

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

GUILHERME BORGES PEREIRA

**EFEITOS DA OVARECTOMIA E TREINAMENTO RESISTIDO NA ATIVIDADE
DA METALOPROTEINASE-2 NO TENDÃO CALCÂNEO DE RATAS**

**SÃO CARLOS
2010**

**EFEITOS DA OVARIECTOMIA E TREINAMENTO RESISTIDO NA ATIVIDADE
DA METALOPROTEINASE-2 NO TENDÃO CALCÂNEO DE RATAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EFEITOS DA OVARECTOMIA E TREINAMENTO RESISTIDO NA ATIVIDADE
DA METALOPROTEINASE-2 NO TENDÃO CALCÂNEO DE RATAS**

Guilherme Borges Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Fisiologia do Exercício.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P436eo

Pereira, Guilherme Borges.

Efeitos da ovariectomia e treinamento resistido na atividade da metaloproteinase-2 no tendão calcâneo de ratas / Guilherme Borges Pereira. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
50 f.

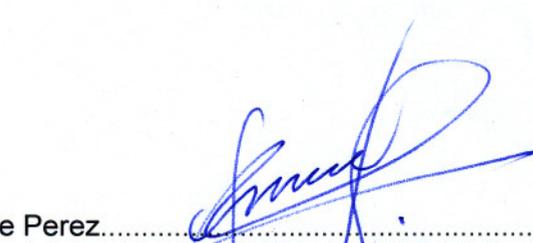
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Tecido conjuntivo. 2. Metalopeptidases de matrizes. 3. Exercício resistido. 4. Menopausa. 5. Ovariectomia. I. Título.

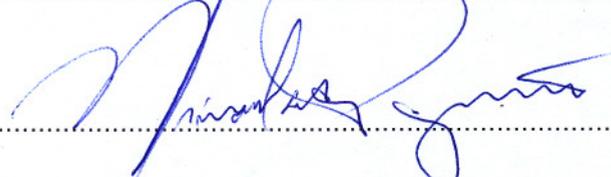
CDD: 612.75 (20ª)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Guilherme Borges Pereira

Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez.....

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto.....

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto.....

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais **JOSÉ DONIZETI PEREIRA** e **NÍVIA MARIA BORGES**, por não medirem dedicação e esforços na formação dos seus filhos. Muito obrigado pelo apoio em mais esta etapa da minha vida.

A minha amada irmã **JULIANA BORGES PEREIRA** pelas palavras de incentivo, as conversas sinceras e seu amor incondicional.

A **NATÁLIA BORGES PEREIRA** que sempre foi um anjo iluminando o caminho da minha família.

Ao meu amado irmão **GABRIEL BORGES PEREIRA** por não economizar um sorriso verdadeiro e por ser a minha energia para vencer cada etapa.

Aos meus amados irmãos por opção **RICHARD DIEGO LEITE, JONATO PRESTES e RODRIGO FERRO MAGOSSO**, por se tornarem a luz do meu caminho e impossíveis de esquecer.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela dádiva da vida, e por sempre me mostrar o caminho em todos os momentos. Agradeço também aos meus pais Nívia Maria Borges e José Donizeti Pereira pelo incentivo, apoio e dedicação em cada decisão. Aos meus irmãos Juliana Borges Pereira, Natália Borges Pereira e Gabriel Borges Pereira pelo amor incondicional e sincero.

Aos irmãos Jonato Prestes, Richard Diego leite e Rodrigo Ferro Magosso pela cumplicidade e apoio na construção deste trabalho.

Ao Gilberto Shiguemoto (Juca) pelo exemplo de conduta, ética, amor pelo próximo e palavras de incentivo para sempre caminhar com serenidade e paz.

Ao professor Sérgio e Vilmar, pela oportunidade oferecida no laboratório, conversas e amizade.

Ao Técnico do laboratório Cacau (Zé) pela disponibilidade em ajudar nos experimentos do Laboratório de Fisiologia do Exercício, pela amizade e boas conversas.

Às secretárias Márcia e Fernanda pela competência, atenção e disponibilidade.

Às professoras Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, Rita de Cássia Marqueti e Carmen Lúcia Salla Pontes pela oportunidade de frequentar o Laboratório de Biologia Molecular e ter a oportunidade de participar e vivenciar o dia a dia do laboratório.

Aos amigos e companheiros pelo crescimento pessoal e profissional: João Elias Dias Nunes, Gabriela Bombarda, Vivian Cury, Fabiano Candido Ferreira, Maria Fernanda Cury Rodrigues, Mateus Moraes Domingos, Vivian Maria Arakelian, Tatiene Neder, Nuno Frade Sousa, Diego Marine, Hamilton Vieira.

Aos colegas de caminhada durante este período de mestrado Joseane de Oliveira Duarte, Fabiana Sobral, Giovanna Togashi.

A todos os monitores do laboratório de Fisiologia do Exercício que apoiaram este trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação em ciências fisiológicas e outros professores que tive oportunidade de adquirir mais conhecimento durante as aulas ou simples conversa.

Aos *TNT's*, pela amizade, incentivo, respeito e preocupação em todos os momentos de nossa história.

Muito obrigado!

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

RESUMO

O remodelamento dos tendões depende da re-estruturação da matriz extracelular realizada pelas metaloproteinases de matriz (MMPs). O objetivo deste estudo foi investigar a atividade da MMP-2 em diferentes regiões do tendão calcâneo de ratas após ovariectomia e treinamento resistido. Ratas adultas Wistar foram agrupadas em: sedentário (Sed-Intacto); sedentário ovariectomizado (Sed-Ovx); exercício agudo (AgudoEx-Intacto); exercício agudo e ovariectomizado (AgudoEx-Ovx); treinado resistido (CrônicoEx-Intacto) e ovariectomizado treinado resistido (CrônicoEx-Ovx) (n= 10 por grupo). O protocolo de treinamento resistido exigiu a escalada dos animais em uma escada vertical de 1.1 metros com pesos atados a suas caudas. A sessão foi realizada uma vez a cada três dias de 4 a 9 escaladas com 8 a 12 movimentos dinâmicos em cada escalada. Cada sessão de treinamento consistia de no mínimo quatro escalas, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada anteriormente. Durante as escaladas subsequentes (máximo de cinco escaladas) eram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse atingida. Os grupos agudos realizaram apenas uma sessão e os animais dos grupos crônicos foram submetidos a 12 semanas de treinamento resistido. Foi observado na região proximal do tendão calcâneo aumento da atividade total da MMP-2 no Sed-Ovx, AgudoEx-Intacto, CrônicoEx-Intacto comparados com o Sed-Intacto ($p \leq 0,05$). Na região distal do tendão calcâneo, o AgudoEx-Ovx exibiu maior atividade da MMP-2 total do que Sed-Ovx e AgudoEx-Intacto ($p \leq 0,05$). O CrônicoEx-Ovx apresentou na região distal do tendão calcâneo menor atividade total da MMP-2 em relação ao Sed-Ovx e CrônicoEx-Intacto ($p \leq 0,05$). O AgudoEx-Ovx apresentou na região proximal e distal do tendão calcâneo maiores valores na forma ativa da MMP-2 comparado ao Sed-Ovx e AgudoEx-Intacto ($p \leq 0,05$). Ovariectomia e treinamento resistido modulam a atividade da MMP-2 de acordo com a região específica do tendão calcâneo.

Palavras-chave: Metalopeptidases de matrizes. Hormônios ovarianos. Tendão calcâneo. Exercício. Remodelamento do tecido conjuntivo.

ABSTRACT

Tendons remodeling relies upon extracellular matrix restructuring by the matrix metalloproteinases (MMPs). The aim of this study was to investigate MMP-2 activity in different regions of the calcaneal tendon after resistance training in ovariectomized rats. Wistar adult female rats were grouped into: sedentary (Sed-Intact); ovariectomized sedentary (Sed-Ovx); acute exercise (AcuteEx-Intact); ovariectomized acute exercise (AcuteEx-Ovx); resistance trained (ChronicEx-Intact) and ovariectomized resistance trained (ChronicEx-Ovx) (n= 10 each group). The resistance training protocol required the animals to climb a 1.1-m vertical ladder with weights attached to their tail was used. The sessions were performed once every 3 days with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per scaling. The acute groups performed one session, and the chronic groups underwent a 12-week of resistance training. There was an increase in total MMP-2 activity in Sed- Ovx, AcuteEx-intact and ChronicEx-intact compared with Sed-Intact in the proximal region of calcaneal tendon. AcuteEx-Ovx exhibited higher total MMP-2 than Sed-Ovx and AcuteEx-Intact in the distal region of calcaneal tendon. Chronic-Ovx presented lower total MMP-2 activity than Sed-Ovx and Chronic-Intact in the distal region of tendon. The active MMP-2 was higher for the AcuteEx-Ovx than Sed-Ovx and AcuteEx-Intact in proximal region of tendon. There was higher active MMP-2 in the distal region of tendon in the Acute-Ovx than Sed-Ovx and AcuteEx-Intact. Ovariectomy and resistance exercise modulate MMP-2 activity according to specific tendon region, indicating a differentiated tissue remodeling.

Key words: Matrix metalloproteinases. Ovarian hormones. Calcaneal tendon. Exercise. Connective tissue remodeling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DO TENDÃO CALCÂNEO NAS PATAS TRAZEIRAS DE RATOS.....	17
FIGURA 2. ESQUEMA DA HIERARQUIA ESTRUTURAL DO TENDÃO.....	19
FIGURA 3. ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
FIGURA 4. PROCEDIMENTO DE OVARECTOMIA.....	26
FIGURA 5. ORGANIZAÇÃO DOS DIAS DE TREINAMENTO RESISTIDO	27
FIGURA 6. ESTRUTURAS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS DURANTE O TREINAMENTO RESISTIDO.....	28
FIGURA 7. CARGA MÁXIMA (G) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CRÔNICOEX-INTACTO E CRÔNICOEX-OVX NAS SEMANAS 1, 6 E 12.....	33
FIGURA 8. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA MMP-2 (62 KDA) NO TENDÃO	34
FIGURA 9. ATIVIDADE TOTAL DA MMP-2 NO TENDÃO CALCÂNEO DE RATAS SEDENTÁRIAS INTACTAS (SED-INTACTO) E OVARECTOMIZADAS (SED-OVX).....	35
FIGURA 10. ATIVIDADE TOTAL DA MMP-2 NA REGIÃO PROXIMAL E DISTAL DO TENDÃO CALCÂNEO.	36
FIGURA 11. ATIVIDADE DA FORMA ATIVA DE MMP-2 NA REGIÃO PROXIMAL E DISTAL DO TENDÃO CALCÂNEO.	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS NA SEMANA 1 E SEMANA 12	32
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA - Análise de variância

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CrônicoEx-Intacto – Grupo experimental treinado intacto

CrônicoEx-Ovx – Grupo experimental treinado ovariectomizado

DP - Desvio padrão

EDL - Extensor longo dos dedos

kDa - kilodaltons

NaCl – Cloreto de sódio

NaN₃ - Azida de sódio

MEC - Matriz extracelular

mM – Millimolar

MMPs - Metaloproteinases de matriz

MMP-2 - matriz extracelular do tipo dois

MMP-9 - matriz extracelular do tipo nove

Ovx – Ovariectomia

pH - Potencial hidrogeniônico

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Sed-Intacto – Grupo experimental sedentário intacto

Sed-Ovx – Grupo Experimental sedentário ovariectomizados

TIMPs - Inibidores teciduais de metaloproteinases

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

ZnCl₂ – Clorato de zinco

°C - grau Celsius

μM – Micrometro

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	14
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. O tendão calcâneo	5
1.2. A matriz extracelular dos tendões	6
1.3. O remodelamento da matriz extracelular	7
1.4. A matriz extracelular e o exercício físico	9
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	11
2.1 Hipóteses	11
2.2. Objetivo Geral	11
2.2.1. Objetivos Específicos	11
3.MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Grupos Experimentais.....	12
3.3. Procedimento de Ovariectomia.....	14

3.4. Treinamento Resistido	15
3.5. Preparação do tecido	17
3.6. Extração das proteínas e zimografia	17
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Massa corporal	20
5.2. Carga de máxima de treinamento.....	20
5.3. Atividade da MMP-2 no Tendão Calcâneo	21
5.4. Atividade Total e Forma Ativa da MMP-2 – Comparação entre as regiões do Tendão Calcâneo de ratas sedentárias	22
5.5. Efeitos do estado ovariano e treinamento resistido na atividade total e forma ativa da MMP-2 nas regiões do tendão calcâneo	23
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO.....	30
8. REFERÊNCIAS.....	31
9. ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	37
10. ANEXO B – ACEITE E ARTIGO INTITULADO “THE EFFECT OF OVARECTOMY AND RESISTANCE TRAINING ON MMP-2 ACTIVITY IN RAT CALCANEAL TENDON”.	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. O tendão calcâneo

O tendão calcâneo, localizado anatomicamente junto à articulação do tornozelo é constantemente submetido a diferentes níveis de estresse mecânico (Figura 1, A). Por ser responsável por funções fundamentais, como a transmissão da força gerada pelos músculos ao osso e mobilidade da articulação, ele é uma estrutura que se adapta a diferentes forças, da sua região proximal à distal (Carvalho et al., 2000; Ker, 2002). A região proximal se inicia no final da junção miotendinosa dos músculos gastrocnêmio e sóleo, formando o tendão propriamente dito. A região distal se insere na porção média posterior do osso calcâneo por meio de uma rígida e achatada expansão de fibrocartilagem, denominada *Entesis* (De Mello Malheiro et al., 2009; Koob e Summers, 2002; Vogel e Koob, 1989).

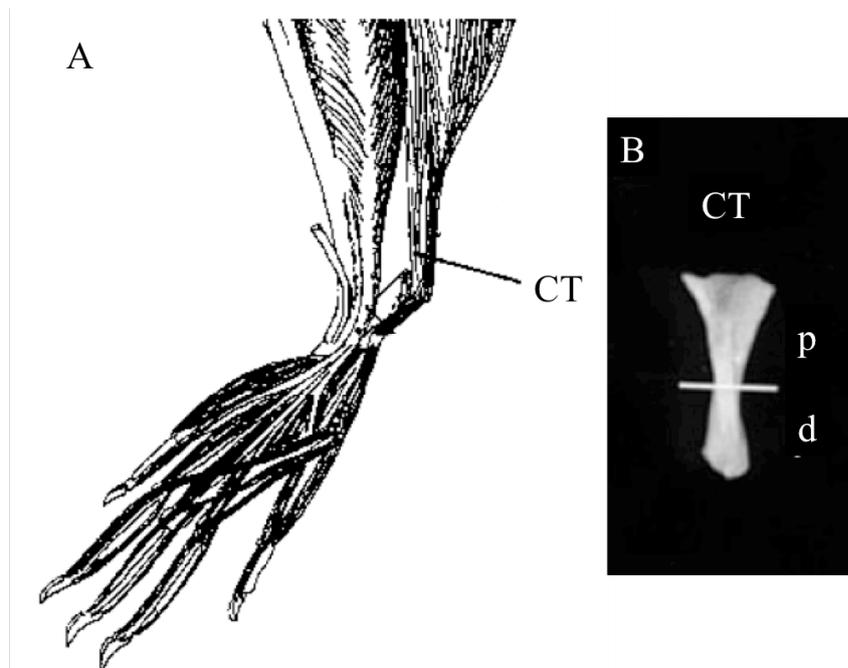


Figura 1. A – Localização anatômica do tendão calcâneo nas patas trazeiras de ratos, visualizadas medialmente. B – Tendão do calcâneo dissecado em suas regiões correspondentes. O tendão do calcâneo foi dividido na região proximal (p) e distal (d). (Adaptado de Covizi et al. 2001).

Alguns tendões apresentam variações em sua composição ao longo do seu comprimento. Essas variações resultam de adaptações a diferentes situações biomecânicas que devem ocorrer ao longo do seu percurso da inserção miotendinosa à inserção óssea. Além

disso, a composição dos tendões pode variar de acordo com diversos fatores, incluindo o estágio de desenvolvimento, níveis hormonais e exercício físico (Kjaer, 2004). Nesse sentido, Covizi et al. (2001) propuseram a divisão anatômica do tendão calcâneo em duas sub-regiões, a proximal e distal (Figura 1, B). A região proximal está sob tensão e a região distal está sob forças de tensão e compressão, conseqüentemente as regiões apresentam diferenças bioquímicas, na distribuição das proteínas, nas propriedades de intumescimento e histológicas (Covizi et al. 2001).

1.2. A matriz extracelular dos tendões

A matriz extracelular (MEC) pode ser definida como um conjunto de macromoléculas localizadas fora da célula que se integram e interagem exercendo suas complexas propriedades fisiológicas e biomecânicas do tecido conjuntivo (Kjaer, 2004). O tendão é um tipo de tecido conjuntivo denso onde há um predomínio de MEC em relação à quantidade e qualidade de células. Na MEC os fibroblastos são os responsáveis pela manutenção e síntese da maior parte dos seus constituintes (Koob e Summers, 2002; Magnusson et al., 2003). Os principais componentes da MEC são as proteínas fibrosas de colágeno, que correspondem de 85 a 95% do peso seco do tendão, as glicoproteínas, as proteoglicanas e os glicosaminoglicanos.

O colágeno é o nome de uma família de moléculas proteicas com importante papel para o tendão calcâneo. A heterogeneidade do colágeno é relacionada à composição dos aminoácidos e conseqüentemente com os tipos de cadeias em tríplice hélice que são formadas, determinando assim, uma série de estruturas diferentes (James e Wang, 2006).

No tendão, o colágeno do tipo I associado ao do tipo V e IX realizam as principais ligações entre fibrilas e outros componentes da MEC. Estas fibras de colágeno são altamente alinhadas e normalmente organizadas em fascículos de fibras contendo unidades menores denominadas fibrilas (Figura 2) (James e Wang, 2006).

O desenvolvimento e remodelamento adequado desta hierarquia é fundamental para a integridade estrutural e funcional dos tendões (Riley, 2005).

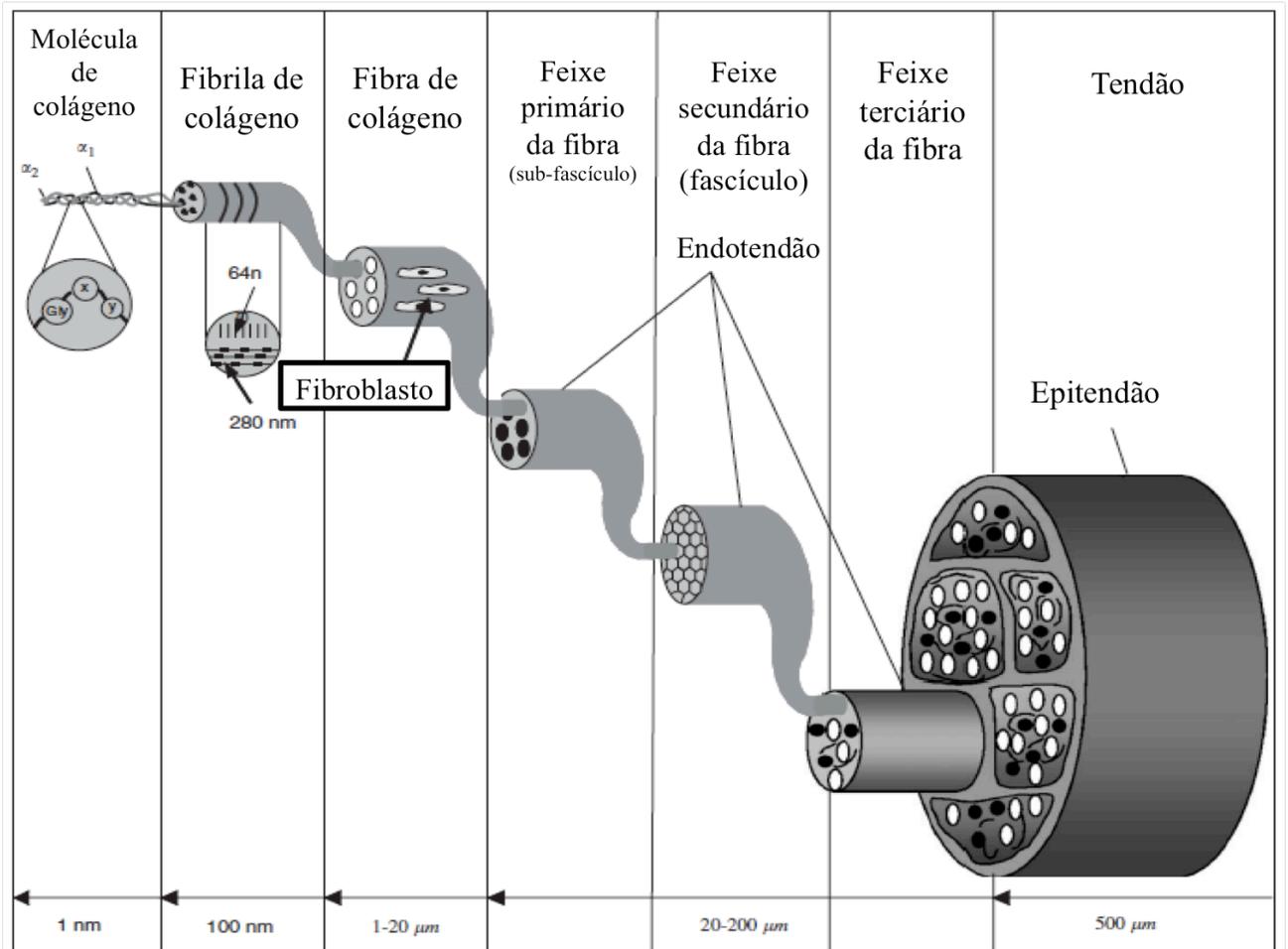


Figura 2. Esquema da hierarquia estrutural do tendão (adaptado de James e Wang, 2006).

1.3. O remodelamento da matriz extracelular

A manutenção da integridade e organização da matriz envolve a síntese e degradação dos componentes da MEC, incluindo colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanas e proteoglicanas (Carvalho et al., 2000). Em condições normais, o remodelamento dos componentes da MEC é realizado principalmente pelos fibroblastos localizados no endo, peri e epitendão, por meio de uma classe de enzimas denominadas Metaloproteinases de Matriz (MMPs). Estas enzimas estão presentes na forma latente, as quais são ativadas no espaço extracelular por enzimas (plasmina, triptase, quimase, outras metaloproteinases) e outros mecanismos (autoclivagem e auto-ativação) (Mott e Werb, 2004; Page-McCaw et al, 2007).

As MMPs são um grupo de endopeptidases dependentes de metais, principalmente zinco e cálcio, e são capazes de degradar os componentes da MEC, tais como o colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanas. As MMPs são divididas em 5 grupos principais dependendo do substrato que degradam: 1) as collagenases intersticiais (MMP-1, -8 e -13); 2) as gelatinases (MMP-2 e -9); 3) as estromelisinases (MMP-3, -10 e -11); 4) as metaloproteinases de membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) e 5) e MMPs que não se enquadram em algum dos grupos anteriores (MMP-7, -12, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -26, -27 e -28). Os fibroblastos do tendão também secretam proteínas inibidoras de MMPs. Esses inibidores são conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Assim, a atividade das MMPs são reguladas por meio de sua ativação ou inibição.

Nos tendões, a degradação do colágeno, um importante passo para o remodelamento tecidual, é iniciada no meio extracelular pelas MMPs, principalmente a MMP-2 e MMP-9 (Kjaer, 2004). A MMP-2 desempenha um papel essencial no “turnover” do colágeno, recuperação após o dano e homeostase do tecido conjuntivo, os quais são muito importantes para a funcionalidade dos tendões (Ker, 2002; Koob e Summers, 2002).

Nosso laboratório tem se dedicado extensivamente à melhor compreensão do remodelamento do tecido conjuntivo e a influência de hormônios sexuais em diversos tecidos. Recentemente, observamos que o estado hormonal ovariano (ausência de estrógeno) exerce forte influência sobre o acúmulo de gordura, evidenciado pelo aumento do conteúdo lipídico do fígado e depósitos de gordura (urogenital, mesentérica e retroperitoneal), aumento do colesterol total, na lipoproteína de baixa densidade, diminuição na concentração de triglicerídeo e na lipoproteína de muito baixa e alta densidade, aumento do índice aterogênico, aumento no conteúdo lipídico cardíaco em ratas ovariectomizadas (Leite et al., 2009). Estas alterações sistêmicas proporcionadas pela redução dos níveis dos hormônios ovarianos são geralmente acompanhadas por um grande número de problemas de saúde (Moran et al, 2006; Moran et al., 2007).

Além disso, foi demonstrado a influência dos hormônios sexuais, onde a diminuição de estrógeno suprimiu a atividade da MMP-2 nos músculos tibial anterior e extensor longo dos dedos (EDL) de ratas, o que pode ser associado a disfunção e fraqueza muscular devido ao prejuízo do remodelamento muscular (Prestes et al., 2009). Ademais, foi observado que a administração de hormônios derivados da testosterona, como os esteróides anabólicos androgênicos, pode promover a diminuição da atividade da MMP-2 em músculos (Marqueti et al., 2008b) e tendões (Marqueti et al., 2006, Marqueti et al., 2008a) de ratos.

Alteração do nível de estrógeno pode afetar a fisiologia e estrutura dos tendões (Cook et al., 2007) e provavelmente diferentes respostas da MMP-2 serão observadas nas distintas regiões dos tendões, uma vez que a presença de células e componentes da MEC não são igualmente distribuídas nas regiões do tendão (Covizi et al., Marqueti et al., 2008a)

1.4. A matriz extracelular e o exercício físico

Os músculos e tendões podem ser sujeitos a diferentes forças mecânicas e são capazes de remodelar dinamicamente sua composição em resposta a estas forças. Nesse sentido, já foi documentado que o exercício físico induz o aumento da síntese de colágeno e da atividade das MMPs (Langberg et al., 2001), indicando capacidade de remodelamento e adaptação do tecido conjuntivo (Heinemeier et al., 2007; Marqueti et al., 2008a). A MMP-2 e -9 podem estar envolvidas neste processo, uma vez que são capazes de degradar o colágeno fibrilar intacto (Kjaer, 2004).

Recentemente foi demonstrado que o treinamento de saltos na água durante 7 semanas promoveu aumento da atividade da MMP-2 nos músculos gastrocnêmio e sóleo, e nenhuma mudança da atividade no tibial anterior e EDL (Marqueti et al., 2008b). Além disso, foi observado que o remodelamento de músculos (Marqueti et al., 2008b) e tendões (Marqueti et al., 2006) podem ser prejudicados, apresentando diminuição da atividade da MMP-2 quando doses supra-fisiológicas de esteróides anabólicos androgênicos são associadas a um programa de exercício físico em ratos. Ademais, foi observado processos inflamatórios no tecido peritendinoso dos animais submetidos ao exercício físico, com e sem suplementação. Estes resultados indicam a influência dos hormônios e exercício físico sobre o remodelamento tecidual de músculos e tendões. Nos tendões, a administração de doses supra-fisiológicas de hormônios esteróides anabólicos androgênicos promove alterações das propriedades mecânicas (Marqueti et al., 2008a), das características viscoelásticas e do suporte de tensão e sobrecarga (Harwood e Aimel, 1992).

De Mello Malheiro et al. (2009) recentemente avaliaram a atividade da MMP-2 nas regiões proximal e distal do tendão do calcâneo de ratos adultos submetidos aos protocolos de salto na água e corrida na esteira. Foi observado na região proximal aumento da atividade da MMP-2 pró e forma ativa após o salto vertical, enquanto que a corrida na esteira

proporcionou aumento apenas da MMP-2 pró. Já na região distal do tendão calcâneo, os dois protocolos de exercícios aumentaram a atividade da pró e forma ativa da MMP-2, especialmente a corrida na esteira, que aumentou 8 a 11 vezes após a sessão. A região proximal e distal do tendão calcâneo exibem diferentes intensidades de remodelamento tecidual que podem ser associadas a sua constituição e aos efeitos de cada protocolo exercício.

Contudo, os estudos mencionados anteriormente não avaliaram os efeitos do treinamento resistido realizado em protocolo de escaladas associado a ovariectomia na atividade da MMP-2 nas duas regiões do tendão calcâneo. A melhor compreensão da atividade das metaloproteinases permitirá elucidar as respostas fisiológicas deste tecido frente aos diferentes estímulos e futuramente estabelecer as bases de doenças no tecido conjuntivo.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1. Hipóteses

- A ovariectomia irá diminuir a atividade da MMP-2 nas duas regiões do tendão calcâneo.
- Uma sessão aguda de treinamento resistido será capaz de elevar a atividade da MMP-2 nas ratas intactas e ovariectomizadas.
- O treinamento resistido crônico irá aumentar atividade total e forma ativa da MMP-2 nos animais intactos e ovariectomizados.
- O treinamento resistido crônico irá regular a atividade total e ativa da MMP-2 na ausência dos hormônios ovarianos.

2.2. Objetivo Geral

Investigar o efeito da diminuição do estrógeno pela ovariectomia (modelo experimental de menopausa em ratas), sobre o remodelamento do tendão calcâneo. Avaliar a influência do treinamento resistido neste remodelamento tecidual.

2.2.1. Objetivos Específicos

Avaliar e descrever a atividade da MMP-2 na região proximal e distal do tendão calcâneo de ratas após o período experimental sob efeitos da ovariectomia.

Avaliar a atividade da MMP-2 na região proximal e distal do tendão calcâneo de ratas intactas e ovariectomizadas após uma sessão aguda de treinamento resistido (escaladas).

Avaliar a atividade da MMP-2 na região proximal e distal do tendão calcâneo de ratas intactas e ovariectomizadas após treinamento resistido crônico (escaladas).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, Rodentia, Mammalia) com 13 semanas e peso inicial de aproximadamente 250 ± 30 g, obtidas do biotério da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), SP, Brasil. Os animais tiveram acesso livre a água e ração, foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratas por gaiola) numa temperatura constante de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, com luzes acesas das 06:00 h às 18:00 h. Todos os animais foram alimentados com ração padrão Labina® (Purina, Brasil). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (nº. protocolo 048/2007). Todos os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados e manuseio de animais laboratoriais dos Estados Unidos da América (National Research Council's, 1996).

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em seis grupos experimentais (10 animais por grupo) na seguinte ordem: 1) sedentário (Sed-Intacto); 2) sedentário ovariectomizado (Sed-Ovx); 3) exercício agudo (AgudoEx-Intacto); 4) exercício agudo ovariectomizado (AgudoEx-Ovx); 5) treinamento de resistido (CrônicoEx-Intacto) e 6) treinamento resistido ovariectomizado (CrônicoEx-Ovx). A figura 3 apresenta o esquema de distribuição e desenho experimental do estudo.

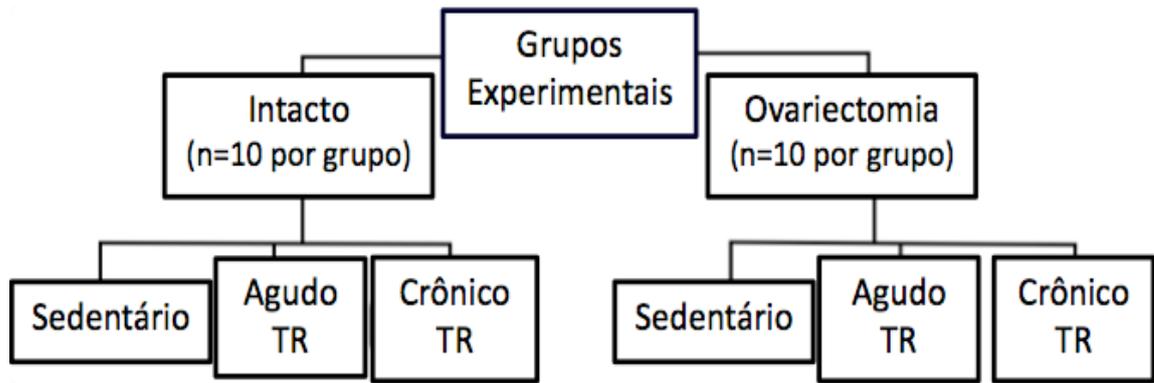


Figura 3. Esquema de distribuição dos grupos experimentais. TR, animais treinados.

Grupos sedentários

Os animais denominados sedentários foram assim classificados por não realizarem qualquer tipo de exercício, permanecendo durante todo o período experimental (12 semanas) em suas respectivas gaiolas. Os animais do grupo sedentário ovariectomizado tiveram seus ovários removidos.

Grupos de exercício agudo

Depois de 12 semanas de alojamento os grupos de exercício agudo (AgudoEx-Intacto e AgudoEx-Ovx) foram adaptados ao exercício resistido. Após três dias, as cargas máxima de carregamento foram determinadas. Após estes procedimentos, três dias após, os animais realizaram apenas uma sessão aguda de exercício resistido e foram imediatamente eutanasiados.

Grupos treinados

Os animais treinados CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx realizaram 12 semanas de exercício resistido. O treinamento foi iniciado no mesmo período para ambos os grupos.

3.3. Procedimento de Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada quando os animais completaram 13 semanas de idade, de acordo com a técnica descrita por Kalu (1991). Brevemente, os animais foram anestesiados com éter etílico e realizada uma pequena incisão (1-1,5 cm) bilateral entre a última costela e a coxa anterior, paralelamente a linha corporal (figura 4). Em seguida, a fáscia muscular e os músculos abdominais foram cuidadosamente divulsionados permitindo a identificação e exposição dos ovários. Imediatamente abaixo da fimbria foi realizada a ligadura com linha cirúrgica e remoção dos ovários. Após a remoção dos ovários, a musculatura e a pele foram suturados. Todos os animais tiveram uma semana de recuperação em caixas individuais.

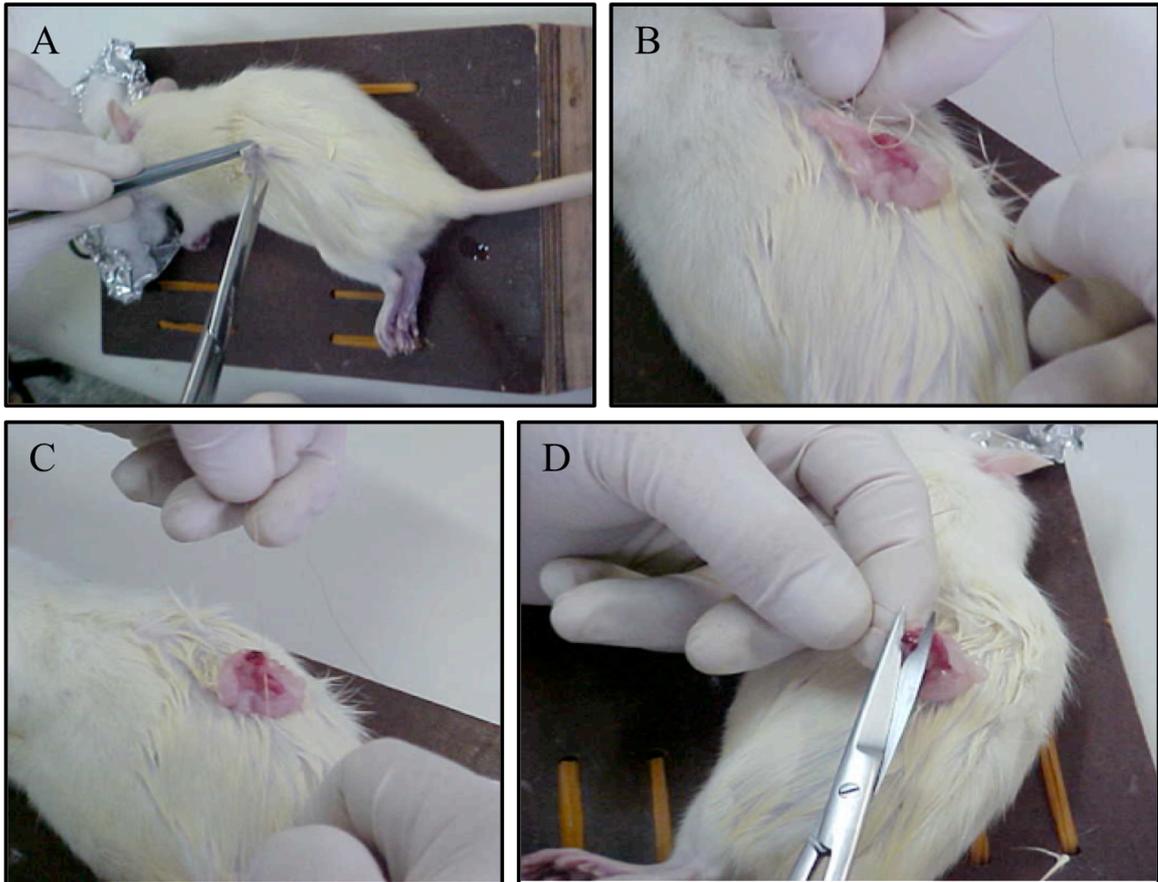


Figura 4. Procedimento de ovariectomia. **A)** Anestesia e incisão lateral. **B)** Exposição do ovário. **C)** Laqueadura com linha cirúrgica do ovário. **D)** Remoção do ovário, re-introdução para a cavidade abdominal e sutura final com linha cirúrgica.

3.4. Treinamento Resistido

O treinamento resistido de 12 semanas foi realizado uma vez a cada três dias (Figura 5).

Domíngo	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado
X	Familiarização	X	X	Carga máxima	X	X
Sessão de treino	X	X	Sessão de treino	X	X	Sessão de treino

Figura 5. Organização dos dias de treinamento resistido. X, Período de recuperação entre as sessões.

Inicialmente, as ratas foram familiarizadas ao protocolo de treinamento resistido que exigia que os animais escalassem uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2-cm, inclinação de 80°) com o aparato de carga preso as suas caudas (Figura 6A). O tamanho da escada fazia com que os animais realizassem 8-12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso a porção proximal da cauda com uma fita auto-adesiva (Figura 6D). Com o aparato fixado a cauda, as ratas foram colocadas na parte inferior da escada e familiarizadas com a escalada. Caso necessário um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento de escalada. No topo da escada as ratas alcançavam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam durante 120 segundos (Figura 6B). Este procedimento foi repetido até que os animais conseguissem voluntariamente escalar a escada, três vezes consecutivas, sem a necessidade de estímulo.

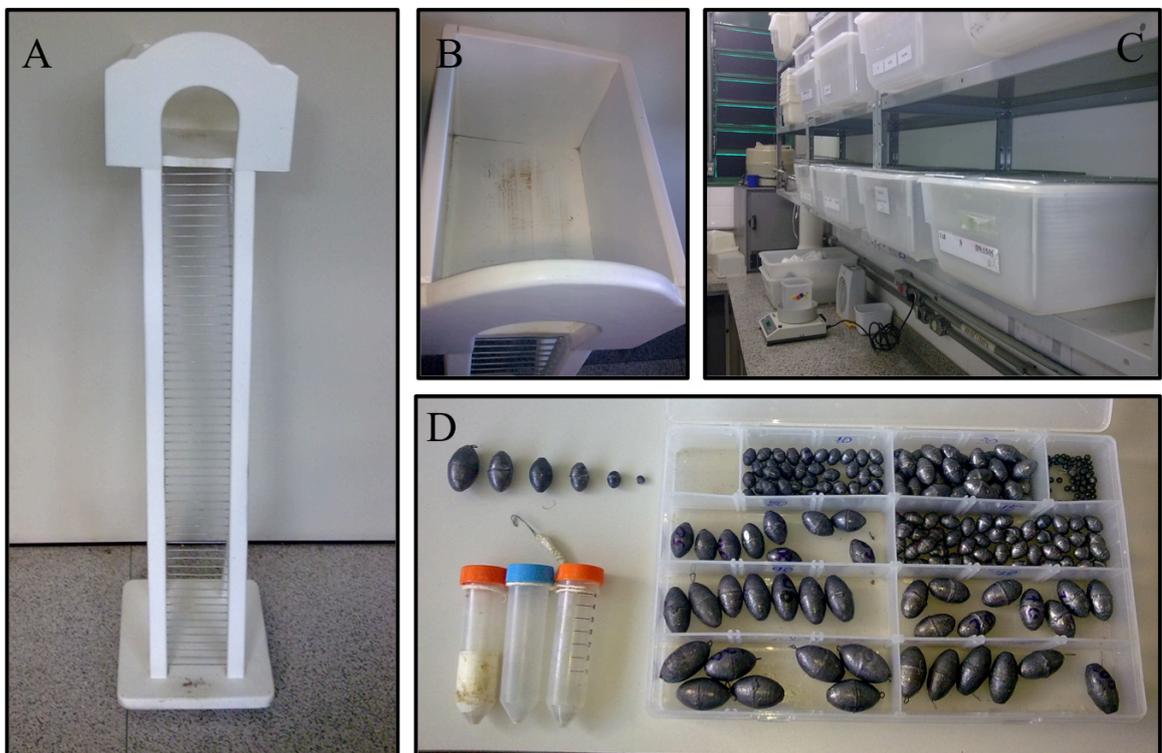


Figura 6. Estruturas e equipamentos utilizados durante o treinamento resistido. A, escada vertical; B, gaiola de descanso durante o treinamento resistido; C, biotério dos animais; D, aparatos e pesos utilizados durante o treinamento resistido.

Três dias após esta familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4-8 escaladas na escada com cargas progressivamente mais pesadas. A primeira escalada consistia em carregar uma carga de 75% da massa corporal do animal. Após 120 segundos de recuperação, a segunda escalada era realizada com a adição de um peso de 30g. Este

acrécimo de carga (+ 30g) foi repetido consecutivamente em cada escalada até uma carga com a qual a rata não conseguisse escalar toda a escada. A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguia progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento da rata para aquela sessão de treinamento.

As sessões de treinamento consistiam de quatro escaladas na escada, com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subseqüentes eram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada. Esta padronização de sessões de treinamento foram realizadas durante as 12 semanas, totalizando 26 sessões de treinamento resistido. O protocolo de treinamento resistido foi adaptado de Hornerberg e Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo.

3.5. Preparação do tecido

Após 12 semanas os animais foram sacrificados por decapitação após a última sessão de treinamento. Os úteros foram cuidadosamente removidos. O tendão calcâneo foi imediatamente removido das patas traseiras e dividido em duas regiões: proximal e distal (Figura 1B). Em seguida foram guardados em tubos de criogenia, congelados no nitrogênio líquido e armazenados no freezer a -80 °C até o momento das análises.

3.6. Extração das proteínas e zimografia

Esta técnica foi utilizada para detecção da atividade de proteases nos extratos celulares. Cinco amostras do mesmo grupo e região do tendão calcâneo foram associados ao tampão de extração (ácido cacodílico 10 mM pH 5,0, NaCl 0,15 mM, ZnCl₂ 1 µM, CaCl₂ 20 mM, NaN₃ 1,5 mM e Triton X-100 0,01% [v/v]) e trituradas em um homogeneizador do tipo Power Gen – Fisher Scientific por três a quatro ciclos de 5 segundos cada um. Após este período, o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e quantificado o conteúdo de proteínas totais através do método BCA,

utilizando-se kit comercial (Pierce®, BCA protein assay reagent). As concentrações de proteínas totais foram apresentadas em mg/g de tecido.

Triplicatas das amostras de extração em cada região foram submetidas à eletroforese, em gel de poliacrilamida a 10% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Após a 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 pela incubação na solução tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0.02%) durante 20 horas a 37 °C. Posteriormente, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados com a solução de ácido acético, metanol e água (1:4:5) para a visualização das bandas de atividade. A massa molecular relativa das bandas foi determinada de acordo com o padrão de peso molecular (BrenchMark, Pré-Stained Protein Ladder). Foram realizadas análises semiquantitativas por densitometria das bandas utilizando o software GeneTools.

Para minimizar possíveis variáveis que repercutissem em erros, os géis foram preparados em remessas e corridos com o mesmo tempo e fotografados nas mesmas condições. Os dados foram expressos como a atividade total (a totalidade em unidades arbitrárias para a pró, intermediária e forma ativa da MMP-2) e forma ativa da MMP-2.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). A análise estatística foi iniciada com os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e de homocedasticidade (critério de Bartlett). Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homocedasticidade sendo utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de dois fatores, levando em consideração duas variáveis: exercício resistido x ovariectomia. Na análise da capacidade máxima de carregamento foi utilizado o teste Anova two-way (levando-se em consideração as variáveis ovariectomia x tempo). Para os dados de massa corporal (g) dos animais na semana 1 e semana 12, foi utilizado o Anova de três fatores (exercício x ovariectomia x semana). Quando a diferença apresentada era significativa, foi aplicado o teste de Tukey para comparações múltiplas.

As diferenças intra-grupo entre a região proximal e distal do CT foi analisada com o teste t de Student. Quando a diferença presente foi significante, o teste de Tukey foi aplicado para as múltiplas comparações com o nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Massa corporal

Na massa corporal dos animais não houve nenhuma interação estatisticamente significativa entre as intervenções. Isso indica que o aumento da massa corporal da semana 1 para a semana 12 foi similar para todos os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Massa corporal (g) dos animais na semana 1 e semana 12.

Grupos experimentais (n=10 por grupo)	Semana 1	Semana 12
Sed-Intacto	247,7 ± 3,5	301,1 ± 8,8*
Sed-Ovx	249,0 ± 7,4	283,0 ± 9,7*
AgudoEx-Intacto	244,1 ± 2,1	286,5 ± 7,0*
AgudoEx-Ovx	236,6 ± 3,3	306,1 ± 5,8*
CrônicoEx-Intacto	246,9 ± 7,0	289,0 ± 8,2*
CrônicoEx-Ovx	246,3 ± 3,5	292,6 ± 6,4*

*Diferença estatisticamente significativa comparado a semana 1. Os valores estão apresentados pela média ± erro padrão da média, $p \leq 0,05$.

5.2. Carga de máxima de treinamento

Para a carga máxima durante as 12 semanas de treinamento, não houve nenhuma interação entre grupo e tempo, indicando que os grupos CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx aumentaram a capacidade máxima de carregamento de maneira similar durante o treinamento (Figura 7). As cargas aumentaram após a semana 6 e semana 12 quando comparado com a semana 1, e após a semana 12 comparado com a semana 6 (Figura 7). Deste modo, não houve nenhuma diferença das cargas máximas entre ambos os grupos treinados cronicamente no período de 12 semanas.

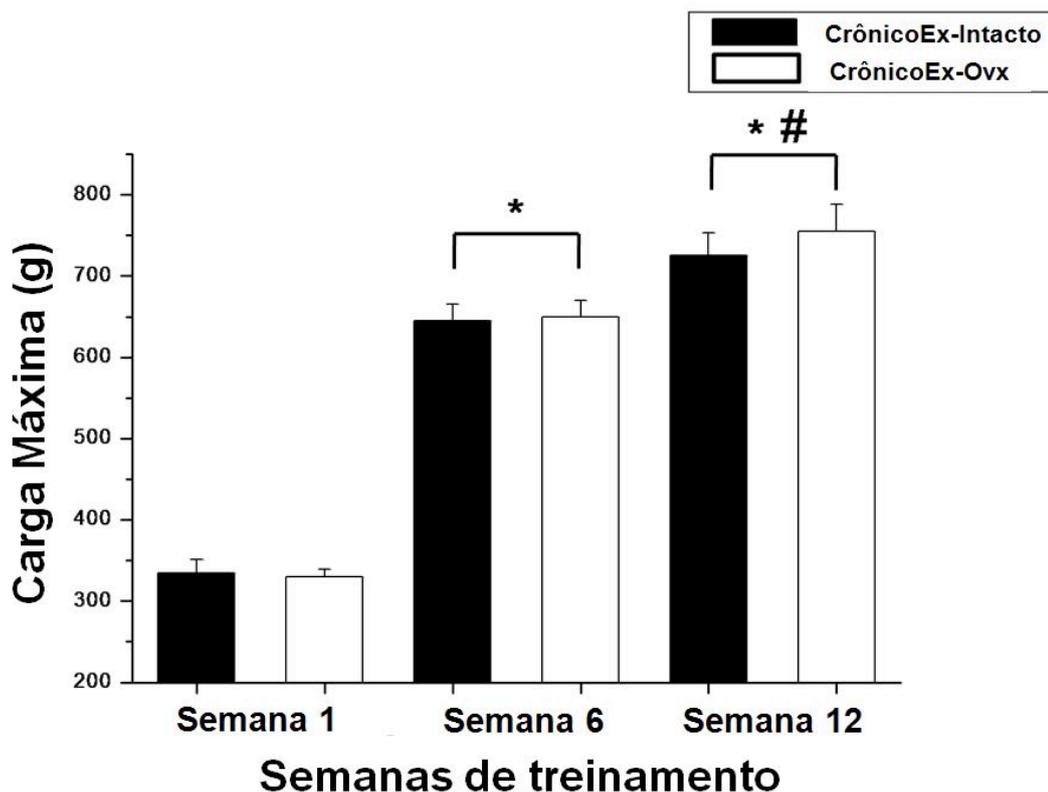


Figura 7. Carga máxima (g) dos animais dos grupos CrônicoEx-Intacto e CrônicoEx-Ovx nas semanas 1, 6 e 12. Os valores estão apresentados pela média \pm erro padrão da média, $p \leq 0,05$ ($n = 10$ por grupo). *Diferença estatisticamente significativa comparado com a semana 1; #Diferença estatisticamente significativa entre a semana 6 e semana 12.

5.3. Atividade da MMP-2 no Tendão Calcâneo

As bandas encontradas em todos os grupos são de 72, 62 e 57 kDa as quais correspondem a pró-, intermediária-, e forma ativa da MMP-2, respectivamente. O procedimento de Western blotting (dados não apresentados) demonstrou ativação da MMP-2 proposta por Birkedal-Hansen (1995). Não foi observado bandas claras de 81 ou 92 kDa correspondentes a forma pró e ativa da MMP-9, respectivamente. A atividade proteolítica da região proximal e distal do tendão calcâneo foram analisadas pela zimografia de gel SDS-PAGE (Figura 8A, B).

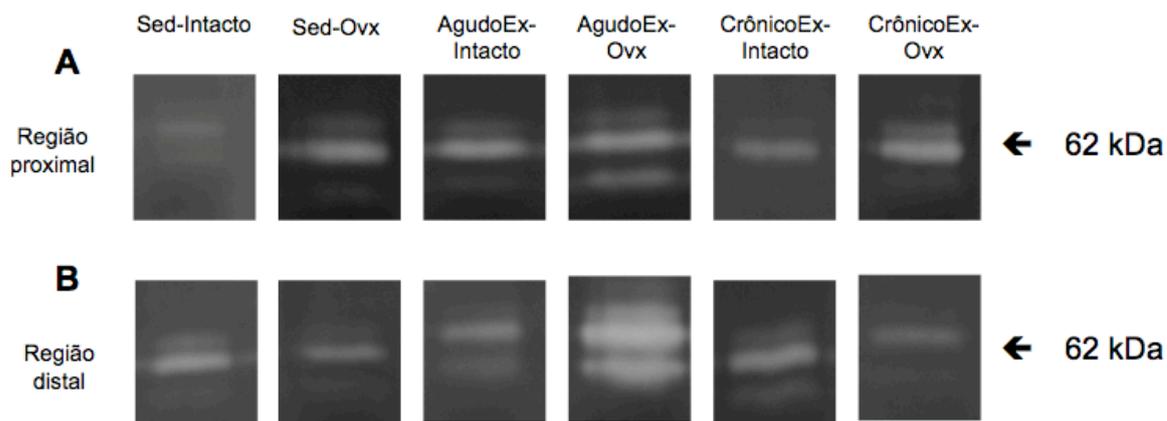


Figura 8. Análise da atividade da MMP-2 (62 kDa) no tendão calcâneo demonstrada em gel de gelatina a 1%. Cada coluna representa um pool de amostras ($n=5$; 30 μg em cada pool) em diferentes grupos de animais. Os géis foram analisados pela densitometria e os valores expressos em unidades arbitrárias. A, região proximal do tendão calcâneo. B, região distal do tendão calcâneo. Animais sedentários intactos (Sed-Intacto); Sedentários e ovariectomizados (Sed-Ovx); Exercício agudo intactos (AgudoEx-Intacto); Exercício agudo e ovariectomia (AgudoEx-Ovx); Cronicamente treinados e ovariectomia (CrônicoEx-Intacto); Cronicamente treinados intactos (CrônicoEx-Intacto).

5.4. Atividade Total e Forma Ativa da MMP-2 – Comparação entre as regiões do Tendão Calcâneo de ratas sedentárias

O Sed-Intacto apresentou menor atividade total da MMP-2 na região proximal do que a região distal do tendão calcâneo ($p=0.001$; Figura 9A). Entretanto, o Sed-Ovx apresenta maior atividade total da MMP-2 na região proximal do que a distal do tendão calcâneo ($p=0.001$; Figura 9A). Os grupos Sed-Intacto e Sed-Ovx não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes regiões do tendão calcâneo para a forma ativa da MMP-2 (Figura 9B).

MMP-2 no tendão calcâneo de ratas sedentárias

■ Intactos □ Ovariectomizados

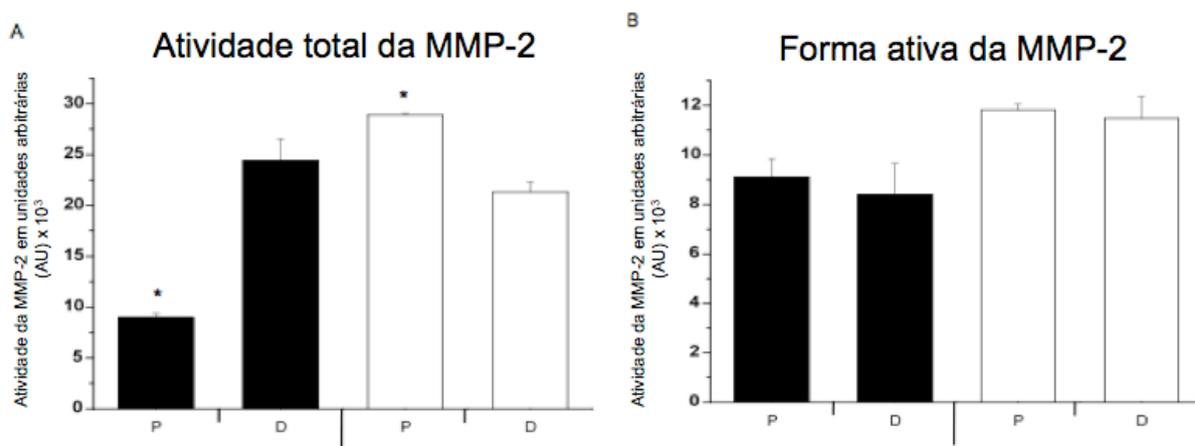


Figura 9. Atividade total da MMP-2 no tendão calcâneo de ratas sedentárias intactas (Sed-Intacto) e ovariectomizadas (Sed-Ovx) determinada pela zimografia. A, atividade total da MMP-2 foi determinada pela somatória da densidade óptica integrada (expressa em unidade arbitrárias – AU) obtida para as três bandas (pró, intermediária e forma ativa da MMP-2). B, variações na forma ativa da MMP-2 mensurada pela densidade óptica integrada da banda ativa (62 kDa) na região proximal (P) e distal (D) no tendão calcâneo dos grupos Sed-Intacto e Sed-Ovx. Os valores estão apresentados pela média \pm desvio padrão, $p \leq 0,05$. *Diferença intra-grupo estatisticamente significativa entre a região distal e proximal do tendão calcâneo.

5.5. Efeitos do estado ovariano e treinamento resistido na atividade total e forma ativa da MMP-2 nas regiões do tendão calcâneo

Foi observado no Sed-Ovx ($p=0.001$), AgudoEx-Intacto ($p=0.001$) e CrônicoEx-Intacto ($p=0.004$) na região proximal do tendão calcâneo aumento significativo da atividade total da MMP-2 comparado ao Sed-Intacto. Adicionalmente, foi observado maior atividade total da MMP-2 na região distal do tendão calcâneo do CrônicoEx-Ovx ($p=0.001$) e AgudoEx-Ovx ($p=0.007$) comparado ao Sed-Ovx.

Houve interação significativa entre os grupos. Foi observado maior atividade total da MMP-2 da região proximal no AgudoEx-Ovx ($p=0.003$) e CrônicoEx-Ovx ($p=0.001$) comparado ao AgudoEx-Intacto e CrônicoEx-Intacto, respectivamente (Fig. 10).

O grupo AgudoEx-Ovx exibiu na região distal do tendão calcâneo maior atividade total da MMP-2 comparado ao Sed-Ovx e AgudoEx-Intacto (Fig. 10). Além disso, o grupo

CrônicoEx-Ovx apresentou na região distal do tendão calcâneo menor atividade total da MMP-2 comparado ao Sed-Ovx ($p=0.004$) e CrônicoEx-Intacto ($p=0.001$) (Fig. 10).

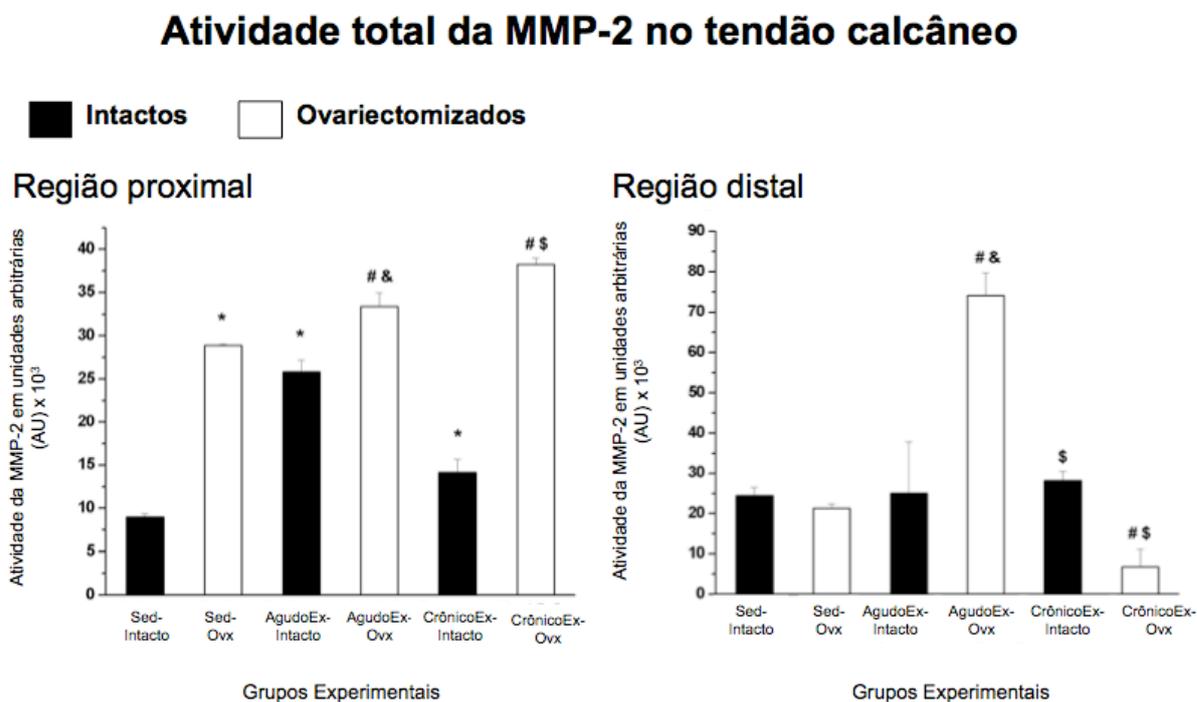


Figura 10. Atividade total da MMP-2 na região proximal e distal do tendão calcâneo determinada pela zimografia. A atividade total da MMP-2 foi determinada pela somatória da densidade óptica integrada obtida (expressa em unidades arbitrárias – AU) para as três bandas (pró, intermediária e forma ativa da MMP-2). Os valores estão apresentados pela média \pm desvio padrão, $p \leq 0,05$. *Diferença significativa para o Sed-Intacto; #Diferença significativa para o Sed-Ovx; &Diferença significativa para o AgudoEx-Intacto; \\$Diferença significativa para o CrônicoEx-Intacto. Animais sedentários intactos (Sed-Intacto); Sedentários e ovariectomizados (Sed-Ovx); Exercício agudo intactos (AgudoEx-Intacto); Exercício agudo e ovariectomia (AgudoEx-Ovx); Cronicamente treinados e ovariectomia (CrônicoEx-Intacto); Cronicamente treinados intactos (CrônicoEx-Intacto).

A forma ativa da MMP-2 aumentou somente na região proximal do tendão calcâneo no Sed-Ovx comparado ao Sed-Intacto ($p=0.003$; Fig. 11). Houve interação significativa entre os grupos para a MMP-2 na forma ativa na região proximal do tendão calcâneo, demonstrando que o AgudoEx-Ovx apresenta maiores valores comparado ao Sed-Ovx ($p=0.001$) e AgudoEx-Intacto ($p=0.001$; Fig. 11). O grupo CrônicoEx-Ovx também apresentou maiores valores na forma ativa da MMP-2 na região proximal do tendão calcâneo comparado ao CrônicoEx-Intacto ($p=0.001$; Fig. 11).

A região distal do tendão calcâneo também apresentou interação significativa entre os grupos para a forma ativa da MMP-2, demonstrando que a atividade da forma ativa da MMP-2 depende dos hormônios ovarianos. Houve aumento da forma ativa da MMP-2 no Sed-Ovx,

AgudoEx-Intacto e CrônicoEx-Intacto comparado ao Sed-Intacto (Fig. 11). O grupo AgudoEx-Ovx apresentou maiores valores da forma ativa da MMP-2 na região distal do tendão calcâneo comparada ao Sed-Ovx ($p=0.001$) e AgudoEx-Intacto ($p=0.001$; Fig. 11). No entanto, o CrônicoEx-Ovx demonstrou menores valores na forma ativa da MMP-2 na região distal do tendão calcâneo comparado ao Sed-Ovx ($p=0.010$) e CrônicoEx-Intacto ($p=0.008$; Fig. 11).

Forma ativa da MMP-2 no tendão calcâneo

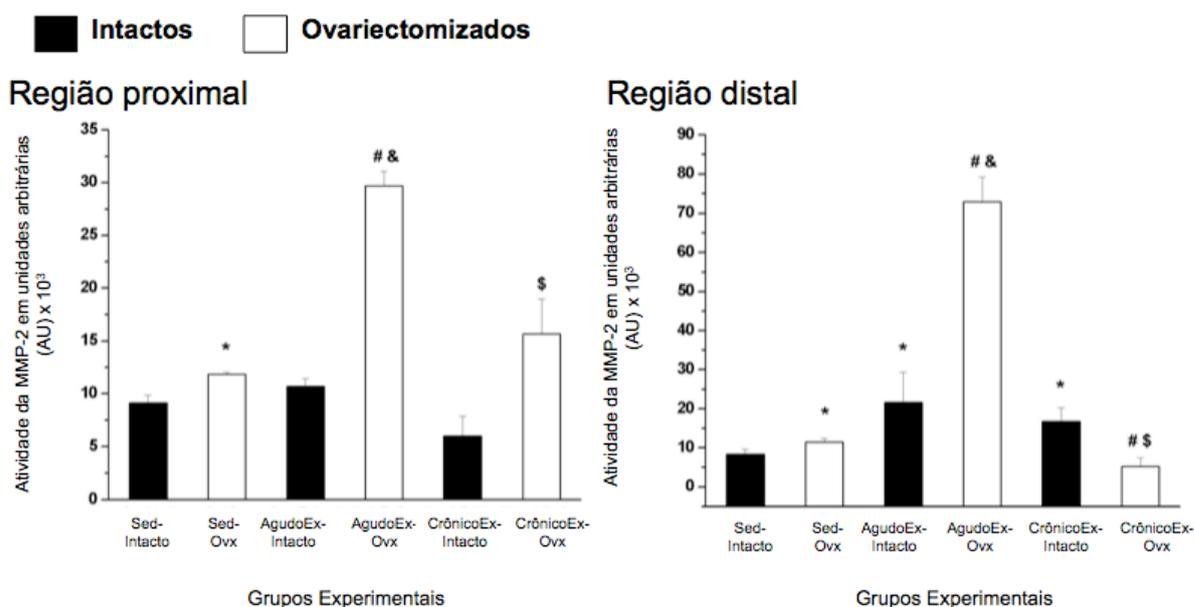


Figura 11. Atividade da forma ativa de MMP-2 mensurada pela densidade óptica integrada da banda ativa (62 kDa) na região proximal e distal do tendão calcâneo determinada pela zimografia. Os valores estão apresentados pela média \pm desvio padrão em unidades arbitrárias (AU), $p \leq 0,05$. *Diferença significativa para o Sed-Intacto; #Diferença significativa para o Sed-Ovx; &Diferença significativa para o AgudoEx-Intacto; \$Diferença significativa para o CrônicoEx-Intacto. Animais sedentários intactos (Sed-Intacto); Sedentários e ovariectomizados (Sed-Ovx); Exercício agudo intactos (AgudoEx-Intacto); Exercício agudo e ovariectomia (AgudoEx-Ovx); Cronicamente treinados e ovariectomia (CrônicoEx-Intacto); Cronicamente treinados intactos (CrônicoEx-Intacto).

6. DISCUSSÃO

O atual estudo demonstrou que os hormônios ovarianos modulam diferentemente a atividade da MMP-2 na região proximal e distal do tendão calcâneo. A região proximal e distal do tendão calcâneo apresentam atividade total da MMP-2 diferente, mas não da forma ativa da MMP-2. Interessantemente, a ovariectomia leva a aumentos na atividade total da MMP-2 na região proximal. Além disso, a ovariectomia leva a aumentos na forma ativa da MMP-2 tanto na região proximal quanto na região distal do tendão calcâneo, indicando papel fundamental dos hormônios ovarianos na manutenção do tecido conjuntivo. Uma das limitações deste estudo é a ausência das mensurações das concentrações séricas de estrógeno nos grupos avaliados. Diante disso, os resultados de recentes trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Leite et al., 2009; Prestes et al., 2009) utilizando os mesmos animais e grupos experimentais estão de acordo aos valores de referência da literatura que realizaram a ovariectomia e mensuraram as concentrações séricas de estrógeno (Barsalani et al., 2008; Corriveau et al., 2008; Pighon et al., 2009; Moran et al., 2006). Ademais, observamos visualmente atrofia do útero no grupo sedentário ovariectomizado comparado ao sedentário intacto. A confluência destes fatores assegura a eficácia da técnica em reduzir os valores basais de estrógeno permitindo tais conclusões.

Outro importante achado foi que o protocolo de exercício resistido agudo ou crônico promove estímulos para aumentar a atividade total e forma ativa da MMP-2. A região proximal do tendão calcâneo devido aos maiores aumentos da atividade da MMP-2, parece ser mais sensível aos estímulos do treinamento resistido comparada à região distal, mesmo na condição de ovariectomia. Apesar da ovariectomia, a carga máxima de carregamento aumentou em proporções similares para os grupos treinados cronicamente.

Os estudos sobre geração de força muscular em animais ovariectomizados apresentaram diferentes resultados. Por exemplo, McCormick et al. (2004) mostraram que a força tetânica isométrica máxima do sóleo não foi afetada pela ovariectomia em ratas jovens. No entanto, Moran et al. (2006) mostraram que durante a contração, diminui a ligação entre actina e miosina nas fibras musculares de camundongos fêmeas ovariectomizadas. De acordo com os autores esta redução ocorreu na mesma proporção que a redução da força isométrica máxima. Em contrapartida, no presente estudo analisamos a capacidade máxima de carregamento no exercício de escalada em escada, uma avaliação mais geral da força que

depende de vários grupos musculares, e não uma forma isolada como a utilizada nos estudos anteriormente citados. Além disso, não observamos diferenças na área de secção transversa muscular do tibial anterior e sóleo entre os animais intactos e ovariectomizados treinados (dados não publicados). Por esta razão, propomos a realização de mais estudos e diferentes tipos de análises da força geral e específica para avaliar estas alterações.

As regiões proximal e distal do tendão calcâneo foram avaliadas em outros estudos e demonstraram ser diferentes quanto à morfologia e distribuição das estruturas (Covizi et al., 2001; De Mello Malheiro et al. 2009; Magnusson et al., 2003). Independente do estado ovariano, os animais sedentários apresentaram diferenças na atividade total da MMP-2 entre as regiões proximal e distal do tendão calcâneo. Em outros estudos com ratos sedentários e machos, foi demonstrado perfil similar na atividade da forma pró e intermediária da MMP-2 entre as regiões proximal e distal do tendão calcâneo (Marqueti et al., 2008b; De Mello Malheiro et al., 2009). Estes achados indicam possíveis diferenças fisiológicas relacionadas ao gênero na modulação da atividade da MMP-2 nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo. O fibroblasto é a célula especializada pela produção e organização da MEC do tendão. Evidências sugerem que o estrógeno estimula a transcrição, a tradução e a formação de macromoléculas estruturais e de degradação como, o colágeno e a MMP-2 em diversos tecidos. (Mott e Werb, 2004; Page-McCaw et al, 2007; Slauterbeck et al., 1999; Toyoda et al., 1998; Yu et al., 2001). Além disso, diferenças relacionadas com o gênero têm sido evidenciadas no tendão humano, indicando que mulheres com níveis normais de estrógeno apresentam menor taxa de síntese de colágeno e menor área de secção transversa do tendão comparada aos homens (Bryant et al., 2008).

Esta possível diferença da atividade da MMP-2 entre as regiões do tendão pode ser atribuída ao tipo e quantidade celular, com a MEC e as propriedades de suporte de cargas mecânicas da região proximal e distal do tendão calcâneo (De Mello Malheiro et al., 2009; Riley, 2005; Rufai et al., 1992). A região proximal, também conhecida como regiãomiotendinosa, conecta o tecido conjuntivo de revestimento das unidades musculares aos elementos fibrilares do tendão. Esta região é mais rica em fibras de colágeno e elastina, o que lhe confere a propriedade de suporte de tensão. A região distal contorna a articulação do tornozelo, caracterizada pela presença de depósitos de proteoglicanas. Nesta região o tendão sofre forças de compressão e fricção além de suportar a tensão gerada pelo músculo e pode exibir diferente arranjo que depende da ação das forças biomecânicas (Covizi et al., 2001; Koob e Summers, 2002; Vogel e Koob, 1989). Considerando que na região proximal há mais

fibrilas de colágeno, e que esta pode regular a síntese e ativação da MMP-2 estas diferenças entre as regiões podem ajudar explicar a elevada atividade total e forma ativa da MMP-2 observada na região proximal do tendão calcâneo de ratas ovariectomizadas (Kjaer, 2004; Riley, 2005).

Ademais, a longa exposição do estado hormonal altera a estrutura e função tecidual dos tendões, enquanto que pequenas exposições a mudança hormonal não. Isto sugere que os hormônios sexuais podem exercer papel regulador no “turnover” do colágeno do tendão, uma vez que o colágeno é a proteína dominante do tecido conjuntivo (Risteli e Risteli, 1995).

Neste estudo observamos a influência da redução dos níveis séricos de estrógeno proporcionado pela ovariectomia na modulação da atividade da MMP-2. Houve aumento da atividade total na região proximal e aumento nas duas regiões do tendão calcâneo para a forma ativa da MMP-2 nos animais ovariectomizados indicando aumento do remodelamento tecidual. Este achado indica mais uma vez o papel regulador do estrógeno no “turnover” do colágeno no tendão. A compreensão dos mecanismos reguladores da atividade da MMP-2 nas diferentes regiões do tendão calcâneo é muito complexa, pois ainda não foram elucidados os mecanismos de ação do estrógeno no fibroblasto do tendão. Além disso, sabe-se que a regulação da atividade da MMP-2 pode ser realizada em sua síntese e secreção, localização extracelular, na ativação do zimogênio, fatores de inibição e disponibilidade de substratos (Covizi et al., 2001; De Mello Malheiro et al. 2009; Magnusson et al., 2003; Page-McCaw, 2007). O estrógeno provavelmente atua em ou mais destes fatores regulando a atividade da MMP-2 no tendão, havendo a necessidade de futuras pesquisas investigando os mecanismos reguladores da atividade da MMP-2 associado à diminuição do estrógeno.

Porém, permanece desconhecido se o aumento da atividade da MMP-2 nos animais ovariectomizados é benéfico para a funcionalidade do tendão. Neste sentido, foi demonstrado que o ciclo estral e ovariectomia não apresentaram efeitos diretos sobre a histologia e a capacidade do tendão calcâneo de resistir à tensão (Burgess et al., 2009; Circi et al., 2009). Ademais, Ganesan et al. (2008) demonstraram em modelo animal de artrite a importância e os efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes dos hormônios sexuais para a integridade da MEC, enquanto que a castração bem como a ovariectomia resulta em aumento da destruição da cartilagem por meio de efeitos diretos dos componentes da MEC e indiretos pela ativação das formas latentes de MMPs. Novos estudos devem ser conduzidos no intuito de compreender melhor o papel fisiológico e fisiopatológico dos hormônios sexuais no tecido conjuntivo.

Neste estudo não observamos a participação da MMP-9 no processo de remodelamento do tendão calcâneo. De fato, a presença e aumento da atividade da MMP-9 são geralmente associadas ao infiltrado inflamatório peritendinoso severo, proporcionado pelo exercício exaustivo de longa duração ou através da técnica de implantação do probe de microdiálise em humanos (Koskinen et al., 2004). Ademais, De Mello Malheiro et al. (2009) avaliaram o infiltrado inflamatório peritendinoso nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo de ratos após o salto vertical e corrida em esteira, observando ausência do infiltrado inflamatório e atividade da MMP-9. Dessa forma, acreditamos que o protocolo de treinamento resistido adotado não envolve processo inflamatório severo e intensidade suficiente para aumentar a atividade da MMP-9.

Os tendões possuem uma variedade de propriedades como resistência a forças de tensão e habilidade de modular sua composição após estímulos mecânicos (Vogel e Koob, 1989). Dessa forma, as duas regiões do tendão calcâneo exibem diferente padrão de ativação da MMP-2 em resposta ao exercício resistido agudo e crônico, independente do estado ovariano. Treinamento resistido agudo e crônico aumenta a atividade total da MMP-2 na região proximal do tendão calcâneo. Este resultado vai ao encontro aos achados de De Mello Malheiro et al. (2009) que demonstraram aumento da ativação da MMP-2 após salto vertical e corrida em esteira na região proximal do tendão calcâneo. Estes resultados sugerem que as cargas mecânicas induzem respostas adaptativas sendo protocolo dependentes.

Em ratas ovariectomizadas, a ativação da MMP-2 foi maior imediatamente após o exercício agudo nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo. Este aumento na ativação da MMP-2 indica aumento do “turnover” (Marqueti et al., 2008a), resultando em remodelamento tecidual como parte da resposta adaptativa ao treinamento resistido. Nós acreditávamos que o treinamento resistido crônico poderia em parte regular a atividade da MMP-2 na ausência dos hormônios ovarianos. De fato, após 12 semanas de TR em ratas ovariectomizadas, houve aumento da atividade da MMP-2 na região proximal, o que provavelmente indica um “turnover” alterado do colágeno devido à diminuição dos níveis de estrógeno. Excessivo aumento do “turnover” é associado com a presença de pequenas fibrilas, alta densidade de fibrilas e elevada proporção de pontes cruzadas imaturas no tendão (Hansen et al., 2009).

7. CONCLUSÃO

A ausência dos hormônios ovarianos aumenta a atividade da MMP-2, principalmente na região proximal, indicando diferenças no remodelamento tecidual em diferentes regiões de um mesmo tendão. Treinamento resistido agudo e crônico modulam especificamente a atividade da MMP-2 de acordo com a região do tendão calcâneo, independentemente do estado ovariano. O treinamento resistido crônico em animais ovariectomizados não foi capaz de regular a atividade total e forma ativa da MMP-2 no tendão calcâneo. Propomos informações adicionais no intuito de melhor compreender o papel da ovariectomia e treinamento resistido nas propriedades mecânicas, morfológicas e biomecânicas no tendão calcâneo.

8. REFERÊNCIAS

1. BARSALANI, R. *et al.* Liver of ovariectomized rats is resistant to resorption of lipids. **Physiol. Behav.**, vol. 95(1-2), p. 216-221, 2008.
2. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, vol. 72, p. 248-54, 1976.
3. BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol.**, vol. 7(5), p. 728-35, 1995.
4. BRYANT, A. L., *et al.* Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. **J. Appl. Physiol.**, vol. 105(4), p. 1035-43, 2008.
5. BURGESS, K. E.; PEARSON, S. J.; ONAMBÉLÉ, G. L. Menstrual cycle variations in oestradiol and progesterone have no impact on in vivo medial gastrocnemius tendon mechanical properties. **Clinical Biomechanics**, vol. 24, p. 504–509, 2009.
6. CARVALHO, H. F. *et al.* Structure and proteoglycan composition of specialized regions of the elastic tendon of the chicken wing. **Cell Tissue Res.** vol. 300(3), p. 435-46, 2000.
7. CIRCI, E. *et al.* Biomechanical and histological comparison of the influence of oestrogen deficient state on tendon healing potential in rats. **Int. Orthop.** vol, 33 (5), p. 1461-6, 2009.
8. COOK, J. L.; BASS, S. L.; BLACK, J. E. Hormone therapy is associated with smaller Achilles tendon diameter in active post-menopausal women. **Scand J Med Sci Sports.** vol.17(2), p. 128-32, 2007.

9. CORRIVEAU, P. *et al.* Resistance training prevents liver fat accumulation in ovariectomized rats. **Maturitas**. vol. 59(3), p. 259-267, 2008.
10. COVIZI, D. Z. *et al.* Regional adaptations in three rat tendons. **Tissue Cell**. vol. 33(5), p. 483-90, 2001.
11. DE MELLO MALHEIRO, O. C. *et al.* Calcaneal Tendon Regions Exhibit Different MMP-2 Activation After Vertical Jumping and Treadmill Running. **Anat Rec (Hoboken)**. vol. 292 (10), p. 1656-62, 2009.
12. GANESAN, K. *et al.* Estrogen and testosterone attenuate extracellular matrix loss in collagen-induced arthritis in rats. **Calcif. Tissue Int**. vol. 83(5), p. 354-64, 2008.
13. HANSEN, M. *et al.* Effect of estrogen on tendon collagen synthesis, tendon structural characteristics, and biomechanical properties in postmenopausal women. **J. Appl. Physiol**. vol. 106(4), p.1385-93, 2009.
14. HARWOOD, F. L.; AMIEL, D. Differential metabolic responses of periarticular ligaments and tendon to joint immobilization. **J. Appl. Physiol**. vol. 72 (5), p. 1687-91, 1992.
15. HEINEMEIER, K. M. *et al.* Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. **J. Physiol**. vol. 582 (Pt 3), p. 1303-16, 2007.
16. HORNBERGER, 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**. vol. 29(1), p. 16-31, 2004.

17. JAMES, H.; WANG, C. Mechanobiology of tendon. **Journal of Biomechanics**. vol. 39, p. 1563–1582, 2006.
18. KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner.** vol. 15(3), p. 175-91, 1991.
19. KER, R. F. The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** vol. 133(4), p. 987-1000, 2002.
20. KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev.** vol. 84(2), p. 649-98, 2004.
21. KOOB, T. J.; SUMMERS, A. P. Tendon--bridging the gap. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** vol. 133(4), p. 905-9, 2002.
22. KOSKINEN, S. O. A. *et al.* Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. **J. Appl. Physiol.** vol. 96, p. 861–864, 2004.
23. LANGBERG, H.; ROSENDAL, L.; KJAER, M. Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. **J. Physiol.** vol. 534, p. 297-302, 2001.
24. LEE, C. Y. *et al.* The combined regulation of estrogen and cyclic tension on fibroblast biosynthesis derived from anterior cruciate ligament. **Matrix Biol.** vol. 23, p. 323–329, 2004.

25. LEITE, R. D. *et al.* Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, heart, fat depots and lipid profile. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** vol. 34 (6), p. 1079-86, 2009.
26. MAGNUSSON, S. P.; HANSEN, P.; KJAER, M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. **Scand J Med Sci Sports.** vol. 13(4), p. 211-23, 2003.
27. MARQUETI, R. C. *et al.* Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. **Am. J. Sports Med.** vol. 34(8), p. 1274-80, 2006.
28. MARQUETI, R. C. *et al.* Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur. J. Appl. Physiol.** vol. 104(6), p. 1087-93, 2008a.
29. MARQUETI, R. C. *et al.* MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **Int. J. Sports Med.** vol. 29(7), p. 559-63, 2008b.
30. MCCORMICK, K. M. *et al.* Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. **J. Muscle Res. Cell Motil.** vol. 25, p.21–27, 2004.
31. MORAN, A. L. *et al.* Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. **J. Appl. Physiol.** vol. 102(4), p. 1387-93, 2007.
32. MORAN, A. L.; WARREN, G. L.; LOWE, D. A. Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. **J. Appl. Physiol.** vol. 100(2), p. 548-59, 2006.

33. MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Cell Biol.** vol. 16(5), p. 558-64, 2004.
34. PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** vol. 8(3), p. 221-33, 2007.
35. PIGHON, A. *et al.* Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? **Climacteric.** vol. 12, p. 1–12, 2009b.
36. PRESTES J. *et al.* Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** vol. 34(4), p. 700-6, 2009.
37. RILEY, G. Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications. **Expert Rev. Mol. Med.** vol. 7 (5), p. 1-25, 2005.
38. RISTELI, J.; RISTELI, L. Analysing connective tissue metabolites in human serum. Biochemical, physiological and methodological aspects. **J. Hepatol.** vol. 22(2 Suppl), p. 77-81, 1995.
39. RUFAL, A.; BENJAMIN, M.; RALPHS, JR. Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. **Anat Embryol (Berl).** vol. 186(6), p. 611-8, 1992.
40. SLAUTERBECK, J.; *et al.* Estrogen level alters the failure load of the rabbit anterior cruciate ligament. **J. Orthop. Res.** vol. 17, p. 405–408, 1999.
41. Toyoda, T. *et al.* Tensile load and the metabolism of anterior cruciate ligament cells. **Clin. Orthop.** vol. 353, p. 247– 255, 1998.

42. VOGEL, K. G.; KOOB, T. J. Structural specialization in tendons under compression.

Int. Rev. Cytol. vol. 115, p. 267-93, 1989.

43. YU, W. D. *et al.* Combined effects of estrogen and progesterone on the anterior

cruciate ligament. **Clin. Orthop.** vol. 383, p. 268- 281, 2001.

9. ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

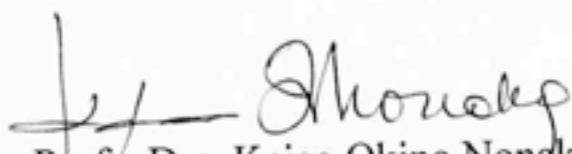
Parecer 050/2007

Protocolo nº. 048/2007

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 15ª. Reunião, concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa “Efeitos do Treinamento de Força sobre a Morfologia, Expressão Gênica e Sinalizadores do Músculo Esquelético de Ratas Ovariectomizadas”, elaborado por Sérgio Eduardo de Andrade Perez.

Conclusão: Projeto Aprovado

São Carlos, 22 de novembro de 2007.


Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

10. ANEXO B – ACEITE E ARTIGO NO PERIÓDICO *CONNECTIVE TISSUE RESEARCH* INTITULADO “THE EFFECT OF OVARECTOMY AND RESISTANCE TRAINING ON MMP-2 ACTIVITY IN RAT CALCANEAL TENDON”.

02-Feb-2010

Dear Dr. Pereira:

Ref: Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in rat calcaneal tendon

Our referees have now considered your revised manuscript. We are pleased to accept your paper in its current form. The manuscript will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting.

For your information the reviewer comments are included at the bottom of this letter. Given the circumstances, I do not see that additional speculative discussion of MMP-14 in the calcaneal tendon is necessary in this paper.

The forms for copyright transfer have been attached. Production on your manuscript cannot begin without a signed copyright agreement form. Please disregard if you have already included this form as a supplemental file.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for this interesting contribution to Connective Tissue Research. We look forward to receiving further submissions from your laboratory as your work proceeds.

Sincerely,

Arthur Veis

Editor in Chief, Connective Tissue Research

Connective Tissue Research, 2010.

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

ISSN: print / online

DOI:

The Effect of Ovariectomy and Resistance Training on MMP-2 Activity in Rat Calcaneal Tendon

Guilherme B. Pereira, Jonato Prestes, Richard D. Leite, Rodrigo F. Magosso, Fabiana S. Peixoto, Rita C. Marqueti, Gilberto E. Shiguemoto, Heloisa S. Selistre-de-Araújo, Vilmar Baldissera and Sérgio E. A. Perez.

Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos/SP, Brazil.

Tendons remodeling relies upon extracellular matrix restructuring by the matrix metalloproteinases (MMPs). The aim of this study was to investigate MMP-2 activity in different regions of the calcaneal tendon after resistance training in ovariectomized rats. Wistar adult female rats were grouped into: sedentary (Sed-Intact); ovariectomized sedentary (Sed-Ovx); acute exercise (AcuteEx-Intact); ovariectomized acute exercise (AcuteEx-Ovx); resistance trained (ChronicEx-Intact) and ovariectomized resistance trained (ChronicEx-Ovx) (n= 10 each group). The resistance training protocol required the animals to climb a 1.1-m vertical ladder with weights attached to their tail was used. The sessions were performed once every 3 days with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per scaling. The acute groups performed one session, and the chronic groups underwent a 12-week of resistance training. There was an increase in total MMP-2 activity in Sed-Ovx, AcuteEx-intact and

ChronicEx-intact compared with Sed-Intact in the proximal region of calcaneal tendon. AcuteEx-Ovx exhibited higher total MMP-2 than Sed-Ovx and AcuteEx-Intact in the distal region of calcaneal tendon. Chronic-Ovx presented lower total MMP-2 activity than Sed-Ovx and Chronic-Intact in the distal region of tendon. The active MMP-2 was higher for the AcuteEx-Ovx than Sed-Ovx and AcuteEx-Intact in proximal region of tendon. There was higher active MMP-2 in the distal region of tendon in the Acute-Ovx than Sed-Ovx and AcuteEx-Intact. Ovariectomy and resistance exercise modulate MMP-2 activity according to specific tendon region, indicating a differentiated tissue remodeling.

Keywords: Matrix Metalloproteinases, Ovarian Hormones, Calcaneal tendon, Exercise; Connective Tissue Remodeling.

INTRODUCTION

Menopause is a major event in a woman life that is associated with estrogen decrease. This

physiological modification is accompanied by a number of health issues, morphological and functional alterations in skeletal muscle and tendon related structures, and acceleration of bone loss [1,2]. Alterations in estrogen levels have been hypothesized to affect tendon structure and physiology [3]. In this sense, collagen concentration decreases after treatment with estrogen in rat tail tendons [4]. The long-term exposure to attenuated estrogen in users resulted in a decrease in calcaneal tendon strain in humans, which can be attributed to the effects of endogenous estrogen on collagen synthesis [5]. On the other hand, the tendons of females were found to be significantly stiffer in uniaxial tension than those from males [6]. The results from this study showed that collagen contents of tendon were associated with estrogen status, although the exact mechanisms underlying this remodeling process still remain unclear. In this context, experiments specially designed to study tendon remodeling and the pathways involved are necessary.

Tendons are specialized structures that transmit muscle forces to bone [5, 7] and tendon fibroblasts synthesizing and maintaining most the extracellular matrix (ECM) [9, 10]. The maintenance of matrix integrity involves the synthesis and degradation of ECM components including collagen, glycoproteins, glycosaminoglycans and proteoglycans [5]. Under normal conditions, matrix metalloproteinases (MMPs) are present in a latent form, which is activated for physiological tissue remodeling [11, 12]. Collagen degradation is started in the extracellular environment by MMPs, mostly MMP-2 and MMP-9 [13]. MMP-2 plays an essential role in collagen turnover in tendons [5,7]. However, more information regarding the influence of estrogen status on MMP-2 activity in tendon is necessary.

The composition of muscles and tendons varies according to several factors including stage of development, hormonal level and physical exercise [13]. The exercise has been used as important intervention to protect the organism against the deleterious effects of ovariectomy, such as fat depot, lipid profile, skeletal muscle dysfunction and alterations in the synthesis and structure of tendons [14, 15, 16]. Prestes et al. (2009) showed that a reduction in the levels of estrogen decreased MMP-2 activity in tibial anterior and extensor digitorum longus muscle, which may compromise muscle function [14]. Furthermore, we showed that rat muscle [16] and tendon [17, 18] remodeling might be impaired when androgenic anabolic steroids are administered with or without loading exercise, as a result of decreased MMP-2 activity. However, the effect of the status of ovarian hormones associated to exercise on MMP-2 activity in tendon remains unclear.

Interestingly, distinct regions of tendons respond with different alterations to mechanical loading [18]. In this context, the presence of cells and ECM components are not equally distributed in tendon regions [19, 20, 21]. Therefore, our initial hypothesis was that ovariectomy would decrease MMP-2 activity in tendon, while exercise could at least in part regulate this process. Thus, the aim of this study was to evaluate MMP-2 activity in the proximal and distal regions of the calcaneal tendon (CT) in rats after ovariectomy and resistance training (RT).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sixty female 13-week-old Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. *albinus*, Rodentia, Mammalia) from the breeding colony of the Federal University of São Carlos (UFSCar, Brazil), with an

initial weight of approximately 250±30g were used. The animals were kept in collective cages (5 rats per cage) and given water and chow ad libitum. The room temperature was kept constant at 23±2 °C, and had a 12 hours light: 12 hours dark cycle, with lights on from 06:00 to 18:00 hours. This research was approved by the Federal University of São Carlos Committee of Experimental Animals (protocol No. 048/2007). All animal procedures were conducted in accordance with the guide for care and use of laboratory animals (National Research Council, 1996).

Experimental groups

Sixty rats were randomly distributed into the following 6 experimental groups: sedentary (Sed-Intact); sedentary ovariectomized (Sed-Ovx); acute exercise (AcuteEx-Intact); acute exercise ovariectomized (AcuteEx-Ovx); trained (ChronicEx-Intact) and trained ovariectomized (ChronicEx-Ovx).

The sedentary intact and sedentary ovariectomized animals were kept in their cages for 3 months without any type of exercise. The Sed-Ovx animals had their ovaries removed.

After three months of normal cage activity, the acute exercise groups (AcuteEx-Intact and AcuteEx-Ovx) were adapted to resistance exercise (1 session), and their maximal loads were determined in another session. After this, they performed 1 acute resistance exercise session. The animals of the resistance training groups underwent the 12-week proposed protocol.

Ovariectomy

Ovariectomy was performed when the rats were 13 weeks old, according to the technique described by Kalu [22] ethyl ether was used as the

anesthetic. All animals were given 1 week of recovery after the surgical procedures.

Resistance exercise training

Climbing sessions were performed every third day. The adaptation and vertical ladder characteristics are described elsewhere [14]. The animals performed 8-12 dynamic movements per climb. The weight load was wrapped to the proximal portion of the tail with a self-adhesive foam strip.

Three days after familiarization, the first training session consisted of 4-8 ladder climbs with progressively heavier loads and with a 120s of rest interval between each one. The initial climb consisted of a load that was 75% of the animal's body mass. Then an additional 30g weight was added in each climb until the rat fail to climb the ladder completely. Failure was determined when the animal could not progress up the ladder after 3 successive tail flick. The highest load successfully carried through length of the ladder was considered to be the rat's maximal carrying capacity for that training session.

Training sessions consisted of 4 ladder climbs, with 50%, 75%, 90%, and 100% of their maximal carrying capacity, determined in the previous session. During subsequent ladder climbs an additional 30g load was added until a new maximal carrying capacity was determined, with the maximum of 5 additional climbs. This RT protocol was adapted from Hornerberg and Farrar [23].

Tissue preparation

After 12 weeks, the animals were decapitated after the last training session. The CT was immediately dissected from both posterior paws, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

The CT was divided into proximal and distal regions (Fig. 1).

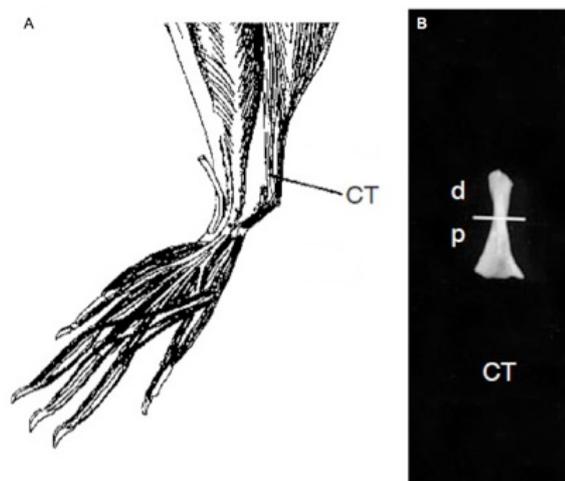


Figure 1. A - anatomical location of the calcaneal tendon (CT) of the rat hindlimb, as seen from the medial aspect. B - dissected CT with indicated corresponding regions. The CT was divided into proximal (p) and distal (d) regions. (Adapted from Covizi et al. 2001).

Gelatin zymography

The proximal and distal regions from five different animals per experimental group were homogenized and incubated in 0.5 ml of cacodilic extraction buffer at 4°C for 24 h as previously described for Marqueti et al. [20]. After this period, the solution was centrifuged (10 min, 13 000 g at 4°C). The extraction was made in triplicate with left tendons from the same five animals. Aliquots (10µg protein) from each extract were dried and resuspended in the same extraction buffer. After this procedure, the aliquots were subjected to electrophoresis in gelatin-containing SDS-10% polyacrylamide gels prepared with 1 mg/m of gelatin. After electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5% of Triton X-100 and incubated in substrate buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0; 5mM of CaCl₂ and 0.02% NaN₃) at 37°C for 20 h. Gels were stained with Coomassie brilliant blue and destained with acetic acid/methanol/water. Gelatinase activity was visualized in the stained gel. The averages of the band intensities were measured using the GeneTools software. Data are expressed as concentration of MMP-2 (i.e. the

totality of arbitrary units for the MMP-2 pro-enzyme, intermediate and active forms) and MMP-2 active form.

Statistical Analysis

All data are expressed as means ± standard deviation (SD). Statistical analysis was initially done with the normality Kolmogorov-Smirnov test and with the homocedasticity test (Bartlett criterion). All variables presented normal distribution and homocedasticity, so a 2-way analysis of variance (ANOVA) test was used, (taking into consideration 2 variables: resistance exercise x ovariectomy). The inter-group difference between CT proximal and distal region was analyzed with Student's *t*-test. When the difference presented was significant, Tukey's test was applied for multiple comparisons with an alpha level of 0.05.

Results

The major bands found in all groups were 72, 62 and 57 kDa which corresponds to the pro-, intermediate- and active- MMP-2, respectively. Western blotting assays suggested the activation of

MMP-2 as proposed by Birkedal-Hansen [24] (not shown). We found no MMP-9 activity in this study. The proteolytic activity of the proximal and distal regions of CT were analyzed by zymography on gelatin- SDS-PAGE gels (Fig. 2A, B).

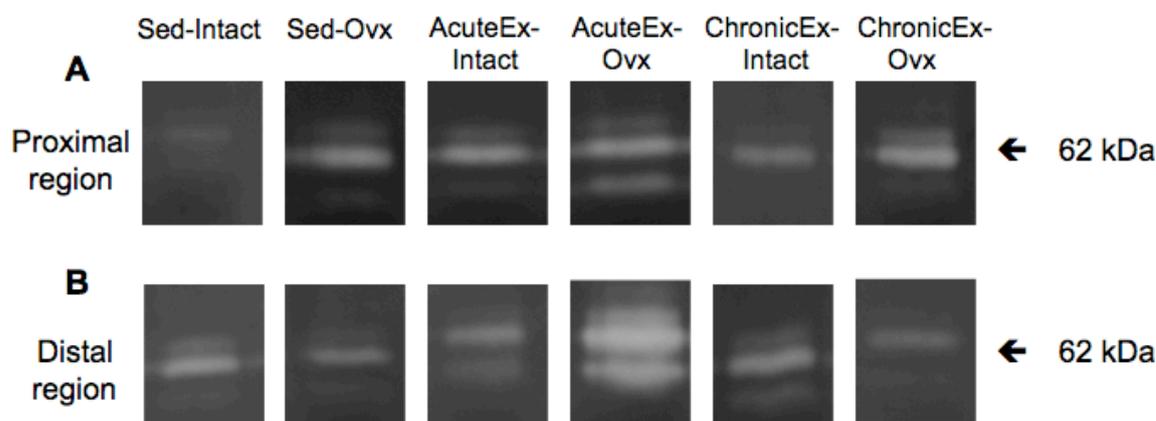


Figure 2. Analysis of MMP-2 activity in Calcaneal Tendon (CT) extracted by zymography in 1% gelatin-SDS-PAGE. Each lane represents a pool of samples ($n = 5$; 10 g of each pool) from different animal groups. Gels were analyzed by densitometry and activity was expressed in arbitrary units. Sedentary (Sed-Intact); sedentary ovariectomized (Sed-Ovx); acute exercise (AcuteEx-Intact); acute exercise ovariectomized (AcuteEx-Ovx); trained (ChronicEx-Intact); trained ovariectomized (ChronicEx-Ovx).

Total MMP-2 and active form – comparison between regions of the calcaneal tendon

In Sed-Intact the proximal region of CT presented lower total MMP-2 activity than the distal region ($p=0.001$; Fig. 3A). In contrast, the Sed-Ovx presented higher total MMP-2 activity in

the proximal region than the distal region ($p=0.001$). Sed-Intact and Sed-Ovx groups demonstrated no statistically significant difference between regions in the active form of MMP-2 (Fig. 3B).

MMP-2 in calcaneal tendon of sedentary rats

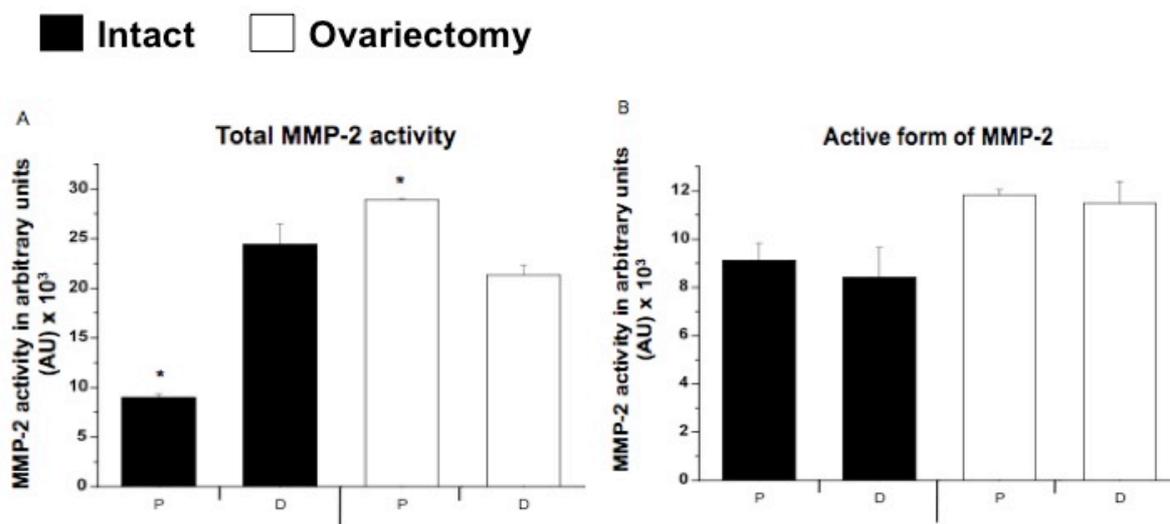


Figure 3. A - Total MMP-2 activity in the proximal (P) and distal (D) regions of calcaneal tendon (CT) in sedentary (Sed-Intact) and sedentary ovariectomized group (Sed-Ovx) determined by zymography. Total MMP-2 activity was determined by summing up the integrated optical density obtained (expressed in arbitrary units) for the three bands (pro-MMP-2, intermediate and active form). B - Variation in the active form of MMP-2 as measured by integrated optical density of the active band (62 kDa) in the proximal (P) and distal (D) regions of CT in Sed-Intact and Sed-Ovx groups. Values are presented in mean \pm SD, $p \leq 0.05$. *Significant intra-group differences, analysis between proximal and distal regions of CT.

Effects of resistance training and ovarian status on total MMP-2 and active form of CT regions

There was a significant increase in total MMP-2 activity in Sed-Ovx ($p=0.001$), AcuteEx-Intact ($p=0.001$) and ChronicEx-Intact ($p=0.004$) compared with Sed-Intact in the proximal region of CT. Additionally, AcuteEx-Ovx ($p=0.007$) and ChronicEx-Ovx ($p=0.001$) exhibited higher total MMP-2 activity in the proximal region of CT than Sed-Ovx. There was a significant interaction

between groups, showing higher total MMP-2 activity in AcuteEx-Ovx ($p=0.003$) than AcuteEx-Intact, and in ChronicEx-Ovx ($p=0.001$) than ChronicEx-Intact (Fig. 4A).

AcuteEx-Ovx exhibited higher total MMP-2 than Sed-Ovx ($p=0.001$) and AcuteEx-Intact ($p=0.003$) in the distal region of CT (Fig. 4B). Furthermore, ChronicEx-Ovx presented lower total MMP-2 activity than Sed-Ovx ($p=0.004$) and ChronicEx-Intact ($p=0.001$) in the distal region of CT (Fig. 4B).

Total MMP-2 activity in calcaneal tendon

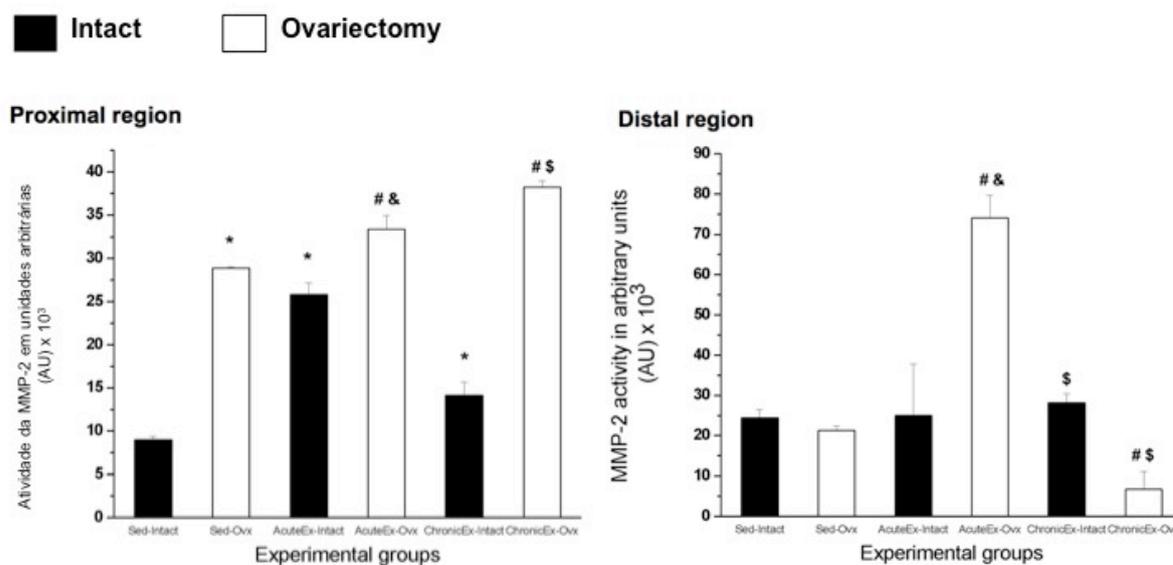


Figure 4. Total MMP-2 activity in the proximal and distal regions of calcaneal tendon (CT) determined by zymography. Total MMP-2 activity was determined by summing up the integrated optical density obtained (expressed in arbitrary units) for the three bands (pro-MMP-2, intermediate and active form). Values are presented in mean \pm SD, $p \leq 0.05$. *Significant difference from Sed-Intact; #Different from Sed-Ovx; &Different from AcuteEx-Intact; \$Different from ChronicEx-Intact. Sedentary (Sed-Intact); sedentary ovariectomized (Sed-Ovx); acute exercise (AcuteEx-Intact); acute exercise ovariectomized (AcuteEx-Ovx); trained (ChronicEx-Intact); trained ovariectomized (ChronicEx-Ovx).

Active form of MMP-2 increased only in the proximal region of CT in Sed-Ovx compared with Sed-Intact ($p=0.003$; Fig. 5A). There was a significant interaction between groups for the active MMP-2 in the proximal region of CT, showing that AcuteEx-Ovx presented higher values than Sed-Ovx ($p=0.001$) and AcuteEx-Intact ($p=0.001$) (Fig. 5A). ChronicEx-Ovx also presented significant higher values of MMP-2 active form in the proximal region of CT than ChronicEx-Intact ($p=0.001$; Fig. 5A).

There was a significant interaction between groups for the active form of MMP-2 in

the distal region of CT, showing that active MMP-2 changed differently, depending on the ovarian hormones. Active MMP-2 increased in Sed-Ovx ($p=0.025$), Acute-Intact ($p=0.041$) and ChronicEx-Intact ($p=0.017$) compared with Sed-Intact (Fig. 5B). There was higher amount of active MMP-2 in the distal region of CT in the AcuteEx-Ovx than Sed-Ovx ($p=0.001$) and AcuteEx-Intact ($p=0.001$) (Fig. 5B). On the other hand, ChronicEx-Ovx presented significant lower values of active MMP-2 in the distal region of CT than Sed-Ovx ($p=0.010$) and ChronicEx-Intact ($p=0.008$) (Fig. 5B).

Active form of MMP-2 in calcaneal tendon

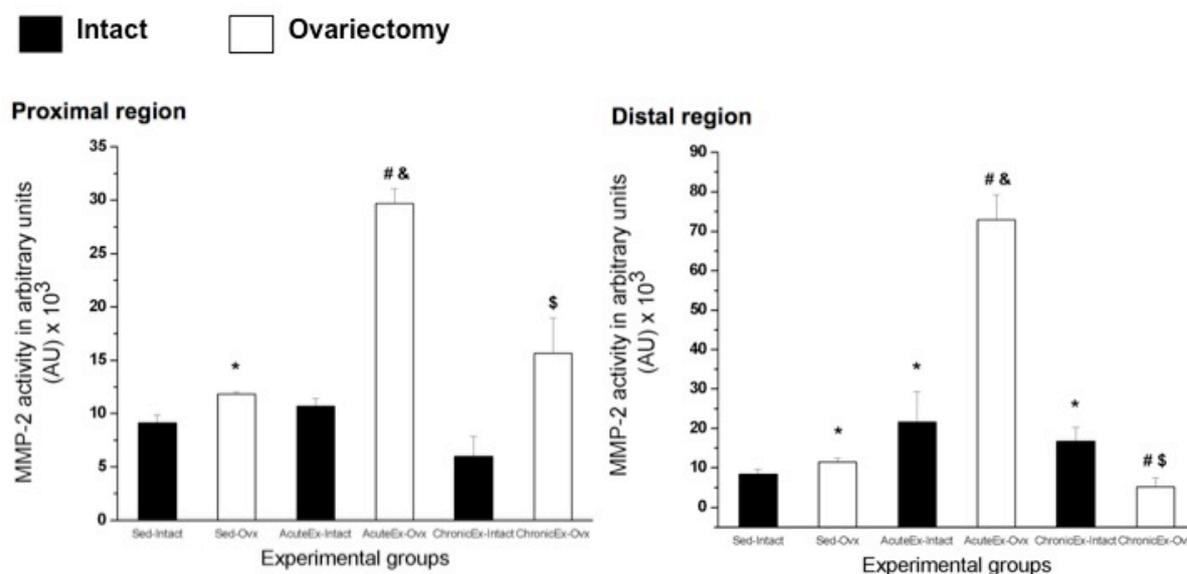


Figure 5. MMP-2 active form measured by integrated optical density of the active band (62 kDa) in the proximal and distal regions of calcaneal tendon determined by zymography and integrated optical density. Values are presented in mean \pm SD, $p \leq 0.05$. *Significant difference from Sed-Intact; #Different from Sed-Ovx; &Different from AcuteEx-Intact; \$ Different from ChronicEx-Intact. Sedentary (Sed-Intact); sedentary ovariectomized (Sed-Ovx); acute exercise (AcuteEx-Intact); acute exercise ovariectomized (AcuteEx-Ovx); trained (ChronicEx-Intact); trained ovariectomized (ChronicEx-Ovx).

DISCUSSION

The novel finding of the present study is that ovarian hormones modulate differently MMP-2 activity in proximal and distal region of CT. We have showed that proximal and distal regions of CT present different total MMP-2 activity, but not in the active form of MMP-2. Interestingly, ovariectomy increased total MMP-2 activity only in the proximal region. Moreover, ovariectomy increases the active form of MMP-2 in both regions of CT, indicating a crucial role of ovarian hormones in maintaining homeostasis of connective tissue. Another important finding was that both acute and chronic RT promote sufficient local stimuli to increase total and active MMP-2. Proximal region of CT seems to be more sensitive than the distal region to both acute and chronic RT due to greater

increase in MMP-2 activity, even in the ovariectomy condition.

Distal and proximal regions of CT were evaluated in other studies, and were showed to be different in morphology and overall structure [7, 19, 20]. Surprisingly, irrespective of ovarian status, sedentary animals presented differences on total MMP-2 activity between regions of CT. In other studies with sedentary male rats, there was a similar activity profile for both tendon regions, with similar activities of pro- and intermediate forms of MMP-2 [21, 25]. These findings indicate that physiological differences related with gender modulate activity of MMP-2 in different regions of CT. In fact, differences related with gender has been showed in human tendon, indicating that females present a lower basal rate of tendon collagen synthesis compared with males [26]. Moreover, Brian et al. [26] showed that the tendons of females receiving

oral contraceptives have a thicker tendon fibril diameter, which increases the amounts of intrafibrillar cross bindings and thus will result in an increased stiffness of the tendon. Furthermore, the long-term exposure to hormonal changes alters the tissue structure and function, whereas short-term variations do not. This suggests that sex hormones could exert a regulatory role in collagen turnover of tendon, once collagen is the dominant connective tissue protein [27].

It is possible that the difference in MMP-2 activity between tendon regions is related with the cell types and quantity, extracellular matrix composition, and mechanical loading properties [20, 25, 28, 29]. Proximal region is richer in aligned collagen and elastic fibers, and poorer in glycosaminoglycans than distal region of CT [20]. Considering that collagen degradation is partially regulated by MMP-2, also known as type IV collagenase of 72 kDa that can be processed into an active form of 62 kDa, this would explain the higher activity observed in the proximal region of CT [11, 28].

Regarding the activation of MMPs, their latent form can gain catalytic activity through the modification of the free thiol by physiological (oxidants, disulfides, electrophiles) or non-physiological compounds (alkylating agents, heavy metal ions), induced by allosteric perturbation of zymogen and direct cleavage of the prodomain by another proteinase [30]. The most important proteolytic activation mechanism of proMMP-2 is the cleavage by the cooperative action of MMP-14 and TIMP-2 at the cell surface [31, 32, 33]. Moreover, the activation of proMMP-2 in fibroblasts is not strongly affected by deficiency of MMP-14 [33, 34], suggesting that other mechanics, such as membrane-type MMPs and urokinase, may be involved in proteolytic activation of MMP-2. Further investigations related to the mechanics of

activation of MMP-2 and the participation of MMP-14 on regions of tendon are necessary.

In this study we did not observe the participation of the MMP-9 in the remodeling process of CT. In fact, the presence and increase of the activity of the MMP-9 is generally associated with the peritendinous inflammatory infiltrated as a consequence of the exhaustive long duration exercise or by the technique of implantation of a probe for microdialysis [35]. In addition, De Mello Malheiro et al. [25] found no inflammation and activity of MMP-9 in the proximal and distal regions of CT after vertical jumping and treadmill running. In this sense, we believe that the protocol of resistance training adopted was not sufficiently intense to increase the activity of the MMP-9.

Tendons display a variety of properties such as resistance to tensile strength and the ability to modulate its composition after mechanical loading [13]. Thus, the two regions of CT exhibit different pattern of MMP-2 activation in response to acute and chronic resistance exercise, irrespective of ovarian status. Acute and chronic resistance training increases total MMP-2 activity in the proximal region of CT. This result in accordance with the findings of De Mello Malheiro et al. [25] that showed increased MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running on CT proximal region. However, the treadmill running at low intensity induced a high level of MMP-2 activation, mainly in the distal region of CT. These results suggest that mechanical loading produced by physical training induces adaptive responses dependent of the exercise protocol.

In ovariectomized rats, MMP-2 activity was higher immediately after the acute exercise in the proximal and distal regions of CT. The increase in MMP-2 activity indicates an increased turnover [18], resulting in tissue remodeling as part of the adaptive response to resistance training. We

believed that chronic resistance training could at least in part regulate MMP-2 activity in the absence of ovarian hormones. In fact, after 12-week RT in ovariectomized rats, there was an increase in MMP-2 activity in the proximal region of CT, which probably indicating an altered collagen turnover. Excessive increase in turnover is associated to the presence of smaller fibrils, higher fibril density, and relatively higher proportion of immature cross links in tendons [16, 36]. However, it remains unclear if this response is beneficial for tendon health. In this sense, ovariectomy had no direct effect on CT mechanical properties [37]. Furthermore, understanding the physiological and pathological role of sex hormones is of considerable importance to establish the basis of diseases in connective tissues. In addition, Ganesan et al. [38] showed the influence of sex hormones on anti-inflammatory and antioxidant state of the matrix connective tissue, where castration as well as ovariectomy resulted in enhanced cartilage destruction through direct degradative effect on matrix components or an indirect action via activation of latent MMPs in an arthritis model. Further studies should be conducted to evaluate the regulatory role of MMP-2 and exercise on tendon.

In summary, the absence of ovarian hormones alters MMP-2 activity, mainly in the proximal region, indicating a differentiated tissue remodeling. RT also modulates MMP-2 activity according to specific tendon region, irrespective of ovarian status. We propose additional information in order to understand the role of ovariectomy and RT on the remodeling and morphological properties in different regions of tendons.

Acknowledgements

The financial support was provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by the Laboratório de

Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

REFERENCES

1. Moran AL, Nelson SA, Landisch RM, Warren GL, Lowe DA. (2007) Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol.* 102(4):1387-93.
2. Moran AL, Warren GL, Lowe DA. (2006) Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *J Appl Physiol.* 100(2):548-59.
3. Cook JL, Bass SL, Black JE. (2007) Hormone therapy is associated with smaller Achilles tendon diameter in active post-menopausal women. *Scand J Med Sci Sports.* 17(2):128-32.
4. Fischer GM. (1973) Comparison of collagen dynamics in different tissues under the influence of estradiol. *Endocrinology* 93(5):1216–1218.
5. Bryant AL, Clark RA, Bartold S, Murphy A, Bennell KL, Hohmann E, Marshall-Gradisnik S, Payne C, Crossley KM. (2008) Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. *J Appl Physiol* 105(4):1035–1043.
6. Goldstein SA, Armstrong TJ, Chaffin DB, Matthews LS. (1987) Analysis of cumulative strain in tendons and tendon sheaths. *J Biomech* 20(1):1–6.
7. Carvalho HF, Felisbino SL, Covizi DZ, Della Colleta HH, Gomes L. (2000) Structure and proteoglycan composition of specialized regions of the elastic tendon of the chicken wing. *Cell Tissue Res.* 300(3):435-46.
8. Ker RF. (2002) The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 133(4):987-1000.

9. Koob TJ, Summers AP. (2002) Tendon--bridging the gap. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 133(4):905-9.
10. Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M. (2003) Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports.* 13(4):211-23.
11. Mott JD, Werb Z. (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 16(5):558-64.
12. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(3):221-33.
13. Kjaer M. (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 84(2):649-98.
14. Prestes J, Marqueti RC, Shiguemoto GE, Leite RD, Pereira GB, Selistre-de-Araújo HS, Baldissera V, Perez SEA. (2009) Effects of ovariectomy and resistance training on MMP-2 activity in skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34(4).
15. Leite RD, Prestes J, Bernardes CF, Shiguemoto GE, Pereira GB, Duarte JO, Domingos MM, Baldissera V, Perez SEA. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, heart, fat depots and lipid profile. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* [Epub ahead of print].
16. Marqueti RC, Prestes J, Stotzer US, Paschoal M, Leite RD, Perez SE, Selistre de Araujo HS. (2008) MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 29(7):559-63.
17. Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SE, Selistre-de-Araujo HS. (2006) 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(8):1274-80.
18. Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF, Selistre de Araujo HS. (2008) Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol.* 104(6):1087-93.
19. Vogel KG, Koob TJ. (1989) Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol.* 115:267-93.
20. Covizi DZ, Felisbino SL, Gomes L, Pimentel ER, Carvalho HF. (2001) Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cell.* 33(5):483-90.
21. Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF, Selistre de Araujo HS. (2008) Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol.* 104(6):1087-93.
22. Kalu DN. (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 15(3):175-91.
23. Hornberger TA, Jr., Farrar RP. (2004) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 29(1):16-31.
24. Birkedal-Hansen H. (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 7(5):728-35.
25. De Mello Malheiro OC, Giacomini CT, Justulin LA Jr, Delella FK, Dal-Pai-Silva M, Felisbino SL. (2009) Calcaneal Tendon Regions Exhibit Different MMP-2 Activation After Vertical Jumping and Treadmill Running. *Anat Rec (Hoboken).* [Epub ahead of print]
26. Bryant AL, Clark RA, Batold S, Murphy A, Bennell KL, Hohmann E, Marshall-Gradisnik S, Payne G, Crossley KM. (2008) Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. *J Appl Physiol.* 105(4):1035-43
27. Risteli J, Risteli L. (1995) Analysing connective tissue metabolites in human serum. Biochemical, physiological and methodological aspects. *J Hepatol.* 22(2 Suppl):77-81.
28. Riley GP. (2005) Gene expression and matrix turnover in overused and damaged

- tendons. *Scand J Med Sci Sports*. 15(4):241-51.
29. Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR. (1992) Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. *Anat Embryol (Berl)*. 186(6):611-8.
 30. Xiaoyun F, Parks WC., Heinecke JW. (2008) Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19; 2–13.
 31. Caterina JJ, Yamada S, Caterina NC, Longenecker G, Holmback K, Shi J, et al. (2000) Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *J Biol Chem*; 275:26416–22.
 32. Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, et al. (2000) Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*; 275:12080–9.
 33. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. (2000) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem*; 275:26411–5.
 34. Ruangpanit N, Price JT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Guenzler V, Huang X, et al. (2002) MT1-MMP-dependent and -independent regulation of gelatinase A activation in long-term, ascorbate-treated fibroblast cultures: regulation by fibrillar collagen. *Exp Cell Res*; 272:109–18.
 35. Koskinen SO, Heinemeier KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M. (2004) Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Physiol*. 96(3):861-4.
 36. Hansen M, Kongsgaard M, Holm L, Skovgaard D, Magnusson SP, Qvortrup K, Larsen JO, Aagaard P, Dahl M, Serup A, Frystyk J, Flyvbjerg A, Langberg H, Kjaer M. (2009) Effect of estrogen on tendon collagen synthesis, tendon structural characteristics, and biomechanical properties in postmenopausal women. *J Appl Physiol*. 106(4):1385-93.
 37. Circi E, Akpınar S, Balcık C, Bacanlı D, Guven G, Akgun RC, Tuncay IC. (2009) Biomechanical and histological comparison of the influence of oestrogen deficient state on tendon healing potential in rats. *Int Orthop*. [Epub ahead of print]
 38. Ganesan K, Tiwari M, Balachandran C, Manohar BM, Puvanakrishnan R. (2008) Estrogen and testosterone attenuate extracellular matrix loss in collagen-induced arthritis in rats. *Calcif Tissue Int*. 83(5):354