordo com o método de Bradford (1976), usando BSA (Sigma) como padrão, foi aplicado 20µg de proteínas por amostra no gel. O gel de acrilamida (10%) contendo gelatina (1%) foi realizada a 4°C e, em seguida, o gel foi lavado com 2.5% Triton X-100 e encubado durante 21h, em solução de 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 0.1 M NaCl e 0.03% de azida sódica a 37°C. O gel foi corado com coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) por 1h. Em seguida, o gel foi lavado com solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético para observação das bandas correspondentes a atividade gelatinolítica. Adicionalmente como controle positivo, foi

usado 20 mM de EDTA no tampão de incubação o qual inibiu a atividade das gelatinases, confirmando a identificação das MMPs-2 e -9 no gel (MARQUETI *et al.*, 2006).

4.4.5 Quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados

Os tendões foram fragmentados e desidratados em acetona por 24 h. Após a desidratação, os fragmentos foram secos por 1h em estufa a 37°C, pesados e seguiram para a digestão com papaína (40 mg de papaína para cada 1g de tecido) em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5, contendo EDTA 40 mM e β -mercaptoetanol 80 mM, por 24h à 50°C. Após a digestão, os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) presentes nas amostras foram dosados através do método com azul de dimetilmetileno (FARNDALE *et al.*, 1986) com leitura a 526 nm no espectrofotômetro Ultrospec, modelo 2100 Pro da Amersham Biosciences.

4.5 Análises Morfológicas

4.5.1 Análise da Birrefringência

Os tendões foram fixados em formaldeído 4% em tampão Millonig (fosfato de sódio 0,13 M, NaOH 0,1 M, pH 7,4) durante 24 h a 4° C. Em seguida, os tendões foram lavados em água, desidratados em etanol, diafanizados com xilol e embebidos em parafina. Cortes longitudinais de 7 μ m foram analisados para detectar possíveis diferenças na birrefringência, que refletem as variações na organização dos feixes de colágeno. A birrefringência foi analisada utilizando microscópio de polarização Olympus BX53 e um analisador de imagem (Life Science Imaging Software, Version 510 UMA cellSens16Han em 00). O brilho da birrefringência foi expresso em valores médios de cinza (pixels). As medidas foram realizadas após a imersão das lâminas em água sem coloração (VIDAL, 1986; VIDAL & MELLO, 2010).

4.5.2 Análise em microscopia de luz comum

Os tendões foram imersos em solução fixadora que consiste em 4% de formaldeído e tampão Millonig (0,13 M fosfato de sódio, 0,1 M de NaOH a pH 7,4), durante 24 horas, em temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas, desidratadas em etanol,

diafanizadas com xilol e incluídas em parafina. Após obtenção de cortes seriados de 7 μ m de espessura e subsequente desparafinização, os tendões seguiram para análise microscópica.

Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina de acordo com Kiernan (1981). Para detecção de proteoglicanos os cortes foram corados com azul de toluidina (0,025%) em tampão McIlvaine (0,03 M Ácido cítrico, 0,04M fosfato de sódio dibásico, pH 4,0) (MELLO & VIDAL, 2003). Para análise foi usado microscópio Olympus BX 53.

4.6 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados em média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartílica. Utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn. Todas as análises foram realizadas no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0 e utilizou-se um nível de significância $p < 0,05$. Os gráficos foram elaborados no software Excel versão 2010.

5. RESULTADOS

Nas análises bioquímicas e morfológicas, foram utilizados tendões calcaneares inteiros. Para avaliar as diferenças nas concentrações de colágeno na MEC do tendão dos diferentes grupos, foi realizada a dosagem indireta através da hidroxiprolina ($n = 5$). As maiores concentrações de hidroxiprolina foram encontradas nos grupos TR e TH. Diferenças significativas foram encontradas quando comparados os grupos TR e NT ($p = 0.001$) e os grupos TR e TF ($p = 0.016$) (Figura 10).

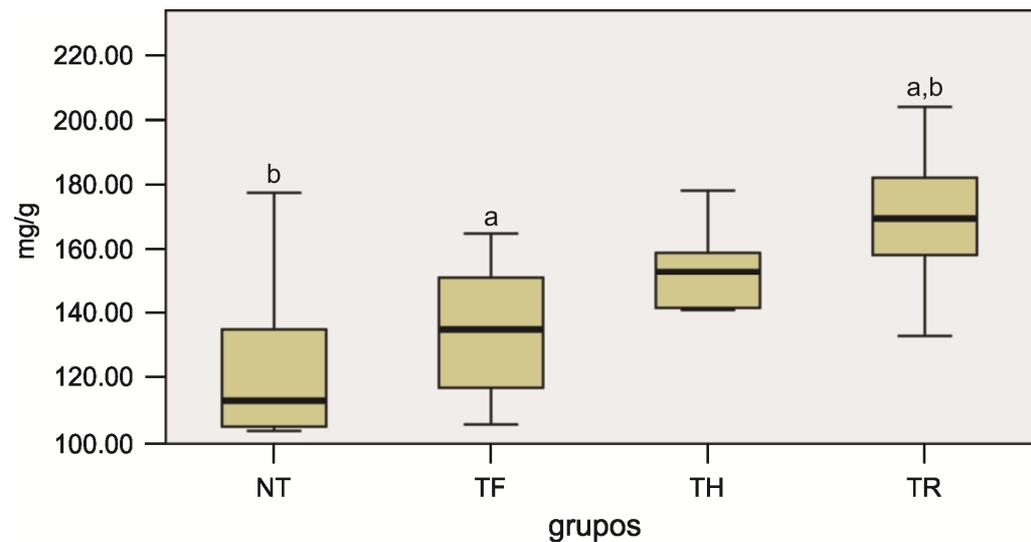


Figura 10. Concentração de hidroxiprolina (mg/g de tecido) dos tendões dos grupos experimentais. Diferenças significativas foram encontradas ($p < 0,05$) comparando o grupo TR com os grupos NT e TF. Diferenças significativas entre os grupos estão marcadas com a mesma letra.

Com relação à dosagem de proteínas não-colagênicas ($n = 5$) (Figura 11) maior concentração foi observada no grupo TR (14.98) quando comparado aos demais grupos. Nenhuma diferença foi encontrada entre NT, TF e TH.

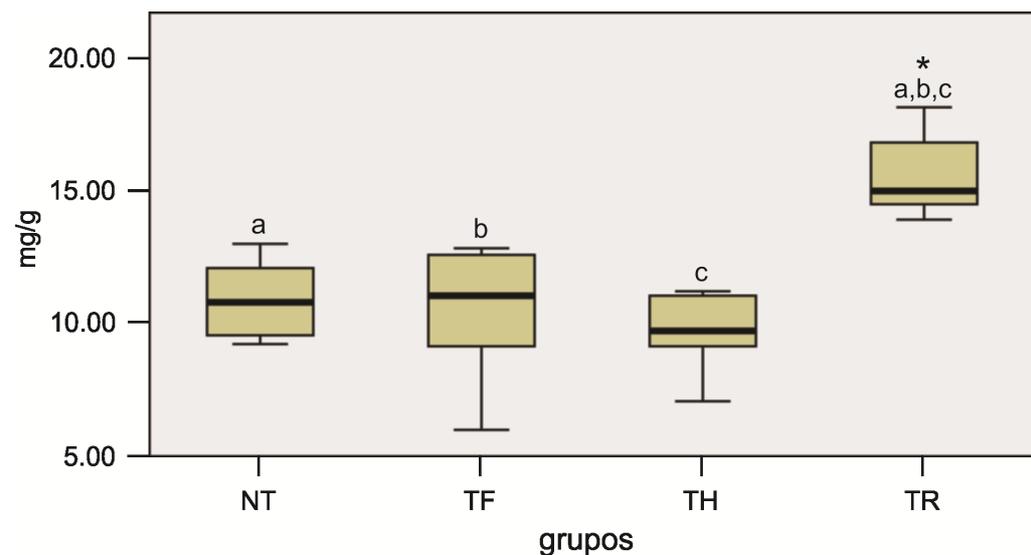


Figura 11. Concentração de proteínas não colagênicas (mg/g de tecido) dos tendões dos grupos experimentais. Observe maior concentração no grupo TR. Note diferenças significativas ($p < 0,05$) encontradas quando comparado o grupo TR (*) com os demais. Letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos.

Análise da quantificação de glicosaminoglicanos (n= 4) (Figura 12) não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

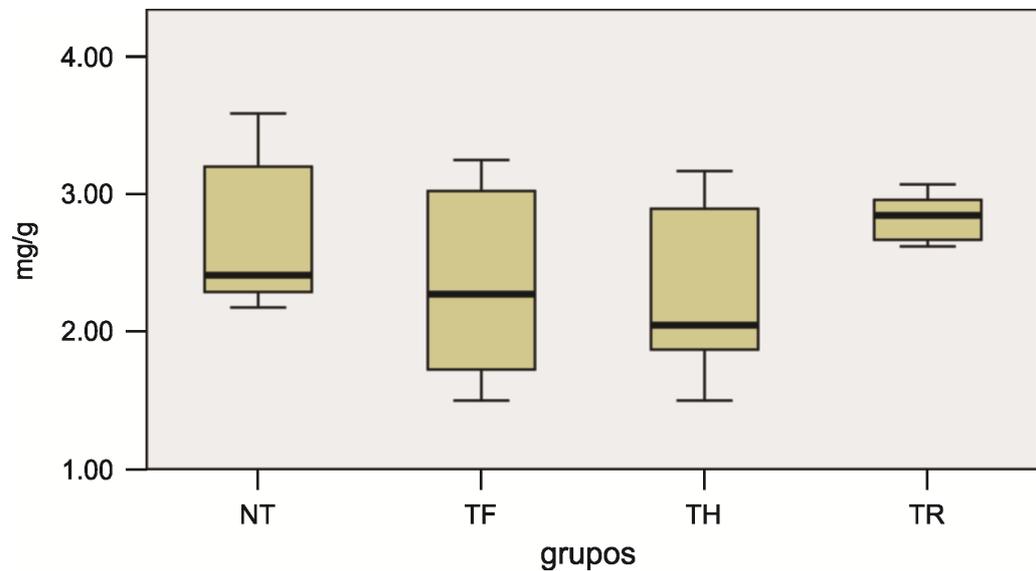


Figura 12. Concentração de GAGs (mg/g de tecido seco) nos tendões dos grupos experimentais. Nota-se menor concentração aparente no grupo TH, mas não houve diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Análise foi pelo teste de Dunn.

Os dados relacionados à organização e agregação das fibras de colágeno foram obtidos a partir de imagens de microscopia de polarização (n= 5) (Figura 13) e de medidas de birrefringência (Tabela 1). Os resultados mostraram que ao posicionar o maior eixo do tendão à 45° em relação aos polarizadores cruzados, maior birrefringência foi observada em tendões do grupo TH em relação ao grupo NT. Ao passo que menor birrefringência foi detectada no grupo TF, quando comparado também ao grupo NT.

A intensa birrefringência nos tendões evidencia a elevada agregação e organização dos feixes de colágeno predominantemente orientados em uma única direção. Quando posicionado paralelamente a um dos polarizadores, os feixes de colágeno no grupo TF mostraram baixa birrefringência com áreas muito escuras, indicando praticamente ausência de *crimp* nos feixes de colágeno especialmente neste grupo. Fibras de colágeno arranjadas em outras direções e algumas com ondulações foram detectadas principalmente em TH e TR, indicando a presença de *crimp*. As medidas de birrefringência (Tabela 1) comprovaram as diferenças observadas na análise das imagens dos tendões dos diferentes

grupos, mostrando maior valor de birrefringência em TH e menor valor em TF, ambos comparados com NT.

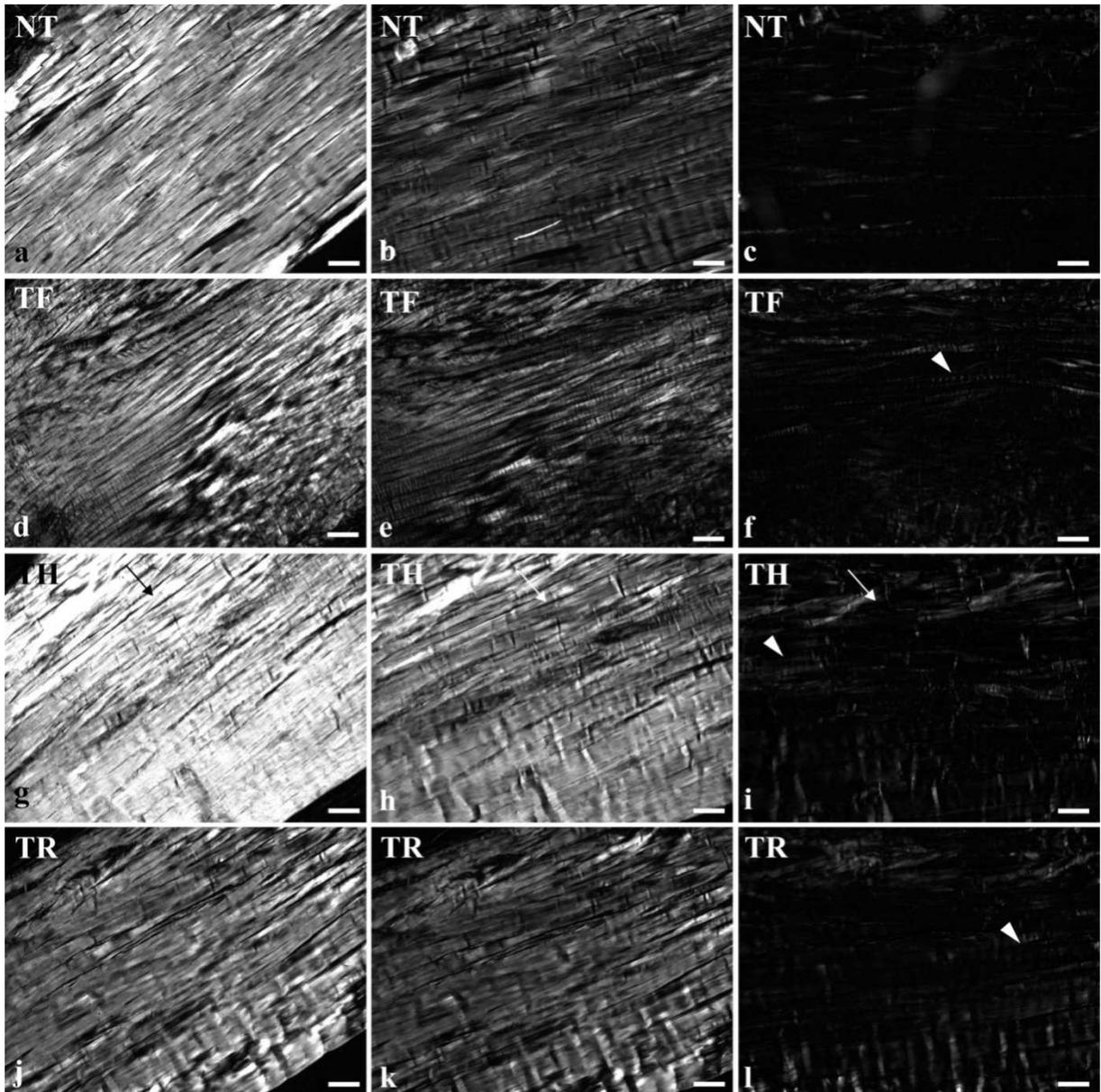


Figura 13. Imagens de birrefringência de tendões analisados sob a microscopia de polarização, com polarizadores cruzados. São mostrados os grupos NT (a,b,c), TF (d,e,f), TH (g,h,i) e TR (f,k,l). O maior eixo do tendão está à 45° em relação aos polarizadores na coluna da esquerda, menos inclinado na coluna do meio, e paralelo a um dos polarizadores na coluna da direita. Observe nos tendões posicionados à 45°, um maior brilho detectado no grupo TH, acompanhando o mesmo resultado nos tendões menos inclinados em relação a um dos polarizadores. Nos tendões posicionados paralelos a um dos polarizadores (c,f,i,l), é notório a presença de *crimp* (cabeça de seta), especialmente nos grupos TH e TR. Observe a mudança (seta) de brilho dos feixes de colágeno à medida que se inclina em relação aos polarizadores, indicando que esses feixes mudam de direção ao longo do tendão. Barras= 50µm.

Tabela 1. Medidas de birrefringência, em níveis de cinza (GA: pixels), dos feixes de colágeno dos tendões dos diferentes grupos. Observe maior valor de GA nos grupos TH e TR, assim como menor valor no grupo TF, em relação ao grupo NT. As medidas foram feitas com o maior eixo do tendão posicionado a 45° em relação aos polarizadores cruzados. As medidas (80) foram feitas na região proximal dos tendões de cada grupo. (*) Diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

Grupos	(GA Média - IQ)	Comparações Kruskal-Wallis-Dunn (p)
NT	111.0 (95.3-134.3)	TF x NT ($p < 0.001$)*
TF	80.7 (70.3-103.0)	
TH	124.5 (98.2-152.8)	TF x TH ($p < 0.001$)*
TR	114.3 (94.6-137.8)	TF x TR ($p < 0.001$)*

IQ - Intervalo Interquartil

Os resultados referentes à zimografia ($n = 4$) mostraram bandas correspondentes às isoformas latente (92 kDa) e ativa (83 kDa) da MMP-9 em todos os grupos (Figura 14).

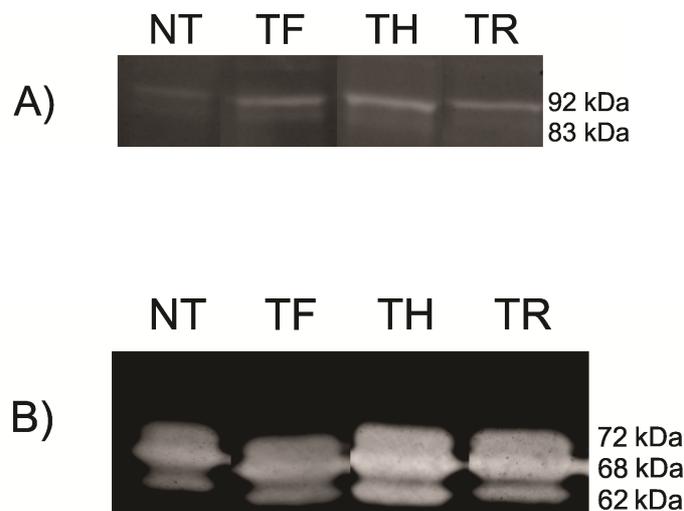


Figura 14. Zimografias para MMP-9 (A) e MMP-2 (B). A) As isoformas latente (92 kDa) e ativa (83 kDa) da MMP-9 aparecem em todos os grupos. Bandas mais marcantes foram observadas nos grupos de treinamento. B) As isoformas latente (72 kDa), intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) da MMP-2 aparecem mais proeminentes nos grupos de treinamento.

Na densitometria de bandas (pixels) (Tabela 2), o grupo TF apresentou maior valor para a isoforma latente da MMP-9 quando comparado com os grupos TH, TR e NT. A banda correspondente à isoforma ativa da MMP-9 foi mais proeminente no grupo TH em relação ao NT, e menos intensa no grupo TR em relação ao grupo NT.

Na análise na zimografia de MMP-2 foram detectadas as isoformas latente (72 kDa), intermediária (68 kDa) e ativa (62 kDa) em todos os grupos. A densitometria de bandas (Tabela 2) exibiu diferenças significativas com relação à isoforma latente entre os grupos TH e NT. Os resultados para a isoforma intermediária foram significativos quando comparados os grupos de treinamento TF, TH e TR ao grupo não-treinado. Na análise da isoforma ativa foram encontrados resultados significativos quando comparados os grupos de treinamento TF, TH e TR com o grupo não-treinado, e entre os grupos TF e TR com o grupo TH.

Tabela 2: Densitometria das bandas (pixels) correspondentes a MMP-9 e MMP-2 nos grupos experimentais. Diferenças significativas entre os grupos marcados com a mesma letra ($p < 0.05$).

Parâmetros	NT	TF	TH	TR
MMP-9 latente (92 kDa)	6911±668 ^a	12883±503 ^{a,b,c}	5860±252 ^b	5957±528 ^c
MMP-9 ativa (83 kDa)	7220±248 ^d	7120±117 ^e	10595±435 ^{d,e,f}	5930±209 ^{d,f}
MMP-2 latente (72 kDa)	95346±5590 ^g	94427±89568	184867±6765 ^g	173018±9696
MMP-2 intermediária (68 kDa)	153708±6019 ^h	188514±9131 ^{h,i}	217595±16755 ^{h,i}	216121±13368 ^{h,i}
MMP-2 ativa (62 kDa)	81968±7341 ^j	98011±7996 ^{j,l}	142977±2906 ^l	97280±2760 ^j

Nos cortes corados com hematoxilina-eosina (HE) ($n = 5$) e observados sob a microscopia de luz (Fig. 15), observou-se coloração mais intensa nos grupos TF e TH em relação aos grupos TR e NT. Nos cortes corados com azul de toluidina (AT) ($n = 5$), a região distal do tendão, submetida às forças de compressão, exibiu metacromasia em todos os grupos, sendo mais intensa nos grupos TH e TR. A região distal apresenta organização típica de fibrocartilagem, com células similares a condrócitos e MEC mais fortemente corada do que na região de tensão. O notável acúmulo de material metacromático na matriz dos grupos TH e TR é devido à presença de maior quantidade de proteoglicanos. Na região de inserção do tendão pode-se observar maior metacromasia na matriz nos grupos TF, TH e TR (Figura 15).

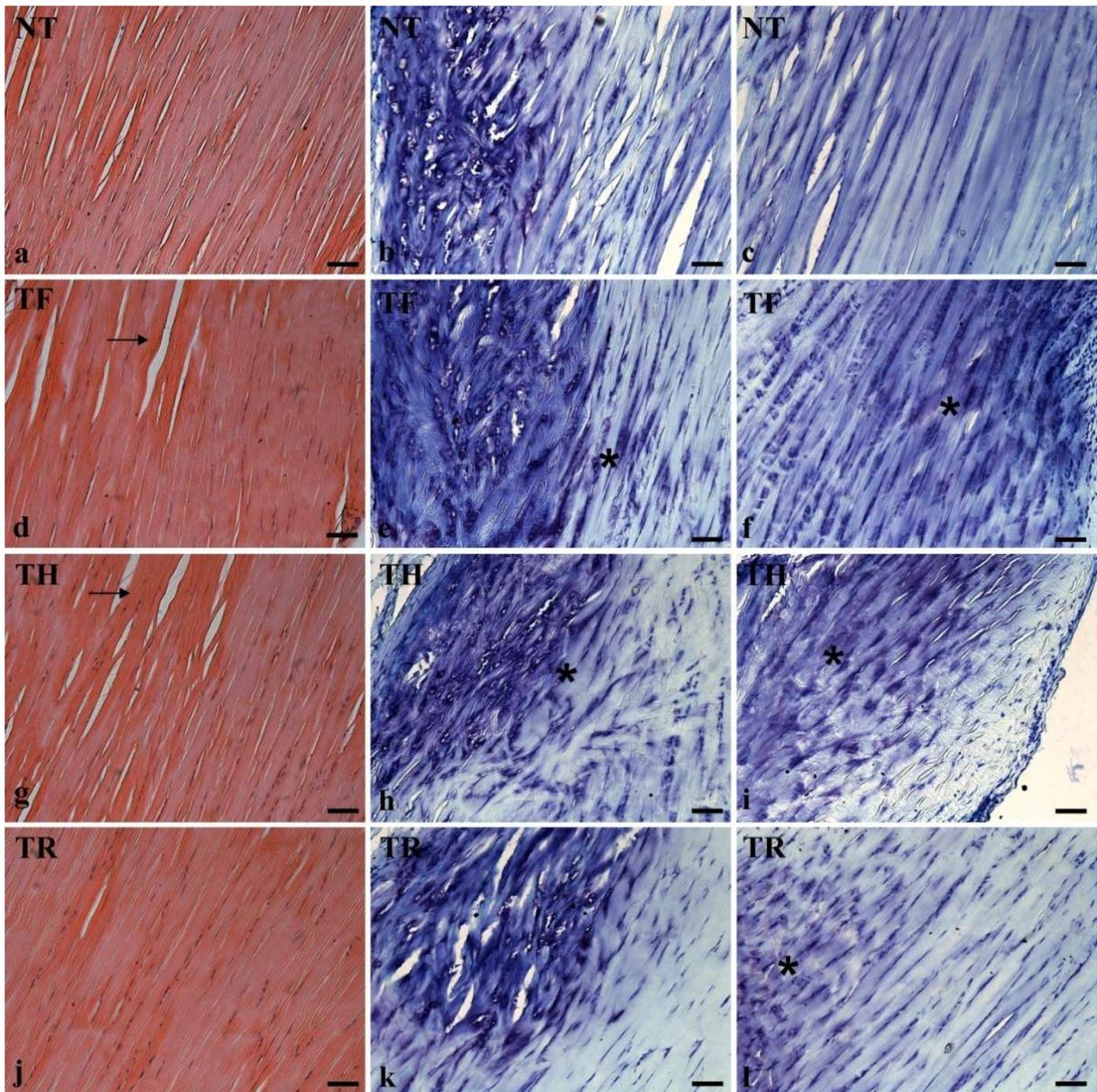


Figura 15. Cortes longitudinais de tendões corados com HE e AT. NT, TF, TH, TR corresponde aos grupos. A coluna da esquerda corresponde a coloração de HE da região de compressão, a coluna do meio corresponde a coloração de AT da região de compressão e a coluna da direita corresponde a coloração de AT da região de inserção. Nos cortes corados com HE pode-se perceber coloração mais forte (seta) na matriz nos grupos de treinamento TF e TH. Nos cortes corados com AT, observe maior metacromasia (*) nas regiões de compressão dos grupos TH e TF. Na região de inserção do tendão pode-se observar presença de material metacromático (*) nos grupos de treinamento. Barras= 50µm.

6. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi estudar a resposta da MEC do tendão calcanear aos diferentes protocolos de exercício resistido de hipertrofia, força e resistência.

Com relação à quantificação de hidroxiprolina, os níveis foram maiores nos grupos treinados. A mais alta concentração de hidroxiprolina foi observada no grupo TR e este resultado pode estar relacionado a um aumento na quantidade das fibras de colágeno. Estudos tem mostrado que o exercício acelera a síntese e degradação de tecido conjuntivo em músculos e tendões, levando à adaptação fisiológica e reparo de danos de estruturas da MEC (LANGBERG *et al.*, 1999; KOSKINEN *et al.*, 2000).

Estas adaptações induzem o aumento na expressão de MMPs, podendo levar a um colapso das fibras de colágeno. Possivelmente, pelo fato do treinamento resistido exercer um estímulo mecânico constante com cargas sobre o tendão, promovendo aumento significativo da atividade de MMP-2 nos grupos de treinamento, conforme observado em outros estudos (WOESSNER, 1991; NAGASE & WOESSNER JR, 1999).

A combinação destes resultados confrontam o que encontramos nas medidas e imagem de birrefringência, onde o grupo TH exibiu o maior brilho, indicando maior organização e compactação das fibras de colágeno, dentro de um processo de remodelação. Possivelmente este fato ocorreu indicando uma ativação do estímulo da degradação do colágeno seguida de um processo de inibição dessa atividade, para adaptação do tecido à carga mecânica atuante. Adaptações composicionais distintas do tendão podem ocorrer dependendo do tipo de estímulo mecânico aplicado (ARO *et al.*, 2008).

Com relação à dosagem de proteínas não colagênicas (PCNs), foram observadas diferenças significativas entre os grupos, sendo que o grupo TR apresentou maior concentração em relação aos demais grupos, e o grupo TH o menor. Este resultado pode ter ocorrido devido à presença das MMPs. O processo de remodelamento da MEC inicia com a degradação do colágeno principalmente por gelatinases (KJAER, 2004), e esta remodelação é importante para o desenvolvimento, morfogênese e reparação do tecido (NAGASSE *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, a concentração total de MMP-2, principalmente na sua forma ativa, foi maior nos grupos TH, TF e TR, em relação ao NT possivelmente como parte do processo de remodelação das fibras de colágeno em resposta adaptativa dos tendões para os treinamentos. A maior concentração da MMP-2 ativa foi encontrada no grupo TH, possivelmente indicando a degradação e conseqüente remodelação da matriz (RILEY *et al.*, 2002; KOSKINEN *et al.*, 2004; MOTT & WERB, 2004). O mesmo foi encontrado em estudos com tendões calcâneos de ratos exercitados (salto em água) (MARQUETI *et al.*, 2006) e em tendões calcâneos humanos após estimulação de exercício agudo de corrida (KOSKINEN *et al.*, 2004). Nosso estudo difere dos demais citados principalmente pelo tempo

e cargas utilizados durante os treinamentos, como no estudo com corrida em esteira e salto vertical, que utilizaram baixa intensidade, no entanto os exercícios promoveram nível elevado de MMP-2 principalmente na região distal do tendão (MELLO MALHEIRO *et al.*, 2009).

Em nosso estudo este aumento na presença das MMP-2 nas suas diferentes formas sugere que a carga mecânica aplicada durante os treinamentos e o número de repetições induziram a uma maior resposta adaptativa do tendão calcâneo. Aumento significativo também foi encontrado na atividade gelatinolítica de MMP-2 em tendão calcâneo de rato após cinco semanas de impulsão vertical (MARQUETI *et al.*, 2006).

O exercício físico também tem mostrado aumento da síntese de colágeno, em tecido conjuntivo peritendinoso de tendões calcâneos em humanos (KJAER, 2004; KOSKINEN *et al.*, 2004). Em ratos a adaptação de diferentes regiões do tendão, parece ser reguladas pela atividade das MMPs em resposta à carga mecânica (KOSKINEN *et al.*, 2004; MARQUETI *et al.*, 2008).

Portanto os diferentes protocolos de treinamento resistido, envolvendo principalmente tempo, carga e intensidade, em comparação com outros já descritos, poderiam explicar os diferentes resultados obtidos, sobre a MMP-2 e principalmente aqueles sobre a atividade de MMP-9. Observamos na densitometria das bandas referentes a MMP-9 que a forma latente foi mais expressiva no grupo TF e na forma ativa no grupo TH.

Não podemos afirmar que estas estão envolvidas no processo de remodelação do tendão calcâneo após o treinamento resistido. No entanto, estudo com tendão calcâneo humano sugere que a MMP-9, além de participar da remodelação do tecido, pode desempenhar papel importante em reações inflamatórias no tecido conjuntivo peritendinoso de tendão calcâneo, induzido neste caso, pelo exercício intenso ou por uma reação inflamatória tecidual causada por lesão mecânica devido implantação da sonda de microdiálise (KOSKINEN *et al.*, 2004).

A análise dos cortes corados com azul de toluidina em microscopia de luz mostrou presença de fibrocartilagem na região de compressão em todos os grupos e elevada metacromasia nos grupos TH e TR. Estas características provavelmente são atribuídas à carga aplicada no tendão durante o exercício em TH e o número de repetições e carga aplicadas em TR que podem ter favorecido um aumento da síntese de proteoglicanos nos tendões destes grupos. Estudos mostraram que os tendões podem responder melhor ao número de contrações musculares do que a carga exercida nestes, respondendo com aumento à resistência mecânica durante o treinamento de resistência (SIMONSEN *et al.*, 1995; MONTEIRO *et al.*, 2011). Uma estrutura fibrocartilaginosa aparece em regiões de um tendão que está sob compressão

(VOGEL & KOOB, 1989; BENJAMIN & RALPHS, 1995, 1998) e esta estrutura se mantém e pode diferenciar-se dependendo do estímulo mecânico que recebe (RUFAl *et al.*, 1996; ARO *et al.*, 2008).

A metacromasia e as células com material metacromático observadas na matriz das regiões de inserção dos grupos submetidos ao treinamento sugerem a presença de proteoglicanos, devido aos estímulos mecânicos gerados pelo exercício e carga aplicada durante o treino resultante de forças de compressão e tensão no tendão calcâneo. Os PGs, em especial os pequenos PGs, participam da fibrilogênese do colágeno, apresentando importante papel durante o remodelamento tecidual (LIANG *et al.*, 2008). Vale ressaltar que apesar do provável remodelamento do tendão indicado pela presença de PGs e ocasionado pelo treinamento resistido, não houve diferenças significativas na dosagem dos GAGs, apenas menor concentração no grupo TH, provavelmente porque foi utilizado o tendão inteiro para as dosagens e não apenas a região de inserção que tem uma extensão reduzida e impossibilita fazer uma dosagem bioquímica.

As moléculas de GAGs são responsáveis pela metacromasia observada nos cortes corados com AT e são sintetizadas principalmente durante as fases iniciais do processo de remodelação (MELLO *et al.*, 1975; MELLO & VIDAL, 2003; LIANG *et al.*, 2008). Salientamos que na análise microscópica dos cortes corados com azul de toluidina avaliamos especificamente uma região do tendão onde possivelmente existe um maior acúmulo de proteoglicanos devido à presença de forças de compressão localizadas (VIDAL & MELLO, 1984; VOGEL & HEINEGÅRD, 1985). Sabe-se que proteoglicanos, principalmente os de baixo peso, estão distribuídos por todo o tendão associados às fibras de colágeno (ARO *et al.*, 2012), e envolvidos na regulação da fibrilogênese deste (SCOTT *et al.*, 1997), mas pouco se sabe sobre o efeito do treinamento resistido nos proteoglicanos. Estudos com frangos exercitados em esteira mostrou o aumento no conteúdo de proteoglicanos nos tendões após treino moderado (YOON *et al.*, 2003) e estudo com ratos diabéticos treinados em esteira inclinada constatou o efeito benéfico do exercício no músculo esquelético promovendo aumento na expressão gênica de alguns proteoglicanos (LEHTI *et al.*, 2006).

Os resultados da microscopia de luz corroboram com os encontrados na microscopia de polarização. O aspecto organizacional das fibras de colágeno pode ser melhor compreendido quando analisados sob microscopia polarizada (VIDAL, 1986; VIDAL & MELLO, 2010), devido às propriedades birrefringentes dos feixes de colágeno (VIDAL & MELLO, 2010; ARO *et al.*, 2012), o que permite detectar mudanças no arranjo das fibras de colágeno, neste estudo ocasionadas pelos diferentes tipos de treinamento resistido.

O intenso brilho de birrefringência encontrado especialmente no grupo TH, se deve ao maior alinhamento e maior compactação dos feixes de colágeno nesse grupo, quando comparado com os outros grupos. Nos grupos TF e TR foram encontradas fibras organizadas em várias direções, por isso a menor intensidade no brilho em relação ao TH indicando que os exercícios de força e resistência também resultam em rearranjo dos feixes de colágeno o que leva a um processo de remodelação das fibras (ARO *et al.*, 2012), nestes grupos ocasionados provavelmente, pela intensidade da biomecânica e tipo do treinamento, como observado em ratos submetidos a corrida em esteira e com incremento de carga (MONTEIRO *et al.*, 2011). Também ficou evidente ao longo das fibras muitas ondulações que indicam a presença de *crimps* especialmente no grupo TH.

Os *crimps* são padrões ondulados presentes nas fibras de colágeno dos tendões (VIDAL & MELLO, 1984; VIDAL, 2003; FRANCHI *et al.*, 2007) e em outros tecidos. É característico da estrutura fibrilar do colágeno tipo I presente principalmente em tecidos conjuntivos submetidos a cargas de tensão (ARO *et al.*, 2012). O padrão da fibra ondulada pode ser alterado para adaptar-se à situação mecânica a qual é submetido (GATHERCOLE & KELLER, 1991). A presença dos *crimps* observadas nos grupos TH, TR e TF está associada à tensão e deformação que o exercício proporciona (SIMONSEN *et al.*, 1995) fazendo com que o tendão responda adaptando-se às fases de tensão (GATHERCOLE & KELLER, 1991) e de absorção do choque durante o alongamento do tendão (FRANCHI *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstra a resposta da MEC do tendão calcâneo aos diferentes protocolos de treinamento resistido de hipertrofia, força e resistência. Estes protocolos promoveram diferentes respostas na MEC principalmente na concentração de colágeno total, na organização dos feixes de colágeno e na atividade de MMP-2 e MMP-9, portanto os protocolos promovem efeitos de remodelamento no tendão calcâneo, no entanto, o treinamento de resistência demonstrou os melhores resultados quanto à adaptação da MEC aos estímulos do treinamento sugerindo que este seja o mais indicado para a manutenção da integridade da estrutura tendinosa durante a prática de exercícios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSKOG, R.; WISNES, A.; WILHELMSSEN, K.; SKOGEN, A.; BJORDAL, JAN M. Comparison of two resistance training protocols, 6RM versus 12RM, to increase the 1RM in healthy young adults. A single-blind, randomized controlled trial. *Physiother. Res. Int.* 17: 179-186, 2012.

AGUIAR, A.F.; AGATI, L.B.; MULLER, S.S.; PEREIRA, O.C.; DAL-PAI-SILVA, M. Effects of physical training on the mechanical resistance of rat femur proximal thirds. *Acta Ortop Bras.* 18(5): 245-249, 2010.

ALESHINSKY, S.Y.; ZATSIORSKY, V.M. Human locomotion in space analyzed biomechanically through a multi-link chain model. *Journal of biomechanics.* 11(3): 101-108, 1978.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 41, n. 3, p. 687, 2009.

APTE, S.S.; PARKS, W.C. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 44:1-6, 2015.

AQUINO, C.F.; VIANA, S.O.; FONSECA, S.T. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e à imobilização. *Fisioterapia em Movimento.* 18(2): 35-43, 2005.

ARMSTRONG, R.B.; OGILVIE, R.W.; SCHWANE, J.A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 54: 80-93, 1983.

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

ARO, A.A.; VIDAL, B.C.; TOMIOSSO, T.C.; GOMES, L.; MATTIELLO, S.M.; PIMENTEL, E.R. Structural and biochemical analysis of the effect of immobilization followed by stretching on the Achilles tendon of rats. *Connect. Tissue Res.* 49: 443-54, 2008.

BARROSO, R.; TRICOLI, V.; UGRINOWITSCH, C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. *R. Bras. Ci. e Mov.* 13(2): 111-122, 2005.

BENJAMIN, M.; QIN, S.; RALPHS, J.R. Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys. *J. Anat.* 187: 625-633, 1995.

BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. Fibrocartilage in tendons and ligaments an adaptation to compressive load. *J. Anat.* 193:481-494, 1998.

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: 3306-3313, 2004.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**72:248-54, 1976.
- CADORE, E.L.; PINTO, R.S; BOTTARO, M.; IZQUIERDO, M. Strength and Endurance Training Prescription in Healthy and Frail Elderly. **Aging and Disease.** 5(3):183-195, 2014.
- CARVALHO, H.F.; VIDAL, B.C. Cell types and evidence for traumatic cell death in a pressure-bearing tendon of *Rana catesbeiana*. **Tissue Cell.** 26: 841-848, 1994.
- CHAKRABORTI, S.; MANDAL, M.; DAS, S.; MANDAL, A.; CHAKRABORTI, T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. **Molecular and Cellular Biochemistry.** 253:269-285, 2003.
- CAMBRI, L.T.; DE ARAUJO, G.G.; GHEZZI, A.C.; BOTEZELLI, J.D.; MELLO, M.A. Metabolic responses to acute physical exercise in young rats recovered from fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. **Lipids Health Dis.** 10(164): 10-1186, 2011.
- COMPER, I.; WAYNE, D. **Extracellular matrix.** Crc Press, 1996.
- CONTARTEZE, R.V.L.; MANCHADO, F.D.B.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.R. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comparative Biochemistry and Physiology Part. A: Molecular & Integrative Physiology,** 151(3): 415-422, 2008.
- ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P.P.; PIMENTEL, E.R; GOMES, L. Ultrastructural characteristics of tensional regions in tendons from rats of different ages. **Braz. J. Morphol. Sci.** 20(2): 109-114, 2003.
- FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethyleneblue. **Biochim. Biophys. Acta.** 883: 173-177, 1986.
- FARTHING, J.P.; CHILIBECK, P.D. The effects of eccentric and concentric training at different velocities on muscle hypertrophy. **Eur. J. Appl. Physiol.** 89(6): 578-86, 2003.
- FAVIER, R.J.; CONSTABLE, S.H.; CHEN, M.; HOLLOSZY, J.O. Endurance exercise training reduces lactate production. **J. Appl. Physiol.** 61: 885-889, 1986.
- FRANCHI, M.; FINI, M.; QUARANTA, M.; PASQUALE, V.; RASPANTI, M.; GIAVARESI, G.; OTTANI, V.; RUGGERI, A. Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon. **J. Anat.** 210: 1-7, 2007.
- FEITOSA, V.L.C.; ESQUISATTO, M.A.M.; JOAZEIRO, P.P.; GOMES, L.; FELISBINO, S.L.; PIMENTEL, E.R. Variations in the glycosaminoglycan content, swelling properties and morphological aspects of different regions of the superficial digital flexor tendon of pigs. **Cellular and Molecular Biology.** 48: 359-367, 2002.
- FISHER, J.; STEELE, J.; BRUCE-LOW, S.; SMITH, D. Evidence-based resistance training recommendations. **Med Sport.** 15(3): 147-162, 2011.

GATHERCOLE, L.J.; KELLER, A. Crimp morphology in the fibre-forming collagens. **Matrix** 11: 214-234, 1991.

GHORAYEB, N.; BARROS, T. **O Exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos especiais e preventivos**. São Paulo: Atheneu, 1999.

HEINEMEIER, K.M.; OLESEN, J.L.; HADDAD, F.; LANGBERG, H.; KJAER, M.; BALDWIN, K.M.; SCHJERLING, P. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. **J. Physio.** 582(3): 1303-1316, 2007.

HEINEGÅRD, D.; SOMMARIN, Y. Isolation and characterization of proteoglycans. **Methods Enzymol.** 144:319-73, 1987.

HORNBERGER JR, T.A.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physiol.** 29(1): 16-31, 2004.

JAMES, R.; KESTURU, G.; BALIAN G.; CHHABRA, A.B. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and involving treatment options. **J. Hand Surg.** 33A:102-112, 2008.

JOHANSSON, S. Non-collagenous proteins matrix. In: **Extracellular matrix**. Ed. 2^a, COMPER, W. D. Harwood Academic Amsterdam. N. T., vol 1, p., 476, p. 68-77, 1996.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand. J. Med. Sci. Sports.** 6: 312-20, 2000.

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

KE, Z.; YIP, S.P.; LI, L.; ZHENG, X.X.; TONG, K.Y. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS One*, v. 6 n. 2 p. e16643, 2011.

KIERNAN, J.A. **Histological and histochemical methods**. In Theory and Practice, 3rd ed., pp. 81-82. Pergamon Press, England. 1981.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol. Rev.** 84(2): 649-698, 2004.

KOSKINEN, S.O.A.; KJAER, M.; MOHR, T.; BIERING SORENSEN, F.; SUURONEN, T.; TAKALA, T.E.S. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. **Muscle Nerve.** 23: 580-589, 2000.

KOSKINEN, S.O.A.; HEINEMEIR, K.M.; OLESEN, J.L.; LANGBERG, H.; KJAER, M. Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. **J. Appl. Phys.** 96:861-864, 2004.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.** 61:205-209, 2010.

LANGBERG, H.; SKOVGAARD, D.; PETERSEN, L.J.; BULOW, J.; KJAER, M. Type-1 collagen turnover in peritendinous connective tissue after exercise determined by microdialysis. **J. Physiol.** 521: 299-306, 1999.

LEE, S.; FARRAR, R.P. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. **J. Exercise Physiol Online** 6.2: 80-87, 2003.

LEHTI, T.M.; SILVENNOINEN, M.; KIVELA, R.; KAINULAINEN, H.; KOMULAINEN, J. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of extracellular matrix proteins in mouse skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 290: 900-907, 2006.

LIANG, R.; WOO S.L.; NGUYEN, T.D.; LIU, P.C.; ALMARZ, A. Effects of a bioscaffold on collagen fibrillogenesis in healing medial collateral ligament in rabbits. **J. Orthop. Res.** 26(8):1098-1104, 2008.

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

MARQUES, M.C.; PEREIRA, A.; REIS, I.G.; Van den TILLAAR, R. Does an in-season 6-week combined sprint and jump training program improve strength-speed abilities and kicking performance in young soccer players. **J. Hum. Kinet.** 31(39):157-66, 2013.

MARQUETI, R.C.; PARIZOTTO, N.A.; CHRIGUER, R.S.; PEREZ, S.E.; CELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. 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.** 34:1274-80, 2006.

MARQUETI, R.C.; PRESTES, J.; PASCHOAL, M.; RAMOS, O.H.P.; PEREZ, S.E.A.; CARVALHO, H.F.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur. J. Appl. Physiol.** 104:1087-1093, 2008.

MAGNUSSON, S.P.; HANSEN, P.; KJAER, M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. **Scand. J. Med. Sci. Sports** 13(4):211-23, 2003.

MAYER, F.; SCHARHAG-ROSENBERGER, F.; CARLSOHN, A.; CASSEL.M.; MÜLLER, S.; SCHARHAG, J. The intensity and effects of strength training in the elderly. **Dtsch. Arztebl. Int.** 108(21): 359-64, 2011.

MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I; KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MELLO, M.L.; GODO C.; VIDAL, B.C.; ABUJADI, J.M. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during of tendon repair in the rat. **Ann. Histochem.** 20:145-52, 1975.

MELLO, M.L.; VIDAL, B.C. Experimental tendon repair: glycosaminoglycan arrangement in newly synthesized collagen fibers. **Cell. Mol. Biol.** 49(4): 579-585, 2003.

MELLO MALHEIRO, O.C.; GIACOMINI, C.T.; JUSTULIN JR., L.A.; DELELLA, F.K.; DAL-PAI-SILVA, M.D.; FELISBINO, S.L. Calcaneal tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running. **The Anatomical Record** 292:1656-1662, 2009.

MONTEIRO, J.C.; GOMES, M.L.M.; TOMIOSSO, T.C.; NAKAGAKI, W.R.; SBERVELHERI, M.M.; FERRUCCI, D.L.; PIMENTEL, E.R.; DOLDER, H. More resistant tendons obtained from the association of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 11(1):51, 2011.

MOTT, J.D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 16(5):558-564, 2004.

NAGASE, H.; WOESSNER JR., W.F. Matrix Metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry.** 274(31): 21491-21494, 1999.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc. Res.** 69:562-573, 2006.

O'BRIEN M. Structure and metabolism of tendons. **Scand. J. Med. Sci. Sports.** 7: 55-61, 1997.

PAGE-McCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 8(3): 221-233, 2007.

PALOP MONTORO, M.V.; PÁRRAGA MONTILLA, J.A.; LOZANO AGUILERA, E.; ARTEAGA CHECA, M. Sarcopenia intervention with progressive resistance training and protein nutritional supplements. **Nutr. Hosp.** 31(4):1481-90, 2015.

PARK, S-Y.; KWAK, Y.S.; HARVESON, A.; WEAVIL, J.C.; SEO, K.E. Low Intensity Resistance Exercise Training with Blood Flow Restriction: Insight into Cardiovascular Function, and Skeletal Muscle Hypertrophy in Humans. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology.** 19(3): 191-196, 2015.

PARKS, W.C.; WILSON, C.L.; LÓPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immunol.** 4(8): 617-29, 2004.

PIEZ, K. A., REDDI, A. H. Fibronectin, laminin, and other extracellular glycoproteins. In: HAKAMORI, S., FUKUDA, M., SEKIGUCHI, K., CARTER, W. G. **Extracellular Matrix Biochemistry.** New York: Elsevier Science. 452p. p. 288-305, 1984.

RIBEIRO, A.S.; AVELAR, A.; SCHOENFELD, B.J.; TRINDADE, M.C.; RITTI-DIAS, R.M.; ALTIMARI, L.R.; CYRINO, E.S. Effect of 16 weeks of resistance training on fatigue resistance in men and women. **J. Hum. Kinet.** 42:165-74, 2014.

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

RUFAL, A.; RALPHS, J.R.; BENJAMIN, M. Ultrastructure of fibrocartilages at the insertion of the rat Achilles tendon. **J. Anat.**189: 185-191, 1996.

SCHEFFER, D.L.; SILVA, L.A.; TROMM, C.B.; ROSA, G.L.; SILVEIRA, P.C.L.; SOUZA, C.T.; LATINI, A.; PINHO, R.A. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** 37: 1239-1246, 2012.

SCOTT, P.G.; NAKANO, T.; DODD, C.M. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. **Biochim. Biophys. Acta.** 1336: 254-262, 1997.

SHAW, H.M.; BENJAMIN, M. Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise. **Scand. J. Med. Sci. Sports.** 17: 303-15, 2007.

SILVA, J.A.F.; LORENCINI, M.; PERONI, L.A.; DE LA HOZ, C.L.R.; CARVALHO, H.F.; STACH-MACHADO, D.R. The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and-9) in induced periodontal disease. **J Periodontal Res.** 43:48-54, 2008.

SIMONSEN, E.B.; KLITGAARD, H.; BOJSEN-MOLLER, F. The influence of strength training, swim training and ageing on the Achilles tendon and m. soleus of the rat. **J. Sports Sci.** 13(4): 291-5, 1995.

SMITH, K.; RENNIE, M.J. New approaches and recent results concerning human-tissue collagen synthesis. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** 10: 582 - 590, 2007.

STEGEMANN H, STALDER K. Determination of hydroxyproline. **Clin. Chim. Acta.** 18(2): 267-73, 1967.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** 17: 463–516, 2001.

SUMMERS, A.P.; KOOB, T.J. The evolution of tendon - morphology and material properties. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** 133(4):1159-70, 2002.

TAKALA, T.E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scand. J. Med. Sci. Sports.** 10: 321-325, 2000.

VAN WART, H.E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 87(14): 5578-5582, 1990.

VAVERKA, F.; JAKUBSOVA, Z.; JANDACKA, D.; ZAHRADNIK, D.; FARANA, R.; UCHYTL, J.; SUPEJ, M.; VODICAR, J. The influence of an additional load on time and force changes in the ground reaction force during the countermovement vertical jump. **J. Hum. Kinet.** 8(38):191-200, 2013.

VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. **Cell. Mol. Biol.** 30:195-204, 1984.

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

VIDAL, B.C.; CARVALHO, H.F. Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age. **Matrix** 10: 48-57, 1990.

VIDAL, B.C. Crimp as part of a helical structure. **Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie.** 318(2): 173-178, 1995.

VIDAL, B.C. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron** 34: 423-432, 2003.

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

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

VOGEL, K.G.; HEINEGÅRD, D. Characterization of proteoglycans from adult bovine tendon. **J. Biol. Chem.** 260: 298-306, 1985.

VOGEL, K.G.; KOOB, T.J. Structural specialization in tendon under compression. **Int. Rev. Cytol.** 115: 267-293, 1989.

YOON, J.H.; BROOKS, R.; KIM, Y.H.; TERADA, M.; HALPER, J. Proteoglycans in chicken gastrocnemius tendons change with exercise. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 412: 279-286, 2003.

WAUGH, C.M.; KORFF, T.; FATH, F.; BLAZEVIČH, A. J. Effects of resistance training on tendon mechanical properties and rapid force production in pre pubertal children. **J. Appl. Physiol.** 117(3): 257-266, 2014.

WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. **FASEB J.** 5: 2145-2154, 1991.

ANEXO I



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 096/2014-01

Professor Responsável: Josete Mazon.

Equipe: Cláudio Teodoro de Souza, Wagner Joaquim da Silva e Edson Rosa Pimentel.

Titulo: "EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO RESISTIDO NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS MMP-2 E MMP-9 E NA ORGANIZAÇÃO DOS FEIXES DE COLÁGENO EM TENDÃO CALCÂNEO DE RATO WISTAR"

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 690 Ratos Wistar de 60 dias pesando aproximadamente 300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 096/2014-01

Principal Investigator: Josete Mazon.

Researchers: Cláudio Teodoro de Souza, Wagner Joaquim da Silva e Edson Rosa Pimentel.

Project title: "EFFECT OF RESISTIVE EXERCISE INTENSITIES IN DIFFERENT BIOLOGICAL ACTIVITY OF MMP-2 and MMP-9 AND ORGANIZATION OF COLLAGEN BUNDLES ON TENDON CALCANEUS IN MOUSE WISTAR".

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 18 de Junho de 2014.

Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto da Ceua

ANEXO II

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO RESISTIDO NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS MMP-2 E MMP-9 E NA ORGANIZAÇÃO DOS FEIXES DE COLÁGENO EM TENDÃO CALCÂNEO DE RATO WISTAR"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 15 de dezembro de 2015.

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Josete Mazon**

RG n.º 2.798.365

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Edson Rosa Pimentel**

RG n.º 5017230