

**ANÁLISES PROTEÔMICAS DO TENDÃO CALCÂNEO SOB EFEITO DO  
ENVELHECIMENTO E TREINAMENTO DE FORÇA**

**Fabício Reichert Barin**

**Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan**

**Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde  
Faculdade de Ceilândia  
Universidade de Brasília**

**ANÁLISES PROTEÔMICAS DO TENDÃO CALCÂNEO SOB EFEITO DO  
ENVELHECIMENTO E TREINAMENTO DE FORÇA**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde  
da Universidade de Brasília, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre.**

**Brasília, 2015**

## **AGRADECIMENTOS**

### **A minha amada família;**

pelo amor, apoio e confiança que sempre recebo. Pela educação que me foi dada. Vocês são a minha maior inspiração, meu maior exemplo de honestidade, humildade e carinho. Suporto toda essa saudade do dia a dia, para lutar por um futuro que orgulhe a todos vocês.

### **Aos mestres;**

em especial, à Profa. Dra. Rita Marquetti Durigan, pelos ensinamentos diários, pela confiança e amizade depositadas em mim e pelo grande crescimento em nível pessoal e profissional que me foi proporcionado.

Ao prof. Dr. João Luiz Quagliotti Durigan, pelos inúmeros saberes e contribuições acrescentados neste estudo.

Ao prof. Dr. Octavio Luiz Franco, pela confiança em me proporcionar a oportunidade de crescer cientificamente em seu laboratório de pesquisas.

Ao prof. Dr. Ludovico Migliolo, pela amizade, por sua grande disposição e esforço em buscar soluções para todas as minhas dúvidas e dificuldades.

Ao prof. Dr. Jeaser Alves de Almeida, por todo o conhecimento que me foi transmitido quanto aos estudos proteômicos.

### **Ao meu grupo de pesquisa GPlast;**

pela força e companheirismo, pelas inúmeras reflexões e aprendizagens em cada reunião.

### **Aos amigos de laboratório;**

em especial, a dois companheiros de vida, Manoel Benício e Marcia Carvalho, pela convivência diária, pela paciência, pelos ensinamentos e por todo o companheirismo de sempre. Ao grande amigo Kleber de Sousa, pela imensurável ajuda na realização desta pesquisa. Agradeço, de coração, a todos os amigos de laboratório, todos sabem do valor e da contribuição para a execução desta jornada.

### **Aos amigos de infância;**

pelo apoio, força e amizade que, mesmo de longe, sempre me foi transmitida.

### **Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);**

pelo apoio financeiro que me proporcionou dedicação integral ao Programa de Mestrado da Universidade de Brasília.

## RESUMO

O envelhecimento é descrito como um processo complexo, multifatorial, caracterizado pelo acúmulo de alterações deletérias nas células e tecidos, atuando negativamente na homeostase dos sistemas. Nessa perspectiva, o treinamento de força (TF) possui grande relevância clínica por se tratar de um mecanismo capaz de minimizar essas alterações inerentes ao envelhecimento. Porém, a base biológica e molecular desse contexto (envelhecimento e ações do treinamento de força - TF) no tecido tendíneo, ainda é pouco compreendida. **Objetivo:** identificar e caracterizar a distribuição das proteínas do tendão calcâneo (TC) de ratos e elucidar as suas funções para o melhor entendimento do processo de envelhecimento e do TF. **Materiais e Métodos:** foram utilizados 24 *Rattus Wistar Novergicus Albinos*, de 4 e 24 meses, divididos em quatro grupos experimentais: jovens (6), treinado jovem (6), senil (6) e treinado senil (6). O treinamento de força de 12 semanas foi realizado uma vez a cada dois dias. Primeiramente, os ratos foram adaptados ao protocolo de treinamento de força para escalarem uma escada vertical, com pesos presos as suas caudas, realizando de 8 a 12 movimentos por escalada. As sessões de treinamento consistiram de quatro escaladas na escada, com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do rato, determinada na sessão anterior. Posteriormente, os TC foram retirados e analisados por meio da técnica proteômica LC-ESI-MS/MS. **Resultados:** foi identificado um total de 29 proteínas nos quatro grupos analisados. Do total, 12 foram comuns a mais de um grupo, e o restante (17 proteínas) foi classificado como diferencial em seus respectivos grupos. Sete dessas proteínas (COMP, COL1A1, COL1A2, CAIII, FAPB3, GSN, S100A6 e Tf) demonstraram níveis de intensidade diminuídos em função do envelhecimento; oito (COMP, COL1A1, DNAAF1, FAPB3, GSN, S100A6, ALB e Tf) tiveram regulações positivas com o protocolo de TF e, em duas (COMP e DNAAF1), foi possível observar a ação do TF diretamente no tendão senil. **Conclusão:** neste estudo, foi observada uma diminuição na intensidade de proteínas ligadas a diversos aspectos (estruturais e celulares) do tecido tendíneo com o envelhecimento e notificada a capacidade do TF em modular, positivamente, proteínas com baixos níveis durante a senilidade, sendo ainda mais efetivo na regulação proteica durante a jovialidade.

**Palavras Chaves:** Tendão calcâneo (TC), Envelhecimento, Treinamento de força (TF), Análise proteômica.

## ABSTRACT

Aging is described as a multifactorial complex process, characterized by the accumulation of deleterious alterations in cells and tissues, therefore, acting negatively in the systems homeostasis. In this perspective, strength training (ST) is of great clinical importance for elderly people since it is able to minimize these inherent age-related changes. However, the biological and molecular basis of such a context (aging and strength training actions - ST) in the tendon, is still poorly understood. **Objectives:** To identify and characterize the distribution of Achilles tendon (AT) proteins in rats as well as explain their functions for a better understanding of the aging process and ST. **Materials and Methods:** 24 *Wistar norvegicus albinos Rattus* were used, aged 4 and 24 months, and divided into four experimental groups: young rats (6), young trained rats (6), senile rats (6) and senile trained rats (6). A 12-week ST was conducted once every two days. Initially, the rats were adapted to the strength training protocol, which required them to climb a vertical ladder with weights attached to their tails, making them perform from 8 to 12 movements per climb. The training sessions consisted of four ladder climbs with 65, 85, 95, and 100% of the rat's maximal carrying capacity, as determined in the previous session. Afterwards, the AT were removed and analyzed by using the following proteomics technique LC-MS / MS. **Results:** a total of 29 proteins were identified in the four groups analyzed. Among them, 12 were common to more than one group, and 17 were classified as being divergent from their own groups. Seven of those proteins (COMP, COL1A1, COL1A2, CAIII, FAPB3, GSN, S100A6 and Tf) showed decreased intensity levels as a result of aging; eight of them (COMP, COL1A1, DNAAF1, FAPB3, GSN, S100A6, ALB and Tf) had positive settings with the ST protocol and, finally, in two of them (COMP and DNAAF1) was possible to observe the ST action right in the senile tendon. **Conclusion:** In this study, we demonstrated that both aging and ST cause proteomic changes in the AT. As expected, it was observed a decrease in the intensity of proteins related to different aspects (structural as well as cellular) of the tendon tissue as a consequence of aging. In addition, it was noticed the ST ability to positively modulate low-leveled proteins during senility, becoming even more effective in the regulation of protein levels during joviality.

**Keywords:** Achilles tendon, Aging, Strength training, Proteomic analysis.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO E APRESENTAÇÃO:

Figura 1: Molécula de tropocolágeno composta por três cadeias polipeptídicas.

Figura 2: Organização hierárquica do tendão.

Fig. 3: Exemplos de géis 1D cujos resultados não foram satisfatórios.

Fig. 4: Gel 1D de melhor resultado.

Fig. 5: Exemplos de géis 2D cujos resultados não foram satisfatórios.

Fig 6: Exemplo de géis 2D corados com nitrato de prata.

Fig 7: Gel 2D de melhor resultado.

Fig 8: Últimas metodologias testadas para análise via LC – MS/MS.

### ARTIGO:

Figura I: Escada para treinamento de resistência.

Figura II: *Design* experimental. Ilustração esquemática da sequência metodológica seguida no estudo.

Figura III: Diagrama de Veens.

Figura IV: Efeito do Envelhecimento e do TF na proteômica do TC.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TF – Treinamento de força  
TC – Tendão Calcâneo  
MEC – Matriz extracelular  
GAGs – Glicosaminoglicanos  
COMP – Proteína oligomérica da matriz da cartilagem  
MMPs - Metaloproteinases de matriz  
TIMPs - Inibidores teciduais de metaloproteinases  
TGF-  $\beta_1$  - Fator de crescimento de transformação -  $\beta_1$   
2-DE - Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional  
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência  
MS - Espectrômetro de Massas  
BCA – Pierce *BCA Protein Assay Kit*  
TCA - Ácido Tricloroacético  
IPEA - Instituto de Pesquisa Aplicada  
LC – MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas  
J – Grupo jovem  
TJ – Grupo treinado jovem  
S – Grupo senil  
TS – Grupo treinado senil  
COL1A1 – Proteína colágeno tipo I cadeia alfa I  
COL1A2 – Proteína colágeno tipo 2 cadeia alfa 2  
DNAAF1 – Proteína dineína axonemal fator-1  
CAIII - Proteína anidrase carbônica III  
FAPB4 - Proteína carreadora de ácidos graxos dos adipócitos  
FAPB4 - Proteína carreadora de ácidos graxos do coração  
GSN – Proteína gelsolina  
PVALB – Proteína parvalbumina alfa  
S100A6 – Proteína S-100-A6  
Tf – Proteína serotranferrina  
ALB – Proteína albumina sérica  
 $\beta$ -enolase – Beta enolase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Morfologia Tendínea .....	1
1.1.1 Tendão Calcâneo .....	5
1.2 Aspectos inerentes ao envelhecimento e ao tendão .....	5
1.3 Treinamento de Força (TF) no tecido tendíneo .....	8
1.4 A proteômica como método de análise molecular do tendão .....	10
<b>2. APRESENTAÇÃO DAS ATIVIDADES ENVOLVIDAS E DIFICULDADES ENCONTRADAS DURANTE A EXECUÇÃO DO ESTUDO</b> .....	13
<b>3. OBJETIVO</b> .....	18
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	19
4.1 Resumo .....	20
4.2 Introdução .....	21
4.3 Materiais e Métodos.....	22
4.3 Resultados .....	29
4.4 Discussão .....	34
4.5 Conclusão.....	41
4.6 Referências.....	41
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50
<b>6. ANEXOS</b> .....	66

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Morfologia Tendínea

Anatomicamente, os tendões estão localizados na origem/inserção dos músculos ou, ainda, nas interseções tendinosas dentro de músculos. Podem estar acoplados a ossos, cápsulas articulares, cartilagens e septos intramusculares, tendo o papel de dissipar as forças de tração produzidas pelos músculos para a unidade subsequente, determinando, dessa forma, o grau de movimento articular produzido (Wang, 2006; Benjamin *et al.*, 2008). Quando saudáveis, apresentam coloração branca, em função da presença de zonas hipovascularizadas e textura fibroelástica, caracterizando a resistência a tensões mecânicas desse tecido (Riley, 2004).

Em relação a sua composição, por se tratar de um tecido conjuntivo, a divisão acontece entre as células e a matriz extracelular (MEC) (Riley *et al.*, 1994; Wang, 2006). A MEC tendínea é formada aproximadamente por 70% de água, com boa parte associada aos glicosaminoglicanos (GAGs), além de proteoglicanos, glicoproteínas de adesão, proteínas não colagenosas e proteínas fibrosas (colágeno e elastina) (Riley *et al.*, 1994; Wang, 2006).

Os feixes altamente organizados de colágeno representam 60-85% do peso seco do tendão, em que 90% são do tipo I e o restante dividido entre o tipo III (0-10%), IV (2%), V e VI (Kjaer, 2004; Benjamin *et al.*, 2008).

A formação do colágeno se dá por meio do tropocolágeno, três cadeias peptídicas helicoidais e espiralada. A grande quantidade de ligações cruzadas, existente na sua molécula, torna essa estrutura altamente resistente a forças de tensões (figura 1) (Rich e Crick, 1961).

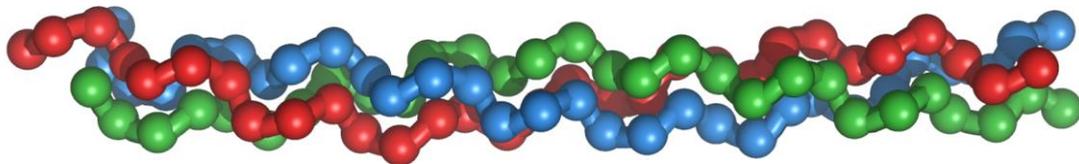


Figura 1: Molécula de tropocolágeno, composta por três cadeias polipeptídicas (Adaptado de (Gautieri *et al.*, 2009)).

As moléculas de colágeno tipo I são geralmente heterotriméricas, compostas por duas cadeias polipeptídicas  $\alpha 1$  e uma cadeia polipeptídica  $\alpha 2$ , entrelaçadas em uma tripla-hélice, como citado anteriormente. Estudos vêm demonstrando que a cadeia  $\alpha 2$  é a mais hidrofóbica, desempenhando, assim, um papel de estabilização dessa molécula (Miles *et al.*, 2002).

O colágeno do tipo III (segundo tipo mais encontrado) está localizado principalmente no epitendão e endotendão. Autores evidenciam que sua proporção se altera em condições de inflamação e cicatrização (Bailey *et al.*, 1975). Dentre suas funções, a formação de fibrilas heterotípicas de colágeno tipo I e V e o controle do diâmetro fibrilar destacam-se (Wang, 2006). Já o colágeno do tipo IV é encontrado basicamente na membrana basal, onde é considerado o principal componente estrutural. Dessa forma, não contribui para as características mecânicas do tendão (Tanjore e Kalluri, 2006).

Uma pequena quantidade de elastina (2%) ainda contempla a composição do tecido tendíneo. Essa baixa proporção está ligada diretamente ao aspecto quase inelástico do tendão, sendo que sua distensão varia entre 8-10% antes de atingir o ponto de ruptura total. Esse aspecto é extremamente importante, para que a função de dissipar força, realizada pelo tendão, seja eficiente (Kjaer, 2004; Benjamin *et al.*, 2008).

O arranjo tendíneo é considerado uma estrutura altamente organizada de forma hierárquica (Kjaer, 2004). As moléculas de tropocolágeno são organizadas e agrupadas em microfibrilas e, posteriormente, em fibrilas. Esses feixes primários unem-se para a formação dos fascículos (menores unidades funcionais do tendão). Abrangendo os fascículos, encontra-se o endotendão, uma camada de tecido conjuntivo, com estruturas nervosas, vasculares e linfáticas. Agrupando os endotendões de forma organizacional, encontra-se o epitendão, camada responsável por envolver o tendão propriamente dito. Por fim, chegamos ao paratendão, camada mais vascularizada, que pode se tornar uma camada dupla, preenchida por líquido sinovial (produzido pela membrana sinovial) em tendões sujeitos à fricção (figura 2) (Kannus, 2000; O'brien, 2005; Sharma e Maffulli, 2005).

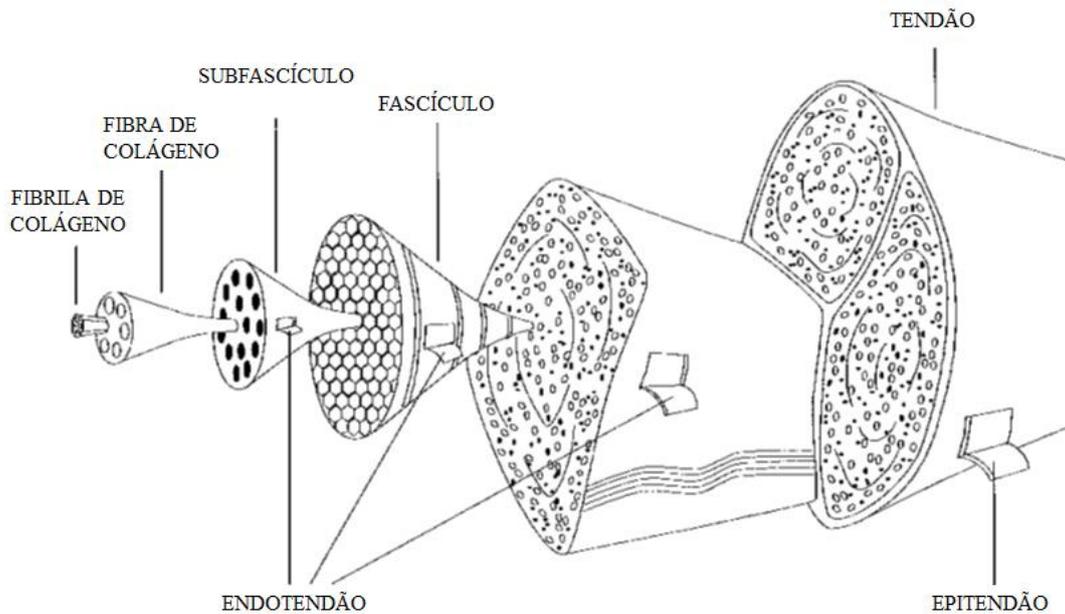


Figura 2: Organização hierárquica do tendão (adaptado de (Kannus, 2000)).

O tecido tendíneo tem, em sua morfologia, esse arranjo em paralelo das suas fibras de colágeno, com o intuito de controlar as cargas tensionais unidirecionais. Um bom exemplo do contrário são os ligamentos, que possuem um arranjo entrelaçado, podendo, assim, controlar cargas tensionais em direções diversas (Ritty e Herzog, 2003; Kjaer, 2004; Wang, 2006).

Outra variável biomecânica, a viscoelasticidade tendínea, dá-se em virtude da presença de todos os constituintes citados anteriormente (água, glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos, fibras de colágeno e elastina), garantindo o retorno do tecido tendíneo ao seu tamanho original, após ser submetido a certo nível de força de deformação. Além disso, uma das principais funções dessa viscoelasticidade é garantir redução da energia metabólica durante a locomoção (Kjaer, 2004; Zhang *et al.*, 2005). A presença de água e GAGs nos tendões são extremamente importantes para manter o espaçamento entre as fibras de colágeno, facilitando o seu deslizamento.

Em relação às proteínas não colágenas, os proteoglicanos e glicoproteínas são essenciais para garantir a ligação entre as fibras de colágeno, a difusão de moléculas de água, a fibrilogênese do colágeno e para manter a estrutura da matriz (Rees *et al.*, 2000; Sharma e Maffulli, 2005).

Existem diversos tipos de proteoglicanos, como decorinas, fibromodulinas, biglicanas e as agrecanas. A quantidade de proteoglicanos no tendão pode variar, dependendo da tensão e compressão (estímulos mecânicos) que este recebe (Rees *et al.*, 2000; Yoon e Halper, 2005).

Dentre as glicoproteínas, a tenascina-C atua na estabilidade e estruturação da MEC e sua expressão é maior em tecidos onde o volume de turnover da MEC está mais ativo, já a fibronectina serve de ponte entre as células e a MEC (Hynes, 1999; Jarvinen *et al.*, 1999).

Outra proteína destacada é a proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP), originalmente identificada somente em cartilagens articulares, que desempenha um papel fundamental na fibrilogênese do colágeno, além de influenciar fatores funcionais do tendão, como a força, podendo ser qualificada como indicador de integridade da MEC (Dudhia *et al.*, 2007; Sodersten *et al.*, 2013; Peffers *et al.*, 2014).

Grande parte desses constituintes já citados é renovada dentro da MEC por meio de processos moleculares, realizados pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). As MMPs são enzimas proteolíticas, responsáveis pela degradação do colágeno, proteoglicanos, elastina e outros componentes da MEC, apresentando papel fundamental no *turnover* da MEC, recuperação do tecido após a lesão e ampliação da atividade metabólica (Kjaer, 2004; Marqueti *et al.*, 2006; Marqueti *et al.*, 2008; Riley, 2008). Sendo assim, os TIMPs têm o objetivo de controlar a degradação excessiva desses componentes, prevenir alterações exacerbadas e regular as atividades das MMPs e, conseqüentemente, da MEC (Del Buono *et al.*, 2013). Todo esse mecanismo desencadeia o remodelamento tendíneo.

Em relação ao meio celular, os fibroblastos (tenoblastos e tenócitos) compreendem 90-95% dos elementos, juntamente com células endoteliais e mastócitos (Kannus, 2000; Kjaer, 2004; Wang, 2006). Os tenoblastos são células em forma de fuso, imaturas, altamente metabólicas e possuem muitas organelas citoplasmáticas. Essas células, com o passar do tempo, diferenciam-se em tenócitos, células mais alongadas e distribuídas em fileiras entre os feixes de fibras colágenas (Mcneilly *et al.*, 1996; Chuen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Abate *et al.*, 2009). Os fibroblastos se ligam à MEC por meio das integrinas (receptores de superfície celular de adesão) que conectam o citoesqueleto intracelular à matriz, permitindo a propagação de sinais mecânicos de fora para dentro e de dentro para fora (bidirecional) (Franchi *et al.*, 2007).

As células endoteliais são responsáveis pelo suprimento de sangue e formam o revestimento dos vasos sanguíneos. As necessidades locais ajustam o número e disposição dessas células. São essenciais para a angiogênese e vasculogênese (Sumpio *et al.*, 2002). Os mastócitos estão presentes em muitos tecidos conjuntivos, como o tendão, desempenhando um papel de remodelação deste tecido e reparo após lesão, liberando diferentes fatores, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), que contribuem para a primeira fase inflamatória do processo de cura (Berglund *et al.*, 2010).

### **1.1.1 Tendão Calcâneo**

O TC é composto pela união distal do complexo muscular tríceps sural, inserindo-se no tubérculo do calcâneo (Harris e Peduto, 2006). A contribuição, orientação e a extensão da fusão dos músculos sóleo e gastrocnêmio para o tecido tendinoso variam, dependendo do indivíduo (O'brien, 2005).

Um aspecto da evolução humana deu destaque ao TC. A passagem de quadrúpede para bípede elevou a tensão sobre os membros inferiores, transformando esse tecido tendíneo no mais resistente e volumoso do corpo, além de ser imprescindível para a locomoção, ao atuar no funcionamento do mecanismo articular do tornozelo e extremamente eficiente no armazenamento de energia elástica durante atividades, como a corrida (O'brien, 2005).

No entanto, a carga mecânica imposta durante uso diário e uso excessivo, concomitante a um escasso suprimento sanguíneo, faz desse tendão o mais comumente lesado, pode levar semanas ou até meses para a sua total reabilitação, resultando um importante problema clínico (Ippolito *et al.*, 1980; Tumilty *et al.*, 2010).

### **1.2 Aspectos inerentes ao envelhecimento e ao tendão**

O envelhecimento é descrito como um processo complexo, multifatorial, caracterizado pelo acúmulo de alterações deletérias nas células e tecidos, atuando negativamente na homeostase dos sistemas. O processo de envelhecer culmina na deterioração progressiva da integridade estrutural e funções fisiológicas (Kavathia *et al.*, 2009; Semba *et al.*, 2010). As perdas inerentes à força e resistência, juntamente com alterações na arquitetura muscular e propriedades tendíneas, são muito visíveis com o

avanço da idade (Morse, Thom, Birch, *et al.*, 2005; Morse, Thom, Reeves, *et al.*, 2005; Onambele *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2012).

Grande parte dessas variáveis pode tornar o desempenho motor fragilizado. Ações rotineiras, como coordenar os movimentos corpóreos, ficar em pé, sentar e se locomover, são afetadas, ocasionando visíveis diminuições da interação do indivíduo senil com o meio em que vive (Frolkis *et al.*, 1976; Dudhia *et al.*, 2007).

Estudos realizados em animais e humanos visam a esclarecer aspectos morfológicos e biomoleculares do tecido tendíneo, causadores das alterações referidas acima. Resultados prévios, oriundos de populações de ratos e coelhos, mostraram diminuição do número de fibras espessas de colágeno em TC, causada pela atrofia durante a senescência (Nakagawa *et al.*, 1994), diminuição do diâmetro das fibras de colágeno (Chen *et al.*, 2006), juntamente com uma capacidade de proliferação celular e metabolismo dos fibroblastos (componentes celulares básicos dos tendões) diminuídos. Esses fatores afetaram negativamente a fase da regeneração do tendão e, provavelmente, estão envolvidos com a baixa qualidade nas cicatrizações evidenciadas durante o envelhecimento (Nakagawa *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2013).

Outro estudo, porém, mostra um aumento no diâmetro das fibras de colágeno, com variação em relação à espessura em TC de coelhos senis, juntamente com maior expressão de colágeno, diminuição das fibras elásticas, dos GAGs, água e glicoproteínas (Ippolito *et al.*, 1980).

Com o envelhecimento, há também um aumento na área de secção transversa do tendão. O estudo em questão comparou o TC de coelhos velhos (4 a 5 anos de idade), adultos (8 a 10 meses de idade) e imaturos (3 semanas de idade), constatando-se a evolução interligada ao envelhecimento (Nakagawa *et al.*, 1996).

As atividades enzimáticas também são fatores contidos em estudos recentes sobre o envelhecimento. As enzimas MMP-2 e MMP-9 foram encontradas em maior número em tendões de ratos velhos, quando comparados a jovens. Esse aumento pode levar a um tendão mecanicamente instável, mais suscetível a lesões (Yu *et al.*, 2013).

Em relação a análises de marcadores de colágeno, observamos um aumento do acúmulo de colágeno, parcialmente degradado, em tendões flexores e extensores, oriundos de animais senis. O estudo sugere, como explicação, a ampliação de microlesões durante o envelhecimento. Esse contexto implica uma capacidade menor de *turnover* da MEC, acarretando déficits na integridade mecânica e estrutural do tecido tendíneo (Thorpe *et al.*, 2010).

Um estudo, envolvendo tendões flexor digital e extensor digital das patas dianteiras de porcos domésticos, demonstrou aumento no número total de colágenos no grupo de animais velhos, além de uma grande mudança nos aspectos mecânicos, partindo do nascimento até a maturidade. Com o envelhecimento, os tendões se tornaram mais rígidos e menos extensíveis. Essas alterações, nas propriedades elásticas, foram mais visíveis nos tendões flexores em comparação aos extensores (Shadwick, 1990).

Dessa forma, vale ressaltar que aspectos morfológicos e funcionais diferem de um tendão para outro. Assim, é possível obter resultados distintos, como os observados acima, dependendo de qual tendão for analisado (TC, tendões flexores) (Stenroth *et al.*, 2012).

Com relação à classe de proteínas mais abundante do tendão, uma maior proeminência de colágeno do tipo II, na região fibrocartilaginosa (inserção do tendão com o osso), foi observada no tendão quadricipital de ratos envelhecidos (Benjamin *et al.*, 1991), juntamente com resultados já supracitados de diminuição nos componentes da MEC (no TC), bem como água, GAGs (Vailas *et al.*, 1988) e redução no número de fibrilas de colágeno (Yamamoto *et al.*, 1993).

O envelhecimento também está relacionado ao aumento de colágeno do tipo III e diminuição da celularidade em tendões flexores de animais equinos. Essas adaptações inferem fases iniciais de processos degenerativos, atribuídos ao estado de senescência do tecido (Birch *et al.*, 1999).

Aspectos referentes ao diâmetro de fibrilas de colágeno aparecem de forma diferente dos já citados, quando o tendão analisado foi o patelar de coelhos senis. O envelhecimento não provocou nenhuma alteração nesse parâmetro, quando comparado a espécies idênticas mais jovens (Sklenka *et al.*, 2006).

Em relação a proteínas não colagenosas, achados demonstram que a atividade da COMP é modulada durante o envelhecimento. Em tendões flexores digitais de cavalos, foram observadas variações na intensidade da proteína. Quando recém-nascidos, os níveis de COMP nos animais eram baixos, atingindo seu pico máximo no segundo ano de vida e voltando a ter quedas progressivas durante o envelhecimento (Smith, Birch, *et al.*, 2002).

Trabalhos com humanos são mais escassos, mas corroboram com muitos estudos supracitados. Evidências como a diminuição na rigidez, no módulo de elasticidade e o aumento na área de secção transversa são resultados importantes em relação à estrutura tendínea (Magnusson *et al.*, 2003; Onambele *et al.*, 2006; Stenroth *et al.*, 2012). Em

patologias do tendão do manguito rotador, os fatores negativos supracitados, ligados ao envelhecimento, são uma das principais causas da degeneração progressiva desse tecido (Moor *et al.*, 2014).

### **1.3 Treinamento de Força (TF) no tecido tendíneo**

A realização de atividades físicas ou a escolha pelo sedentarismo reage acelerando ou desacelerando as variáveis negativas do envelhecimento, respectivamente.

Dessa forma, o TF é descrito como método para melhorar a resistência e força muscular, gerando um maior recrutamento de unidades motoras dentro do tecido pré-existente, com posterior aumento de diâmetro das fibras, levando à hipertrofia do tecido. O treinamento aumenta gradualmente a capacidade de resistir a forças, impondo maior resistência a cada sessão de treino, para atender à demanda adicional (American College of Sports, 2009).

No entanto, alterações estruturais, metabólicas e biomoleculares, frente ao tecido tendíneo, ligadas ao TF, são pouco disseminadas na literatura científica.

Sabemos que o tecido tendíneo possui a capacidade de se reformular metabolicamente e estruturalmente (Kjaer, 2004). Um dos agentes externos, causador dessas modificações, é o TF, que vem sendo apontado como uma ferramenta terapêutica de prevenção e tratamento para o tendão (Kjaer, 2004; Boesen *et al.*, 2006; Couppe *et al.*, 2008; Houghton *et al.*, 2013).

Conhecemos também o problema da hipovascularização tendínea, gerador de diversos agravantes, como processos degenerativos e maior dificuldade de cicatrização do tecido após lesão. Esse *déficit* vascular é depreciado diante do TF, que pode aumentar o fluxo sanguíneo nos tendões, além de torná-los mais resistentes a danos, agindo como método de reparo e melhora na transmissão de força, respectivamente (Kjaer, 2004; Boesen *et al.*, 2006). Essa maior resistência a danos se dá em virtude da hipertrofia tendínea, aumento de sua espessura e rigidez, encontrada em resposta a exercícios de força com diferentes metodologias de treinamento (Reeves *et al.*, 2003; Kongsgaard *et al.*, 2007; Couppe *et al.*, 2008; Houghton *et al.*, 2013).

Além desses aspectos preventivos, o TF é uma ferramenta clinicamente eficaz no tratamento de tendinopatias. A normalização da morfologia fibrilar e diminuição da dor são resultados e demonstrações desse papel curativo (Kongsgaard *et al.*, 2010). Quando se trata da utilização do TF em idosos, resultados, tanto em estudos envolvendo

animais quanto em indivíduos, apresentam aumento do conteúdo de colágeno, com ênfase no tipo I, elevando a rigidez estrutural do tendão. Esses aspectos podem contribuir para melhorar as propriedades mecânicas alteradas com o envelhecimento, diminuindo as falhas em atividades motoras e, conseqüentemente, o número de lesões (Viidik, 1967; Vogel, 1980; Woo *et al.*, 1981; Haut e Haut, 1997; Maganaris *et al.*, 2004; Burgess *et al.*, 2007; Grosset *et al.*, 2014).

Em relação às propriedades mecânicas de TC, resultados divergem sobre o assunto, porém apresentam metodologias de TF diferentes entre eles. Após um treinamento pliométrico de oito semanas, não foi evidenciada diferença nas variáveis força, energia elástica, rigidez e tensão tendínea (Houghton *et al.*, 2013). Porém, com um aumento de período de treinamento (14 semanas), a rigidez tendínea se mostrou maior, juntamente com uma menor perda de energia dissipada no tendão, resultando maior transmissão de força em nível muscular durante o exercício (Foure *et al.*, 2010). O período de treinamento utilizado no primeiro caso, 8 semanas, torna-se contestável para medir parâmetros como hipertrofia e força, em virtude de que, até a 8ª semana de treinamento, os ganhos relativos são basicamente neurais (aumento de recrutamento de unidades motoras) (Sale, 1988; Gabriel *et al.*, 2006).

Todavia, evidências também suportam um aumento de 23% na força do TC após um protocolo de TF (força de hipertrofia) durante 52 semanas, quando comparado ao grupo controle (grupo não treinado) (Morse *et al.*, 2007).

Seguindo nessa mesma linha, a carga mecânica imposta ao tecido tendíneo, por meio do exercício, vem sendo demonstrada como um mecanismo de regulação da homeostase e aumento do *turnover* de colágeno tipo I, com elevação da síntese por até 72 horas, após o exercício (Chiquet, 1999; Langberg *et al.*, 2001). Essas evidências foram encontradas por meio da medição das carboxilas terminais do propeptídeo e as carboxilas terminais do telopeptídeo colágeno I, marcadores de síntese e degradação, respectivamente (Langberg *et al.*, 2001).

Esse aumento na expressão de colágeno do tipo I, por meio da imposição de carga mecânica, pode estar diretamente relacionada ao aumento da expressão do fator de crescimento de transformação -  $\beta_1$  (TGF-  $\beta_1$ ) (Heinemeier *et al.*, 2003). O gene TGF-  $\beta_1$  está diretamente relacionado à síntese de componentes da MEC, tendo por objetivo controlar a formação e degradação de tecidos conjuntivos, como os que compõem o tendão (Yu *et al.*, 2013). No entanto, relatos sem nenhuma mudança na síntese de

colágeno do tendão patelar, após um protocolo de TF, por 12 semanas, deixam em aberto discussões em relação ao tema (Bloomquist *et al.*, 2013).

Como podemos observar, na literatura científica atual, são poucos os artigos que objetivaram estudar aspectos celulares, morfológicos e biomecânicos vinculados ao TF e ao tecido tendíneo. Quando se fala em variáveis biomoleculares ligadas à regulação de proteínas, esses estudos são ainda mais raros.

#### **1.4 A proteômica como método de análise molecular do tendão**

Os estudos em nível biotecnológico crescem a cada dia e se tornaram uma grande vertente nas ciências da saúde. Entender aspectos moleculares inerentes a questões músculo-esqueléticas é a base e a chave para novas descobertas nesse ramo científico e prático. Um desses métodos é a proteômica. Em 1994, Marc Wilkins definiu como proteômica todas as proteínas expressas por uma célula ou tecido (Wilkins *et al.*, 1996; Verrills, 2006).

O principal objetivo dessa análise é estudar todo o conteúdo de proteínas de uma amostra biológica, dentro de um determinado período ou situação, bem como identificar, quantificar e caracterizar todas as proteínas envolvidas em uma cadeia particular, organela, célula, tecido, órgão, organismo ou realizar análise diferencial de sistemas biológicos, que reagem mediante estímulos externos ou doenças específicas (Verrills, 2006; Kocher e Superti-Furga, 2007).

Os estudos proteômicos permitem ao pesquisador realizar investigações mais abrangentes e, dessa forma, fornecer uma abordagem pragmática para a descoberta de novas alterações nas proteínas (Burniston, 2008). O ponto chave dessas investigações é a constante interação de proteínas com outros polipeptídicos, bem como com todo o sistema biológico, o que remete às análises proteômicas um perfil dinâmico (Petriz *et al.*, 2012).

Dentre as ferramentas empregadas nesse tipo de análise, a eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2-DE) é a mais veementemente utilizada (Klose, 1975; O'farrell, 1975). Essa técnica utiliza dois parâmetros para realizar a separação das proteínas: o ponto isoelétrico (primeira dimensão) e a relativa massa molecular (segunda dimensão). Ambos são determinados com base na mobilidade em gel de poliacrilamida (Petriz *et al.*, 2012).

Com o avanço das tecnologias, outras metodologias de análise foram agregadas ao ramo proteômico. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de

separação de compostos, analítica. Sua grande aplicabilidade é atribuída à sensibilidade, capacidade de separação e quantificação de moléculas. É utilizada para análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, como pequenas moléculas (metabólitos e peptídeos), até grandes (proteínas) (Petriz *et al.*, 2012).

Aliado a esse equipamento, está o Espectrômetro de Massa (MS), detector utilizado para a determinação qualitativa e quantitativa dos compostos de uma amostra (Petriz *et al.*, 2012). O MS baseia-se em ionização molecular e tem a capacidade resultante de identificar proteínas desconhecidas por caracterização molecular, de forma rápida, precisa e com elevada sensibilidade. Em virtude disso, pode ser utilizado em praticamente qualquer pesquisa que consiste em identificação de proteínas (Sabido *et al.*, 2012).

A introdução dessas técnicas faz da proteômica um poderoso “motor gerador de hipóteses” que, quando combinado com técnicas complementares ligadas à biologia molecular, celular e farmacológica, fornece uma estrutura para gerar a compreensão de processos biológicos complexos (Cravatt *et al.*, 2007).

A utilização da proteômica como método investigativo de aspectos inerentes ao tendão é escassa. Dos estudos com esse objetivo, duas pesquisas analisaram a utilização da cinesioterapia no pós operatório do tendão calcâneo de coelhos (Jialili *et al.*, 2011; Jielile *et al.*, 2012), outro trabalho investigou as proteínas presentes na região pericelular do tendão flexor digital longo de ratos (Smith *et al.*, 2012), além da análise de fatores ligados ao envelhecimento na composição da MEC de tendões flexores superficiais digitais de animais equinos (Peffer *et al.*, 2014).

No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos que objetivem a análise proteômica do tecido tendíneo, submetido a variáveis como o envelhecimento e o TF associados.

Nesses termos, o trabalho em questão é de grande relevância para o meio científico e clínico, tendo como objetivo gerar informações importantes a respeito dos eventos moleculares, ocasionados pelo envelhecimento e pelo TF no tecido tendíneo, auxiliando a construção de conhecimentos para a ciência básica e a melhora da qualidade de vida da população em geral.

Nessa perspectiva, acreditamos na hipótese de que o envelhecimento poderá alterar, de forma negativa, a regulação proteica e, até mesmo, o perfil proteômico do tendão, acarretando possíveis danos funcionais e estruturais. A associação do TF, no entanto, terá o papel de reverter tais efeitos adversos, modular os níveis proteicos e alterar

o perfil proteômico anterior, resultando um tendão mecanicamente estável, forte e resistente.

## **2. APRESENTAÇÃO DAS ATIVIDADES ENVOLVIDAS E DIFICULDADES ENCONTRADAS DURANTE A EXECUÇÃO DO ESTUDO**

Para o desenvolvimento do presente estudo, envolvendo a análise proteômica dos TC de ratos jovens e senis, realizamos diversos testes, via protocolos, que abrangeram desde a extração da amostra até a execução da análise proteômica propriamente dita, durante os meses de maio/2013 a agosto/2014, no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (UCB).

Todo esse período de ensaio foi necessário devido à carência de estudos, na literatura, referente ao tema, e que evidenciasse uma lógica padrão para a execução do trabalho. Essas diversas investidas culminaram na padronização de uma metodologia para extração de proteínas de tendão de ratos, e posterior análise proteômica, e que viabilizasse a identificação, quantificação e caracterização de todas as proteínas do tecido em questão.

Para um melhor entendimento desta proposta de pesquisa, serão contextualizadas, a seguir, em forma de síntese, as atividades envolvidas neste processo.

### **2.1 Detalhamento dos Métodos**

Durante os primeiros meses de experiência, o foco inicial foi estabelecer uma metodologia para extração e quantificação das amostras e posterior confirmação e análise, via eletroforese unidimensional (gel 1D) e bidimensional (gel 2D). Era necessária uma boa reprodutibilidade no gel 1D, para que pudéssemos prosseguir para a próxima etapa (gel 2D).

O primeiro tampão de extração de proteínas utilizado foi constituído por 7 mol/L, Uréia (21g), 2 mol/L Tiouréia (7,6g), 4% CHAPS (2g), 1% de DTT (65mmol/L) (500mg), 0,5% IPG buffer Ph: 3-10 (250ul), inibidor de protease (1 tablete) e água deionizada. Esse tampão foi utilizado em diversas extrações, nas quais não obtivemos bons resultados (figura 3) e muitos problemas com a quantificação surgiram, tanto pelo método de fluorescência do Qubit (método de quantificação de proteínas por meio de aspectos fluorométricos), quanto pela técnica usando o Pierce *BCA Protein Assay Kit* (BCA).

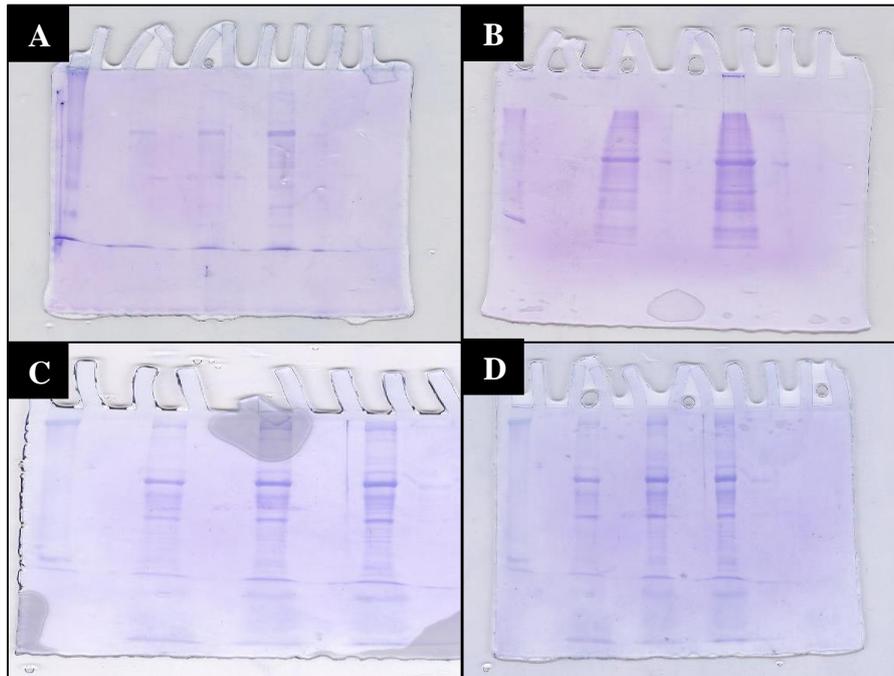


Figura 3: Análises realizadas via eletroforese unidimensional. As figuras A, B, C e D apresentam marcações (bandas) nos géis mal separadas e pouco intensas, demonstrando pequena quantidade de proteínas no tendão analisado.

Dessa forma, e com base em resultados não satisfatórios, o tampão de extração foi modificado. Passamos a utilizar ácido cacodílico (1,6g), cloreto de sódio (8,775g), cloreto de zinco (100 ul), cloreto de cálcio (2,218g), azida Sódica (0,0975g) e triton x-100 (2ml). Essa solução ficou em agitação com 600 ml de água MiliQ e foi ajustado o pH até 5 e completado com água MiliQ até 1 litro.

Com essa nova solução, obtivemos o melhor resultado com gel 1D (figura 4).

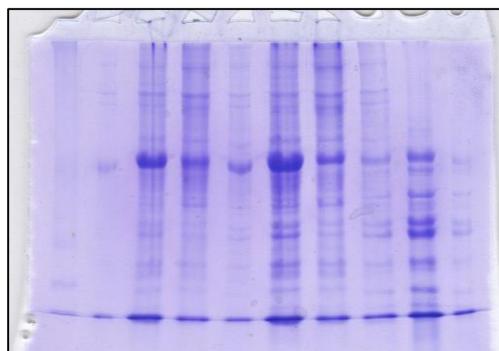


Figura. 4: Análise realizada via eletroforese unidimensional.

O próximo objetivo foi a realização da Eletroforese Bidimensional, a qual resultaria em um gel 2D. No entanto, os bons resultados obtidos anteriormente com o tampão supracitado não se repetiram na realização do gel 2D (figura 5). Mais uma vez, diversos testes foram feitos e modificadas todas as variáveis que poderiam estar abrandando os resultados, como a quantidade de amostra aplicada, o tampão de extração utilizado (modificado mais quatro vezes), os protocolos pré-estabelecidos de hidratação, focalização e corrida do gel. Outros tipos de coloração do gel também foram utilizados (figura 6). Diante disso, obtivemos um gel satisfatório (figura 7), mas o avanço esbarrava na exigência de uma quintuplicata de cada amostra. Isso não era possível em virtude da pequena quantidade de proteínas que obtínhamos em cada extração (500ug/ml).

Ainda, vale ressaltar que diversos tratamentos foram realizados com a amostra, sempre com o objetivo de melhorar o padrão dos géis apresentados, como a utilização do ácido tricloroacético (TCA), acetona, o kit Clean Up, além do protocolo com HITRAP DESALTING.

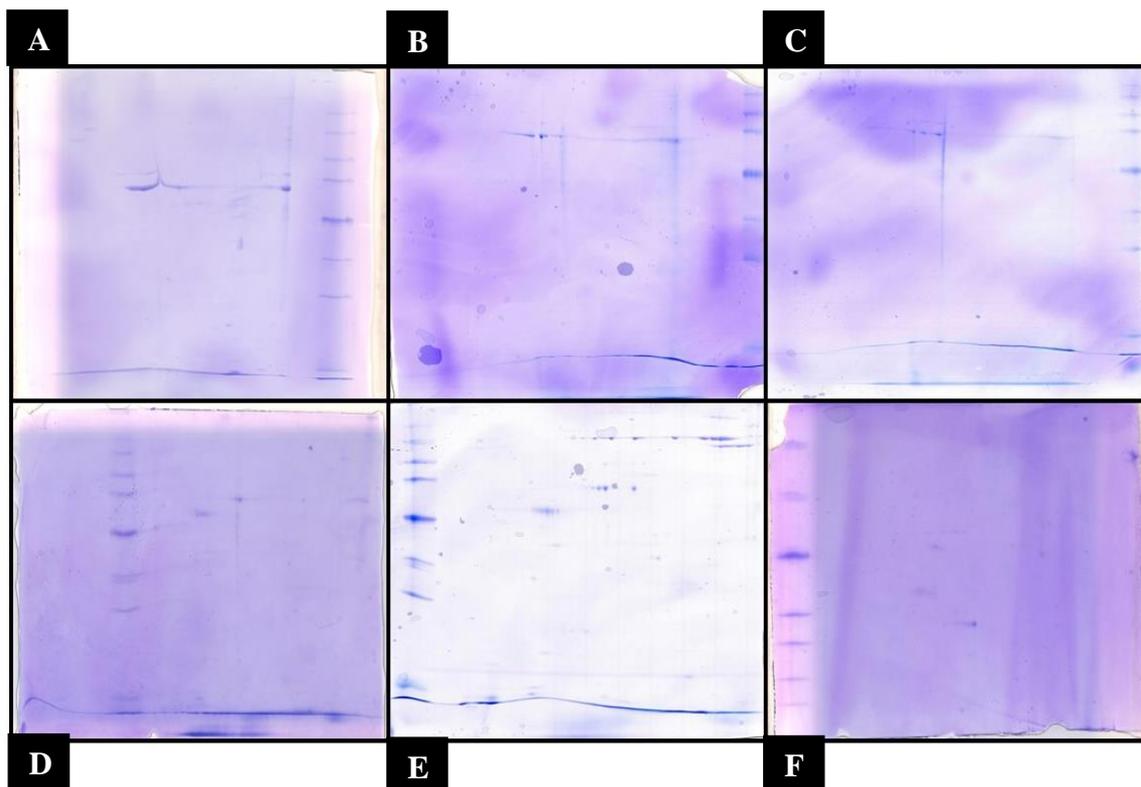


Figura. 5: Análises realizadas via eletroforese bidimensional (A,B,C,D,E, e F).

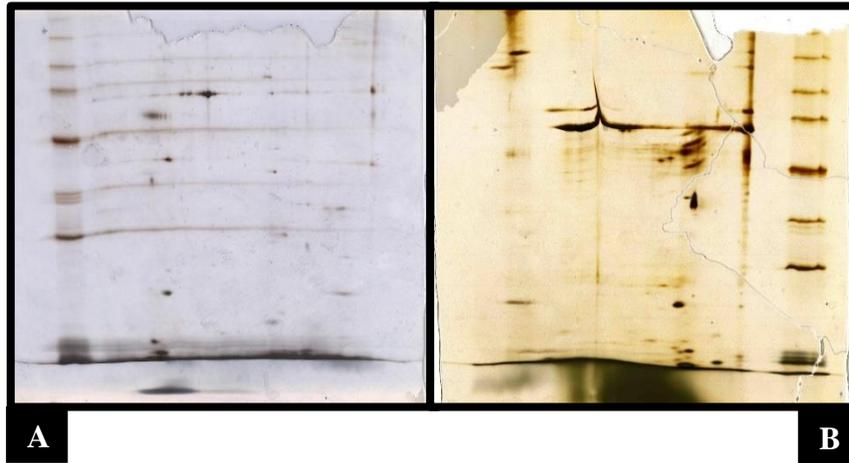


Figura 6: Géis 2D (A e B) corados com nitrato de prata.

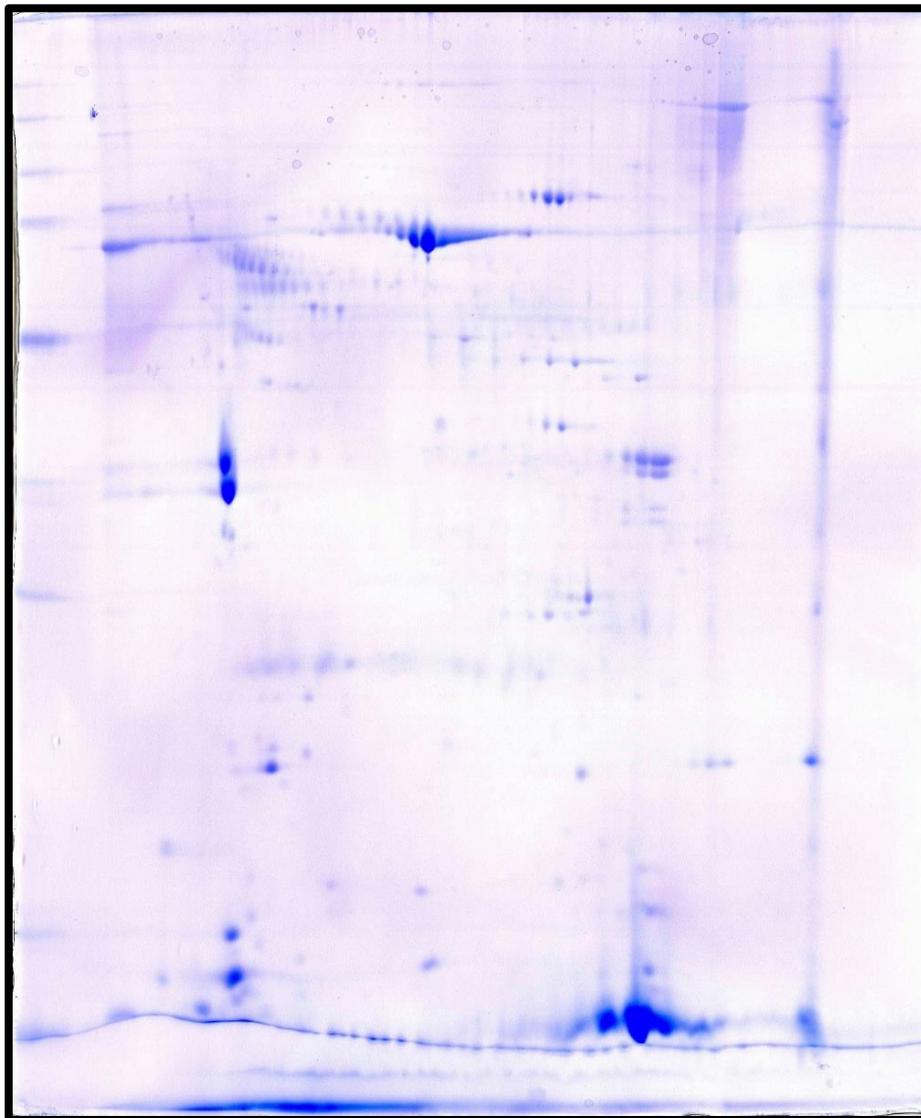


Figura 7: Análise realizada via eletroforese bidimensional.

Em virtude dos problemas encontrados para a reprodução dos géis ao longo do primeiro ano de pesquisa, decidimos adotar outro método de análise: escolhemos o LC-MS/MS. O problema, agora, estava no tampão que utilizávamos para a extração das amostras. Apesar de esse tampão ter apresentado alguns avanços na metodologia empregada anteriormente (gel 2D), o mesmo não poderia ser utilizado no LC-MS/MS, pois continha o reagente Triton, o qual não pode ser usado em análise dessa natureza.

Assim, novos testes começaram a ser executados, para que conseguíssemos um tampão de extração que nos rendesse bons resultados. Os solventes testados foram bicarbonato de amônia 50mM e Acetonitrila 100%. Diversas metodologias de extração foram testadas com esses compostos (figura 8). Também foram realizadas avaliações, alterando o tempo de centrifugação, a utilização de sonificador durante a extração e a inserção ou não do *pellet* na amostra final. Dessa forma, conseguimos elaborar uma metodologia de extração e análise que nos viabilizasse a execução da proposta do trabalho. Essa metodologia, juntamente com os resultados encontrados, será elucidada a seguir, no artigo elaborado.

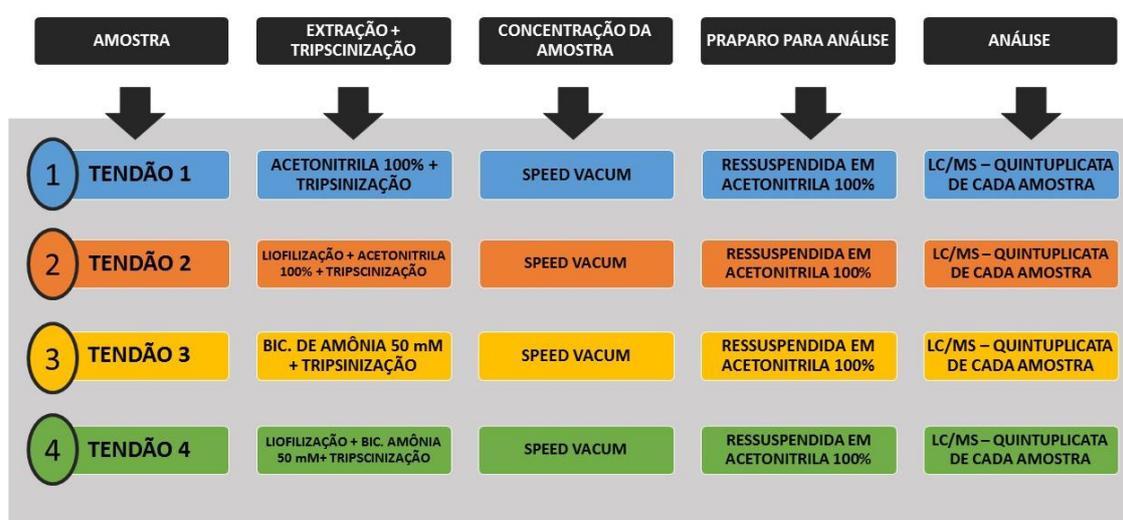


Figura 8: Metodologias testadas para análise via cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

### **3. OBJETIVO**

Identificar e classificar as proteínas do tendão calcâneo de ratos jovens e senis, treinados ou sedentários, visando o maior entendimento do processo de envelhecimento e do treinamento de força.

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi elaborado um artigo científico intitulado:

#### **PERFIL PROTEÔMICO DO TENDÃO CALCÂNEO NO ENVELHECIMENTO E TREINAMENTO DE FORÇA**

Proteomic profile of calcaneal tendon in aging and strength training

# PERFIL PROTEÔMICO DO TENDÃO CALCÂNEO NO ENVELHECIMENTO E TREINAMENTO DE FORÇA

**Palavras Chaves:** Tendão calcâneo (TC), Envelhecimento, Treinamento de força (TF), Análise proteômica.

## 4.1 Resumo

O envelhecimento é caracterizado por diversas alterações em nível biomolecular, que culminam em efeitos deletérios estruturais e fisiológicos ao tecido tendíneo. Nesse contexto, o treinamento de força (TF) possui grande relevância clínica por se tratar de um mecanismo capaz de minimizar, combater ou até mesmo retardar essas alterações mecânicas, estruturais e moleculares. **Objetivo:** investigar o perfil proteômico, identificando e caracterizando a distribuição geral das proteínas do tendão calcâneo (TC) de ratos jovens e senis, sedentários ou submetidos a um protocolo de treinamento de força (TF). **Materiais e métodos:** foram utilizados 24 ratos *Wistar novergicus albinos*, de 4 e 24 meses, divididos em quatro grupos experimentais: jovens (6), treinado jovem (6), senil (6) e treinado senil (6). O TF de 12 semanas foi realizado uma vez a cada dois dias. Posteriormente, os TC foram retirados e analisados por meio da técnica proteômica LC-MS/MS. **Resultados:** foi identificado um total de 29 proteínas nos quatro grupos analisados. Sete dessas proteínas (COMP, COL1A1, COL1A2, CAIII, FAPB3, GSN, S100A6 e Tf) demonstraram níveis de intensidade diminuídos em função do envelhecimento; oito (COMP, COL1A1, DNAAF1, FAPB3, GSN, S100A6, ALB e Tf) tiveram regulações positivas com o protocolo de TF e, em duas (COMP e DNAAF1), foi possível observar a ação do TF diretamente no tendão senil. **Conclusão:** o envelhecimento acarreta regulação proteica negativa no TC e o TF pode servir de método para frear ou, até mesmo, reverter tais diminuições durante a senilidade.

**Key words:** Achilles tendon (AT), Aging, Strength training (ST), Proteomic analysis.

## Abstract

Aging is characterized by several biomolecular changes that result in structural as well as physiological deleterious effects to the tendinous tissue. In this context, strength training (ST) is of great clinical importance for elderly people since it is able to minimize, slow down or even stop molecular, structural and mechanical changes. **Objective:** To investigate the proteomic profile in order to identify and characterize the general distribution of proteins of the Achilles tendon (AT) in young and senile rats either sedentary or submitted to strength training protocols (ST). **Materials and methods:** 24 *Wistar novergicus* albino rats were used, aged 4 and 24 months, divided into four experimental groups: young rats (6), young trained rats (6), senile rats (6) and senile trained rats (6). A 12-week strength training was conducted once every two days. Afterwards, the CT were removed and subjected to LC-MS/MS proteomics analysis. **Results:** a total of 29 proteins were identified in the four groups analyzed. Seven of those proteins (COMP, COL1A1, COL1A2, CAIII, FAPB3, GSN, S100A6 and Tf) showed decreased intensity levels as a result of aging; eight of them (COMP, COL1A1, DNAAF1,

FAPB3, GSN, S100A6, ALB and Tf) had positive settings with the ST protocol and, finally, in two of them (COMP and DNAAF1) was possible to observe the ST action right in the senile tendon. **Conclusion:** aging results in negative regulation of protein to the CT, and ST can help to refrain or even reverse those aging effects in elderly people.

## 4.2 Introdução

A pirâmide demográfica de diversos países desenvolvidos demonstra, há algum tempo, o intenso avanço da população idosa na estrutura etária de seus indivíduos (Division, 2012). O Instituto de Pesquisa Aplicada (IPEA) estima o mesmo futuro para a população brasileira. Estudo prevê que, no ano de 2040, o Brasil terá 55 milhões de idosos, o que representará 27% da população. Desses, 13 milhões terão mais de 80 anos (Ibge, 2010).

O envelhecimento é caracterizado por diversas alterações em nível biomolecular, que culminam em efeitos deletérios estruturais e fisiológicos. Dentre essas alterações, o sistema músculo-esquelético é atingido com perdas em quesitos como flexibilidade, coordenação, velocidade e força muscular (Semba *et al.*, 2010). Todas essas variáveis podem levar a doenças crônico-degenerativas e perda de autonomia físico-funcional, trazendo efeitos extremamente negativos para a população idosa (Hollmann *et al.*, 2007; Semba *et al.*, 2010).

O tecido tendíneo representa, de forma precisa, o que foi mencionado acima. Estudos vêm demonstrando que o envelhecimento está diretamente associado a diversas variáveis negativas, relacionadas ao tendão, como a diminuição na rigidez a trações (aspectos mecânicos) (Nachemson e Evans, 1968; Tkaczuk, 1968; Noyes e Grood, 1976), menor capacidade de se regenerar que na juventude (aspectos celulares) (Dudhia *et al.*, 2007), além de uma possível redução no teor de colágenos e um aumento da elastina (aspectos biomoleculares) (Vogel, 1991), evoluindo para o dano progressivo desse tecido.

Dessa forma, com o aumento da idade da população, a incidência de lesões se eleva concomitantemente. Esse fato, relacionado à lenta cicatrização de um tendão lesado, que raramente atinge a capacidade funcional e força de um tendão intacto, colabora para a redução da atividade na velhice, conduzindo para uma piora na qualidade de vida do indivíduo idoso (Maffulli *et al.*, 2000; Sharma e Maffulli, 2006; Dudhia *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o treinamento de força (TF) possui grande relevância clínica por se tratar de um mecanismo capaz de minimizar, combater ou até mesmo retardar essas alterações mecânicas, estruturais e moleculares inerentes ao envelhecimento e,

consequentemente, ao tecido tendíneo (Kjaer *et al.*, 2005; Wang, 2006; Arampatzis *et al.*, 2007; Nakagaki *et al.*, 2007; Coupe *et al.*, 2008; Coupe *et al.*, 2009; Arampatzis *et al.*, 2010).

Para que todas essas variáveis possam ser analisadas, a proteômica se insere como mecanismo investigativo do tecido tendíneo (Wilkins *et al.*, 1996; Verrills, 2006). Estudos já buscaram estabelecer mapas proteômicos de regiões tendíneas (Smith *et al.*, 2012), análise de proteínas no pós-operatório do tendão calcâneo (TC) (Jialili *et al.*, 2011), identificação de tipos de colágeno (Pataridis *et al.*, 2008) e, até mesmo, possíveis alterações na composição do tendão flexor digital em função do envelhecimento e da lesão do tecido (Peffer *et al.*, 2014).

No entanto, a realização da análise proteômica, via Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) do TC, com o intuito de investigar a modulação e encontrar novas proteínas oriundas tanto do processo de envelhecimento como do TF, é uma abordagem ainda não descrita na literatura.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o perfil proteômico, identificar e caracterizar a distribuição geral das proteínas do TC de ratos jovens e senis, sedentários ou submetidos a um protocolo de TF. A utilização do TC se dá por aspectos clínicos, em função de que, nos humanos, é o tendão que sofre a maior carga mecânica diária, além de ser o mais propenso a lesões (O'brien, 2005; Tumilty *et al.*, 2010).

Nessa perspectiva, esta pesquisa é de grande importância para o meio científico e clínico, pois pode viabilizar a maior compreensão molecular do processo de envelhecimento e do TF. Dessa forma, tomamos por base a hipótese de que o envelhecimento poderá alterar, de forma negativa, a regulação proteica e, até mesmo, o perfil proteômico do tendão, acarretando possíveis danos funcionais e estruturais. A associação do TF, no entanto, terá o papel de reverter tais efeitos adversos, modular e alterar o perfil proteômico anterior, resultando um tendão mecanicamente estável, forte e resistente.

### **4.3 Materiais e Métodos**

#### **ANIMAIS**

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 24 *Rattus Wistar Novergicus Albinos*, de 4 meses (jovens, n = 12) e 24 (senis, n = 12), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de São Paulo - UNESP (Campus de Botucatu).

Os ratos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, em temperatura ambiente, entre 22 e 24°C, com luz controlada em ciclo de 12 h (claro escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*. O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (*National Research Council*, 1996) e o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCAR (Protocolo N0 056/2010).

## GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (6 animais/grupo), na seguinte ordem: jovens (J); senis (S); jovens que realizaram o treinamento de força (JT); senis que realizaram o treinamento de força (ST).

## TREINAMENTO DE FORÇA

O TF de 12 semanas foi realizado uma vez a cada dois dias. Inicialmente, os ratos foram adaptados ao protocolo de TF em que os animais escalaram uma escada vertical (1,1 x 0,18 m, degrau de 2 cm, inclinação de 80°) com pesos presos às suas caudas. O tamanho da escada fez com que os animais realizassem 8 a 12 movimentos por escalada. O aparato de carga foi preso na porção proximal da cauda com uma fita autoadesiva. Com o aparato fixado à cauda, os ratos foram colocados na parte inferior da escada e familiarizados com a mesma (figura I). Caso necessário, um estímulo com pinça era aplicado na cauda do animal para iniciar o movimento. No topo da escada, os ratos alcançaram uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansaram durante 2 minutos. Esse procedimento foi repetido até que os animais conseguissem, voluntariamente, escalar a escada, três vezes consecutivas, sem estímulo. Três dias após essa familiarização, a primeira sessão de treinamento consistiu de 4 a 8 escaladas na escada, com cargas progressivamente mais pesadas. A escalada inicial consistiu em carregar uma carga de 75% do peso corporal do animal. Em seguida, foi adicionado um peso de 30g até uma carga com a qual o rato 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 do rato para aquela sessão de treinamento. As sessões de treinamento consistiram de quatro escaladas na escada, com 65%, 85%, 95% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal, determinada na sessão

anterior. Durante as escaladas subsequentes, foram adicionados 30g, até que uma nova capacidade máxima de carregamento fosse determinada. Salientamos que o protocolo de treinamento de resistência apresenta metodologia similar aos usados em humanos e foi adaptado de Hornerberg e Farrar (2004), de acordo com as necessidades do presente estudo.



Fig. I: Escada para treinamento de resistência.

#### EUTANÁSIA DOS ANIMAIS, RETIRADA E ARMAZENAMENTO DOS TENDÕES

Após 48 h do término do período experimental, todos os procedimentos foram realizados com os animais anestesiados, utilizando-se injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12 mg/Kg/peso corporal) e quetamina (95 mg/Kg/peso corporal). Após, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas presas e mantidas em extensão, para que, assim, fosse efetuada a retirada do TC. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração das proteínas.

## EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Os tendões foram completamente macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Após, foi adicionada uma solução de lise, contendo bicarbonato de amônia, 50 mM, até homogeneização total da amostra. Em seguida, esta foi incubada *overnight* na geladeira (4°C). Na sequência, a amostra foi centrifugada por 30 min. a 23.447 g. O sobrenadante foi retirado e quantificado pelo método de fluorescência Pierce *BCA ProteinAssayKit* (BCA). Posteriormente ao processo de quantificação, as amostras foram ajustadas para uma concentração de 150 ug.mL<sup>-1</sup> de proteína para realização da etapa seguinte.

## TRIPSINIZAÇÃO E DIGESTÃO PROTEICA

Para o processo de tripsinização e digestão proteica, foram adicionados, a cada amostra, 20 uL de 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> (Vetec) e 50 ul de solução Rapigest SF (Waters). O material foi levado ao agitador (LABNET International, Inc), incubado a 80 °C, por 15 min, e submetido à pequena centrifugação por 15 seg (spin). Posteriormente, foram adicionados 5 ul de 100mM dithiothreitol (GE Healthcare) e, em seguida, a amostra foi agitada e incubada a 60 °C, por 30 min. Após o período de incubação, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente até o resfriamento e centrifugadas por 15 seg. Posteriormente, foram adicionadas às amostras 5 uL de 300 mM iodoacetamida (GE Healthcare), agitadas e incubadas, por 30 min, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após, foram adicionados 20 uL de solução de tripsina (Promega) em 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Vetec) na concentração de 1:1000; as amostras foram agitadas novamente e incubadas a 37 °C, por 15 h, para digestão. Em seguida, foram centrifugadas a 21.913 g, 6 °C, por 30 min. O sobrenadante foi transferido para tubo de microcentrífuga (1,5mL) novo e evaporado em concentrador a vácuo (LABCONCO). Por fim, as amostras foram ressuspendidas em acetonitrila 50% em água acrescida de 0,1% de ácido fórmico, vortexadas, centrifugadas durante 5 min a 20.075 g e o sobrenadante, em seguida, retirado e utilizado para análise.

## LC-MS/MS ANÁLISE

Os experimentos de LC-ESI-MS/MS foram realizados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, do tipo *fast*, Shimadzu (Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo ESI micrOTOF-Q III (BrukerDaltonics, Alemanha). A separação dos peptídeos foi realizada, fazendo uso de uma coluna XR-ODS C18 2.0 mm

x 30 mm x 2.2  $\mu\text{m}$  (Kyoto, Japão), tendo como solventes, 0,1% de ácido fórmico em água e acetonitrila 100%, acrescida de 0,1% de ácido fórmico como fases móveis, A e B, respectivamente. Utilizando um gradiente de 5% de B por 5 min; 5-50% de B por 50 min; 50- 95% de B por 10 min; 95% de B por 8 min; 95 – 5% de B por 1 min e 5% de B por 7 min, totalizando 80 min, sob um fluxo de 400  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . As análises de ESI foram realizadas sob modo linear positivo, nos seguintes parâmetros: *spray voltage*, 4.5 kV, utilizando nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) como fonte de ionização, *nebulizer* 4.0 Bar, *drygas* 8.0, *drytemp* 200 °C. Os íons foram escaneados sob um intervalo de 300-3.000 m/z, seguido de cinco MS/MS escans.

Os dados brutos de fragmentação (MS/MS), gerados pelo equipamento, foram analisados por meio do programa *Data Analysis* (Bruker Daltonics, Alemanha), em que foram separados todos os íons que foram fragmentados de acordo com os parâmetros citados acima, através da ferramenta AutoMs(n); na sequência, os espectros foram deconvoluídos por meio da ferramenta *deconvolute* para, então, determinar o estado de carga de peptídeo gerado após fragmentação. Os dados foram importados para o programa *BioTools* (Bruker Daltonics, Alemanha) onde foram realizadas as buscas, utilizando o algoritmo MASCOT (*Matrix Science, London, United Kingdom*, versão 2.3). O banco de dados utilizado foi o *UniProt, SwissProt*, (*Switzerland, Geneva*), sendo as buscas direcionadas para a taxonomia *Rattus* (546.439 sequências e 194.445.396 resíduos). A Tripsina foi selecionada como enzima de clivagem, seguida das possíveis modificações: carbamidometilação da cisteína (C\*), como modificação fixa, e oxidação de metionina (Mox), determinada como modificação variável. A tolerância de massas para os íons precursores (MS) e para os fragmentos de íons (MS/MS) foi de  $\pm 0.2$  Da.

As proteínas foram consideradas “identificadas”, quando o escore dos peptídeos esteve maior que o escore mínimo para o limite de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ), que por sua vez, foi obtido por meio do *match* de cada peptídeo gerado em relação ao seu perfil de fragmentação teórico. Todos os íons deveriam estar presentes nas triplicatas realizadas, como critérios de inclusão.

## QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas que foram comuns em todos os grupos experimentais foram quantificadas com o objetivo de estudar o perfil de expressão entre os diferentes grupos, por meio da ferramenta *Data Analysis*. A presença das proteínas, para quantificação, era necessária em todas as triplicatas realizadas de cada animal, e eram calculadas por meio

da área do pico dos íons encontrados. Foram extraídos dois íons, por meio da ferramenta *extracted chromatogram (XICs)*, que estivessem relacionados com a proteína identificada. A área de cada íon foi calculada com o auxílio da ferramenta *Integrate only Chromatogram*, sendo esses valores utilizados para os cálculos de intensidade e posterior comparação com os demais grupos.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de *Shapiro-Wilk* ( $p > 0,05$ ) e os dados apresentados em média e erro padrão. Para a comparação das variáveis (envelhecimento e TF) entre os grupos, uma ANOVA *two-way*, com o teste de *post hoc* por *Tukey*, foi utilizado.

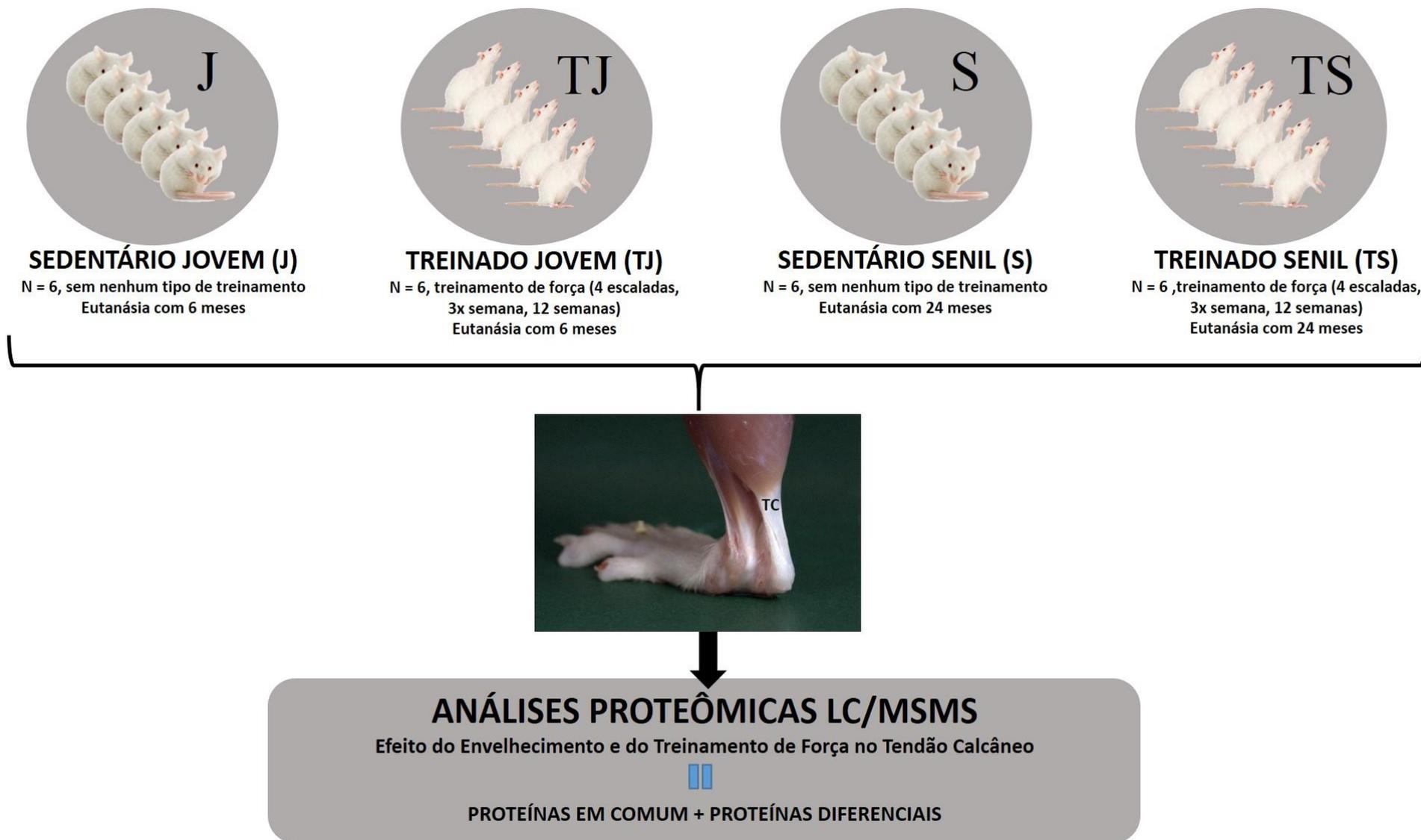


Fig. II: Design experimental. Ilustração esquemática da sequência metodológica seguida no estudo.

### 4.3 Resultados

As análises proteômicas do TC de ratos jovens e senis, sedentários ou submetidos ao TF, por meio da metodologia ESI-LC-MS/MS (figura II), levaram à identificação de um total de 29 proteínas. Estas foram classificadas por meio da sua localização celular e função molecular, de acordo com as informações da Gene Ontology (GO).

A grande maioria das proteínas identificadas são oriundas do citoplasma (40%), seguido por citoesqueleto (15%), MEC (22%), membrana (11%), núcleo (3,7%), retículo endoplasmático (3,7%) e mitocôndria (3,7%). Em relação às suas funções moleculares, a maioria desempenha papel de ligação (*binding*) (85%), seguida por atividade estrutural (11%), de receptor (3,7%) e enzimática (3,7%).

Do total de proteínas identificadas, 12 foram comuns a mais de um grupo, e o restante (17 proteínas) foi classificado como diferencial em seus respectivos grupos. Para elucidar e facilitar o entendimento do exposto acima, um diagrama de *Veens* aloca cada proteína em seu grupo e expõe, em forma de porcentagem, as funções moleculares das proteínas exclusivas de cada grupo (figura III).

#### **PROTEÍNAS DIFERENCIAIS ENCONTRADAS ENTRE OS GRUPOS**

Foram encontradas 17 proteínas diferenciais: no grupo J (colágeno do tipo II alfa I, hemopexina, componente redutor da amidoxima mitocondrial 2, proteína H ligante de miosina, proteína vacuolar V-ATPase subunidade B (isoforma cerebral); tipo de proteína dedo de zinco -motivo CCCH ligante de RNA; no grupo S (receptor gustativo do tipo 2, membro 110, beta enolase, mioglobina, isoforma da cadeia leve de miosinas para músculo esquelético, isoforma da cadeia leve de miosinas regulatórias para músculo esquelético, piruvatoquinase); no grupo TJ (frutose-bifosfatoaldolase A, cadeia leve de miosinas 3, beta timosina 4) e, por final, no grupo TV (DNAJ homóloga, subfamília C, membro 10 e miosina não convencional-Ie).

#### **ANÁLISE DAS PROTEÍNAS COMUMENTE ENCONTRADAS ENTRE OS GRUPOS**

Foram realizadas análises estatísticas das 12 proteínas que se fizeram presentes em mais de um grupo, para identificação do fator gerador de possível alteração na expressão (envelhecimento ou TF) de cada proteína. Suas expressões foram comparadas

nos quatro grupos trabalhados (J, TJ, S, TS), representados em média  $\pm$  erro padrão (figura IV).

A proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP), proteína não colagenosa de maior presença no tendão, apresentou um aumento no nível de intensidade no grupo J, TJ e TS (para todos  $p < 0,001$ ), quando comparado ao grupo S, que não teve intensidade detectada por meio da análise realizada (LC-MS/MS), em virtude da sua baixa concentração nessa proteína.

As análises dos colágenos, principais constituintes da MEC, também demonstraram alterações oriundas dos fatores avaliados (envelhecimento e TF). O Colágeno tipo I alfa I (COL1A1) teve uma maior regulação no grupo TJ, quando comparado aos outros três grupos analisados, J ( $p=0,007468$ ), S ( $p=0,000656$ ) e TS ( $p=0,003247$ ).

O colágeno tipo I alfa II (COL1A2) apresentou uma regulação negativa no grupo S a ponto de não ser detectada sua intensidade, quando comparado aos grupos J ( $p=0,002750$ ) e TJ ( $p=0,000158$ ).

A dineína axonemal fator-1 (DNAAF1), motor do citoesqueleto, apresentou um aumento na sinalização no grupo TS ( $p=0,005508$ ), quando comparada ao grupo S ( $p=0,005508$ ).

A proteína anidrase carbônica III (CAIII), catalisadora da hidratação reversível do dióxido de carbono, demonstrou um *déficit de* sinalização inerente ao envelhecimento. O grupo J teve uma maior sinalização, quando comparado ao grupo S ( $p=0,043198$ ) e TS ( $p=0,021162$ ).

As proteínas carreadoras de ácidos graxos dos adipócitos (FAPB4) e do coração (FAPB3) também tiveram diferenças anotadas entre os grupos analisados.

A FAPB4, transportadora de proteínas lipídicas, teve uma maior sinalização no grupo S, quando comparada aos outros três grupos, J ( $p=0,000161$ ), TJ ( $p=0,000161$ ) e TS ( $p=0,000161$ ). No entanto, o grupo TJ indicou um aumento de regulação, quando comparado ao grupo J ( $p=0,000836$ ), que não obteve qualquer nível de intensidade proteica neste caso.

A FAPB3, marcadora de patologias cardíacas, teve um aumento na sinalização do grupo TJ, quando comparada ao seu semelhante sedentário ( $p=0,003642$ ), ao grupo S ( $p=0,000172$ ) e TS ( $p=0,000172$ ). No entanto, o grupo J apresentou uma maior sinalização, quando comparado aos grupos S ( $p=0,000172$ ) e TS ( $p=0,000172$ ), que apresentaram níveis extremamente baixos dessa proteína.

A proteína gelsolina (GSN), reguladora de cálcio e moduladora da actina, demonstrou um aumento na sinalização do grupo TJ, quando comparada ao grupo J ( $p=0,009198$ ), S ( $p=0,000170$ ) e TS ( $p=0,000170$ ). Dessa mesma forma, o grupo J teve uma maior sinalização, quando comparado aos grupos S ( $p=0,000170$ ) e TS ( $p=0,000170$ ), que não foram identificados na análise (níveis de intensidades proteicas muito baixos).

A proteína parvalbumina alfa (PVALB), envolvida no relaxamento pós- contração muscular, teve uma regulação positiva no grupo S, quando comparada aos grupos J ( $p=0,000162$ ) e TJ ( $p=0,000162$ ), nos quais não foram identificados níveis de intensidade proteica.

A proteína S-100-A6 (S100A6), sensor e modulador de cálcio, demonstrou um decréscimo em função do envelhecimento. No grupo TJ, houve uma maior sinalização, quando comparado aos grupos J ( $p=0,000368$ ), S ( $p=0,000161$ ) e TS ( $p=0,000161$ ). Da mesma forma, o grupo J apresentou maior intensidade, quando comparado aos grupos S ( $p=0,000418$ ) e TS ( $p=0,000732$ ), que não foram identificados em virtude de sua baixa concentração proteica.

A proteína serotransferrina (Tf), responsável pelo transporte de ferro e estimulação da proliferação celular, teve um comportamento idêntico à anterior. No grupo TJ, houve uma maior sinalização, quando comparado aos grupos J ( $p=0,004729$ ), S ( $p=0,000154$ ) e TS ( $p=0,000154$ ). Da mesma forma, o grupo J apresentou maior intensidade, quando comparado aos grupos S ( $p=0,000168$ ) e TS ( $p=0,000161$ ). Os grupos senis (S, TS) não tiveram níveis de identificação proteica.

A albumina sérica (ALB), reguladora da pressão osmótica do sangue, demonstrou uma maior sinalização no grupo TJ, quando comparada aos outros três grupos analisados, J ( $p=0,001175$ ), S ( $p=0,000349$ ) e TS ( $p=0,000220$ ).

## PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

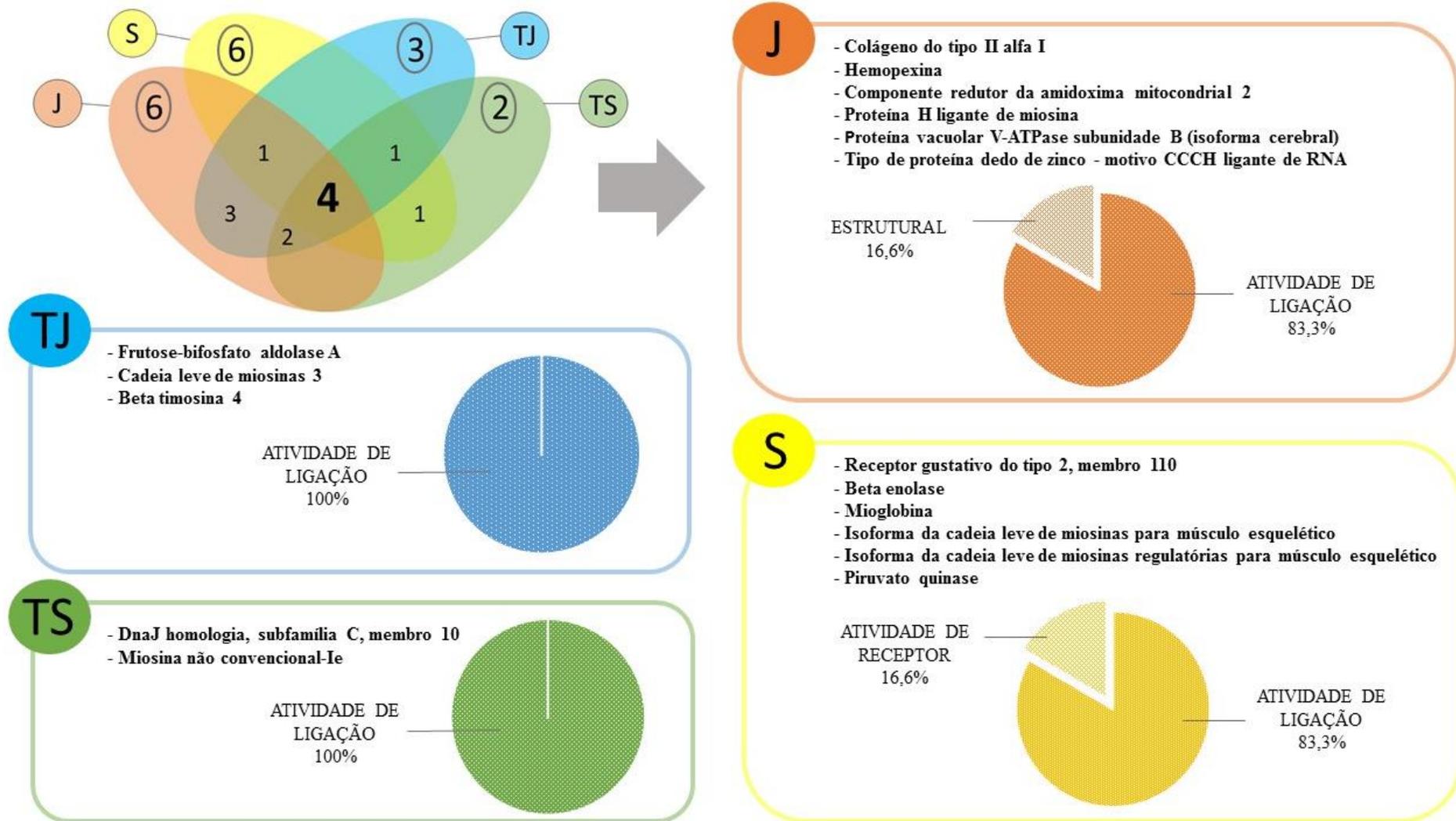


Fig. III: Diagrama de Veens. Análise por meio do Diagrama de Veens para elucidar as proteínas identificadas entre os grupos jovem (J), treinado jovem (TJ), senil (S) e treinado senil (TS). As proteínas diferencialmente expressas foram sinalizadas e classificadas por meio das suas funções moleculares, de acordo com as informações da Gene Ontologies (GO).

## PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM MAIS DE UM GRUPO

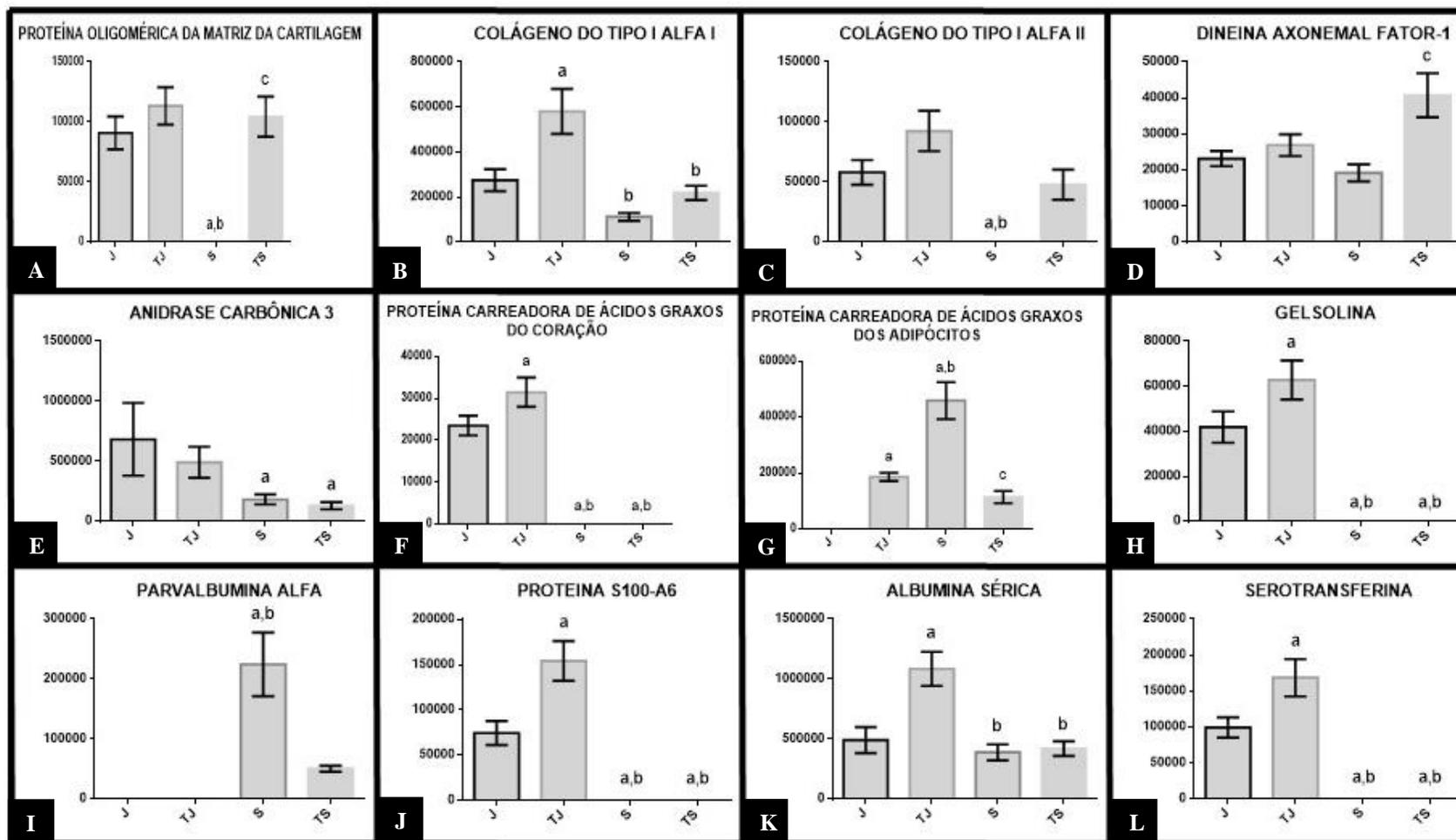


Fig. IV: Efeito do Envelhecimento e do TF na proteômica do TC. Níveis de intensidade expressos em unidades arbitrárias do TC. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. Foram analisados os grupos experimentais jovem (J), treinado jovem (TJ), senil (S) e treinado senil (TS). Das proteínas COMP (A), COL1A1 (B), COL1A2 (C), DNAAF1 (D), CAIII (E), FAPB3 (F), FAPB4 (G), GSN (H), PVALB (I), S100-A6 (J), ALB (K) e Tf (L). a =  $P < 0.05$ : comparado ao grupo jovem; b =  $P < 0.05$ : comparado ao grupo treinado jovem, c =  $P < 0.05$ : comparado ao senil.

#### 4.4 Discussão

O envelhecimento ou a realização de um TF, processos que envolvem alterações da fisiologia corporal, ativa uma cascata de eventos moleculares, modulando a síntese e degradação proteica em todos os tecidos do sistema músculo-esquelético, podendo alterar o tipo ou gerar diferentes níveis de regulação proteica positiva ou negativa (Birch *et al.*, 1999; Bloomquist *et al.*, 2013; Peffers *et al.*, 2014).

Nesse estudo proteômico do TC, ocorreram alterações proteicas ocasionadas pelo envelhecimento e/ou TF. Os resultados demonstraram a presença de proteínas diferenciais em cada grupo, além de diferentes regulações proteicas em proteínas comuns entre os quatro grupos.

Quanto às proteínas diferenciais, 88% desempenham papel de ligação, podendo induzir a mudanças na conformação proteica do tendão. Destaca-se a presença da proteína beta-enolase ( $\beta$ -enolase) no grupo S, cuja função é a de produção de energia. Resultados prévios demonstraram a ligação do aumento da sua regulação, com a elevação dos danos oxidativos ao tecido, além das perturbações ligadas ao metabolismo energético em função do envelhecimento (Fugere *et al.*, 2006). Esses resultados reforçam a hipótese de um perfil proteômico com aspectos deletérios no tendão senil.

Enfatizamos também a presença de um colágeno pouco típico no tecido tendíneo, o colágeno do tipo II alfa I (COL2A1), encontrado no grupo J. Esse colágeno é presente em tendões em pequena quantidade e concentra-se geralmente junto à inserção do osso. É mais veementemente encontrado em tecidos ósseos (placas de crescimento) e cartilagens (Buckley *et al.*, 2013).

A presença de isoformas de miosinas, em todos os grupos analisados, reforça uma ideia anteriormente já estabelecida, da presença de componentes estruturais e mecanismos para a atividade contrátil, como as proteínas do tipo muscular em células não musculares (Weintraub, 2003).

As proteínas comuns entre os grupos, cuja ênfase foi atribuída durante a discussão, demonstraram diferentes regulações ocasionadas pelos dois fatores (envelhecimento e TF) analisados.

Sete dessas proteínas (COMP, COL1A1, COL1A2, CAIII, FAPB3, GSN, S100A6 e Tf) demonstraram níveis de intensidade diminuídos em função do envelhecimento, oito (COMP, COL1A1, DNAAF1, FAPB3, GSN, S100A6, ALB e Tf)

tiveram regulações positivas com o protocolo de TF e, em duas (COMP e DNAAF1), foi possível observar a ação do TF diretamente no tendão senil.

Na sequência, os parágrafos serão divididos em três subunidades. Primeiramente, discutem-se as proteínas que já foram descritas em tendões com regulação em virtude do TF e do envelhecimento; depois, as proteínas que a literatura já evidenciava no tecido tendíneo e, por final, as proteínas que não eram vinculadas ao tendão até o momento.

## **PROTEÍNAS LIGADAS AO TENDÃO COM ASSOCIAÇÕES AO ENVELHECIMENTO/TF:**

### **Proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP)**

A COMP é uma glicoproteína pentamérica (cinco subunidades idênticas), anexada através de ligações de dissulfeto nos seus N terminais e C terminais, não colagenosa da matriz extracelular (Efimov *et al.*, 1994). Estudos moleculares têm elucidado que a COMP se liga a colágenos fibrilares do tipo I, II e IX, por meio dos seus domínios C terminais por meio de um mecanismo dependente de zinco (Dicesare *et al.*, 1994; Rosenberg *et al.*, 1998).

Dessa forma, age como uma proteína catalisadora de fibrilogêneses de colágeno, tendo importante papel nos níveis de resistência das mesmas, além de regular a montagem das fibrilas extracelulares (Ribbans e Collins, 2013; Sodersten *et al.*, 2013; Peffers *et al.*, 2014). Provavelmente, também desempenha papel estrutural e de interação com os tenócitos (Smith *et al.*, 1999). Nos tendões, é mais veementemente encontrada, quando estes são expostos a cargas compressivas (Sodersten *et al.*, 2013).

Nossos resultados evidenciam que o envelhecimento ocasionou uma extrema redução no nível de COMP, seguido de um aumento expressivo quando o TF foi associado ao grupo senil. O decréscimo de COMP, observado durante a senilidade, pode ter repercussões negativas, acarretando danos funcionais e mecânicos nos tendões, devido à ligação dessa proteína com a rede de colágenos (Smith, Gerard, *et al.*, 2002; Halasz *et al.*, 2007). Dessa forma, o TF entra como ferramenta importante para a manutenção de eventuais danos, por meio da regulação positiva de COMP, evidenciada em nossos resultados.

Estudos realizados em equinos sugerem que os níveis de COMP se elevam em consequência da inclusão de exercícios que envolvam aspectos aeróbicos e do TF (Smith

*et al.*, 1997; Cherdchutham *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999). Essas alterações variam em virtude dos regimes de exercícios realizados, o que resulta em diferenças na força tendínea. Os autores ainda apontam que a inclusão de exercícios com intensidade excessiva (*overtrainig*) ou a falta de atividade física está associada a resultados negativos em relação ao nível de COMP (Cherdchutham *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999). O TF gera reações inflamatórias no tecido, oriundas do grande aporte de carga utilizado. No entanto, em situações patológicas, como a tendinopatia, em que o mesmo processo fisiológico acontece, estudos recentes evidenciam diminuição na expressão de proteínas marcadoras de cartilagem, como a COMP (Jelinsky *et al.*, 2011).

Quanto aos aspectos relacionados ao envelhecimento, ainda em equinos, os níveis de COMP se mostraram elevados até os 3 anos de idade, quando, então, tiveram um decréscimo contínuo durante a maturidade, indo ao encontro dos nossos resultados (Smith *et al.*, 1997).

### **Colágeno do tipo 1 Alfa 1 (COL1A1) e Colágeno do tipo 1 Alfa 2 (COL1A2)**

As fibras de colágeno do tipo I são os principais constituintes da rede colagênica presente no tecido tendíneo, totalizando 60-80% de toda a massa do tendão. Os dois maiores responsáveis pela regulação da produção de colágeno são os genes de COL1A1 e COL1A2, que codificam os polipeptídios de COL1A1 e COL1A2 para a formação do colágeno tipo 1 (Maffulli *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que a quantidade de colágeno do tipo I aumenta em estados inflamatórios patológicos (tendinopatias) (Ireland *et al.*, 2001; Jelinsky *et al.*, 2011). Esse aumento na síntese também é percebido em virtude da exposição à carga mecânica no tendão (Miller *et al.*, 2005; Heinemeier *et al.*, 2007). Em relação ao envelhecimento, estudos morfológicos e mecânicos já demonstraram aumento da quantidade de colágenos em função da senilidade (Ippolito *et al.*, 1980; Shadwick, 1990). Em estudo proteômico, foi evidenciada a presença do COL1A2 no grupo senil, como uma proteína diferencial (Peffer *et al.*, 2014).

Nossos resultados também demonstraram uma regulação positiva do COL1A1, ocasionada pelo aporte de carga observada na comparação entre os grupos TJ e J; porém, com relação ao envelhecimento, foi evidenciada uma redução importante da intensidade de COL1A2. O aumento de COL1A1, evidenciado com o TF, pode demonstrar a ação musculotendínea, em que uma provável hipertrofia muscular tende a tornar a rede

colagênica do tendão mais resistente, incidindo positivamente na elevação da rigidez estrutural do tecido tendíneo.

## **PROTEÍNAS COM ESTUDOS PRÉVIOS LIGADOS AOS ASPECTOS TENDÍNEOS**

### **Anidrase carbônica III (CAIII)**

A CAIII pertence à classe das metaloenzimas que catalisam a hidratação reversível do dióxido de carbono e é diferentemente expressa em um grande número de variadas células (Shima *et al.*, 1983).

Estudos evidenciaram a presença dessa proteína no TC lesado de coelhos, que passaram por mobilização precoce após 3 dias de pós-operatório (Jialili *et al.*, 2011). No atual estudo, o aumento da atividade mecânica tendínea, com a associação do TF, não provocou alteração no nível de expressão dessa proteína nos grupos TJ e TS. No entanto, foi demonstrada uma diminuição no nível dessa proteína com o envelhecimento. Os níveis de concentração de CAIII podem ter correlação com a produção de testosterona, em animais do sexo masculino (Jeffery *et al.*, 1988). Resultados prévios em tecido muscular de ratos demonstraram que, em músculos com fibras rápidas, a intensidade de CAIII alcançou seu pico máximo, quando o animal completou 800 dias (senilidade). No entanto, o contrário aconteceu, quando as fibras musculares eram do tipo lenta, demonstrando um declínio na intensidade nesta mesma data (Jeffery *et al.*, 1988).

### **Gelsolina (GSN)**

A GSN é uma proteína reguladora do citoesqueleto com capacidade para controlar a estrutura da actina (montagem e desmontagem) (Nuerai *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a imobilização da estrutura lesada, após uma cirurgia de TC em coelhos, levou a uma diminuição do nível dessa proteína, quando comparada ao grupo controle do estudo (não imobilizado) (Nuerai *et al.*, 2011). Nesse mesmo contexto, outros estudos mostraram aumento do nível de GSN no grupo que recebeu mobilização precoce, logo após a cirurgia reparadora (Jielile *et al.*, 2012).

A questão da imobilização pode ser comparada aos aspectos referentes ao envelhecimento. Durante a fase de senilidade, muitos idosos acabam por diminuir qualquer tipo de atividade física. Nossos resultados demonstraram que o grupo S teve uma grande diminuição em relação ao nível dessa proteína, comparada ao grupo J, e nem

mesmo a associação do TF foi capaz de causar algum tipo de *upregulation* no envelhecimento. Não existem, até o momento, dados que relacionem essa regulação negativa à senilidade. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar tal efeito.

Em outros tecidos de ratos senis (córtex, hipocampo, coração, fígado, estômago), os níveis de GSN estavam aumentados no envelhecimento e foram associados à função de resistência à apoptose da proteína (Ahn *et al.*, 2003).

No entanto, nos grupos jovens, os resultados foram diferentes, e o TF foi capaz de modular a intensidade de GSN, promovendo um aumento dessa proteína no grupo TJ em relação ao J, sinalizando que o movimento e a demanda de força, acarretada pelo TF, ativam o citoesqueleto de maneira expressiva.

### **Proteína S100-A6 (S100A6)**

A S100A6 é uma proteína de ligação ao cálcio que tem, dentre as suas funções, a proliferação e diferenciação de células, a homeostase do cálcio e degeneração neuronal. Pode desempenhar um papel indireto em muitos processos fisiológicos, tais como a reorganização do citoesqueleto de actina (microtúbulos) e a motilidade celular (Yamada e Jinno, 2012). Essa proteína teve grandes níveis de expressão em fibroblastos, células presentes nos tecidos conjuntivos, como os tendões e células epiteliais (Kuznicki *et al.*, 1992).

Nossos resultados evidenciaram um aumento na expressão de S100A6 com a associação do TF no grupo TJ. Essa regulação positiva tem grande importância para o meio celular, pois pode aumentar ainda mais a ação dessa proteína na composição do citoesqueleto, por meio da reorganização dos microtúbulos, auxiliando em diversas funções, como manutenção e organização celular, movimentação celular e transporte de substâncias (Yamada e Jinno, 2012).

### **Albumina Sérica (ALB)**

A ALB é um regulador da pressão osmótica do sangue. Baixas taxas dessa proteína são comumente interligadas com uma saúde deficitária e até mortalidade (Schalk *et al.*, 2005). Estudos prévios em populações idosas demonstram a ligação entre a baixa concentração de ALB e a diminuição da funcionalidade do indivíduo (Schalk *et al.*, 2005; Visser *et al.*, 2005). No entanto, nossos resultados não demonstraram diferença significativa nos níveis dessa proteína entre o grupo J e S.

Em outra perspectiva, foi evidenciado um aumento na expressão dessa proteína no grupo TJ em relação ao seu semelhante sedentário. Outros estudos já faziam essa correlação entre o aumento de intensidade da ALB, ocasionado pelo TF, em um grupo com doença crônica de rim (Moinuddin e Leehey, 2008). Essa regulação positiva pode ter explicação no aumento do fluxo sanguíneo em virtude do treinamento exposto. Contudo, resultados prévios demonstraram a presença dessa proteína no TC de coelhos que ficaram imobilizados do membro, após cirurgia no local (Jialili *et al.*, 2011).

### **Serotransferrina (Tf)**

Tf é uma proteína responsável pelo transporte de ferro e estimulação da proliferação celular. Os resultados encontrados foram semelhantes à proteína ALB. Dessa forma, foi evidenciada uma regulação positiva no grupo TJ em relação ao grupo J. Com base na sua função de transportar ferro que, por sua vez, transporta oxigênio e elétrons para as células, podemos supor que o aumento de demanda dessas moléculas, em função do treinamento exposto, foi o efeito causador da elevação de intensidade da proteína.

Outros estudos demonstram a ligação dessa proteína com aspectos inflamatórios do tecido, ao evidenciarem um aumento de intensidade por até 48 horas após lesão do tendão de ratos, comparado ao grupo sem lesão (Gianazza *et al.*, 2002).

## **PROTEÍNAS SEM DESCRIÇÃO PRÉVIA ENCONTRADAS NO TENDÃO**

### **Proteína carreadora de ácidos graxos dos adipócitos (FAPB4) e Proteína carreadora de ácidos graxos do coração (FAPB3)**

FAPB4 e FAPB3 são pequenas proteínas citoplasmáticas, abundantemente expressas em tecidos com um metabolismo de ácidos graxos ativo. Fazem parte da superfamília de proteínas ligadas aos ácidos graxos (Xu *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2013). FAPB4 tem, como principal função, o transporte de proteínas lipídicas para os adipócitos. Pode ser um importante regulador da sensibilidade sistêmica da insulina e lipídios, além de atuar no metabolismo da glicose (Xu *et al.*, 2006).

FAPB3 é muito encontrada nos miócitos cardíacos. Vem sendo utilizada na prática clínica como um marcador precoce, altamente sensível de lesão do miocárdio (Carroll *et al.*, 2013). Nossos resultados demonstraram um aumento da FAPB4 no grupo S, comparado aos outros três grupos. Curiosamente, a morfometria do TC desse estudo

mostrou um grande número de adipócitos presentes no grupo S (dados não publicados), o que corrobora com os resultados da proteômica.

No entanto, FAPB3 demonstrou uma grande queda no seu nível com a senilidade e um aumento no grupo TJ com a inserção do treinamento de força. Estudos prévios relatam o aumento nos níveis de FAPB3, em virtude do treinamento físico crônico e agudo no tecido cardíaco e no plasma (Zonderland *et al.*, 1999; Delacour *et al.*, 2007). Sua expressão tem sido relacionada ao aumento na captação de ácidos graxos de cadeia longa (AGL), efeito que ocorre mediante o exercício físico (Murphy *et al.*, 1996; Shearer *et al.*, 2005). É a primeira vez que essas proteínas foram sinalizadas no tecido tendíneo.

### **Parvalbumina Alfa (PVALB)**

PVALB é uma proteína ligante de cálcio, envolvido em diversas funções biológicas. Em virtude disso, é possível o aparecimento dessa proteína em variados tecidos (muscular, cerebral e ósseo) (Berchtold *et al.*, 1984). Nos músculos, desempenha o papel de regular a contração e o relaxamento muscular. Estudos prévios demonstraram uma diminuição no nível dessa proteína em tecido muscular com o envelhecimento, que foi revertida em função da inserção de um protocolo de exercícios de corrida com alta intensidade (Cai *et al.*, 2001). Outros estudos demonstraram técnicas que visam ao aumento de intensidade dessa proteína (transferência de genes do plasmídeo que codifica a proteína), durante o envelhecimento, que funcionaram como uma grande estratégia na atenuação dos *déficits* estruturais e funcionais decorrentes da senilidade, como os problemas com a contratilidade muscular, oriundos da sarcopenia (Murphy *et al.*, 2012).

Diferentemente, nossos resultados evidenciaram a presença de PVALB em tendões de ratos senis, com ênfase no grupo sedentário. No entanto, até o momento, PVALB não havia sido descrita no tecido tendíneo. Identificamos, por meio da coloração de alizarina, a presença de cálcio apenas no grupo S, o que pode contribuir com o achado da PVALB nesse grupo (dados ainda não publicados).

Em estudos envolvendo a inserção de exercícios físicos, foi observado um aumento no nível de PVALB no hipocampo de ratos (21 dias de idade), que foram submetidos a exercícios físicos aeróbios. Esses dados relacionariam alterações plásticas no sistema nervoso central, particularmente no hipocampo, com a associação do exercício físico regular durante o período do desenvolvimento cerebral (Gomes Da Silva *et al.*, 2010).

### **Dineína axonemal fator-1 (DNAAF1)**

Existem três famílias de proteínas que, juntas, formam o motor do citoesqueleto, realizando o transporte de células, materiais e estruturas. São elas: miosinas, kinesinas e as dineínas (Hook e Vallee, 2006). As dineínas são proteínas de múltiplas subunidades. Existem duas classes principais, as axonemais e as citoplasmáticas. Os axonemas são estruturas em torno das quais todos os cílios e flagelos eucariotas são formados. A classe de dineínas axonemais está associada aos microtúbulos e fica alinhada ao longo do exterior ou interior destes. São responsáveis pela orientação do movimento dos cílios e flagelos, além de manter o Retículo Endoplasmático e o Complexo de Golgi em suas posições no citoplasma, determinando a polaridade celular (Hook e Vallee, 2006).

Até o momento, não existiam dados da presença dessa proteína no tecido tendíneo. Nosso estudo foi o primeiro a evidenciar tal fato e relacionar um aumento de intensidade dessa proteína promovida pelo TF no grupo TS.

### **4.5 Conclusão**

Neste estudo, foi observada uma diminuição na intensidade de proteínas ligadas a diversos aspectos (estruturais e celulares) do tecido tendíneo com o envelhecimento. O TF foi capaz de modular, positivamente, proteínas com baixos níveis encontrados na senilidade, sendo ainda mais efetivo na regulação proteica durante a jovialidade.

Dessa forma, este estudo inovador aprofundou e aumentou os conhecimentos em relação aos eventos moleculares ocorridos com o envelhecimento e o TF no tendão, confirmando nossa prévia hipótese de que os efeitos deletérios ocorridos durante a senilidade no tendão podem ser freados ou, até mesmo revertidos com a inserção do TF.

### **4.6 Referências**

AHN, J. S. et al. Aging-associated increase of gelsolin for apoptosis resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 312, n. 4, p. 1335-41, Dec 26 2003. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652020> >.

ARAMPATZIS, A.; KARAMANIDIS, K.; ALBRACHT, K. Adaptational responses of the human Achilles tendon by modulation of the applied cyclic strain magnitude. **J Exp Biol**, v. 210, n. Pt 15, p. 2743-53, Aug 2007. ISSN 0022-0949 (Print)

0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644689> >.

ARAMPATZIS, A. et al. Plasticity of human Achilles tendon mechanical and morphological properties in response to cyclic strain. **J Biomech**, v. 43, n. 16, p. 3073-9, Dec 1 2010. ISSN 1873-2380 (Electronic)

0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863501> >.

BERCHTOLD, M. W.; CELIO, M. R.; HEIZMANN, C. W. Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. Quantitation and immunohistochemical localization. **J Biol Chem**, v. 259, n. 8, p. 5189-96, Apr 25 1984. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6715341> >.

BIRCH, H. L. et al. Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. **Equine Vet J**, v. 31, n. 5, p. 391-6, Sep 1999. ISSN 0425-1644 (Print)

0425-1644 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505954> >.

BLOOMQUIST, K. et al. Effect of range of motion in heavy load squatting on muscle and tendon adaptations. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 8, p. 2133-42, Aug 2013. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604798> >.

BUCKLEY, M. R. et al. Distributions of types I, II and III collagen by region in the human supraspinatus tendon. **Connect Tissue Res**, v. 54, n. 6, p. 374-9, 2013. ISSN 1607-8438 (Electronic)

0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088220> >.

CAI, D. Q. et al. Parvalbumin expression is downregulated in rat fast-twitch skeletal muscles during aging. **Arch Biochem Biophys**, v. 387, n. 2, p. 202-8, Mar 15 2001. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11370842> >.

CARROLL, C. et al. Heart-type fatty acid binding protein as an early marker for myocardial infarction: systematic review and meta-analysis. **Emerg Med J**, v. 30, n. 4, p. 280-6, Apr 2013. ISSN 1472-0213 (Electronic)

1472-0205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593266> >.

CHERDCHUTHAM, W. et al. Age-related changes and effect of exercise on the molecular composition of immature equine superficial digital flexor tendons. **Equine Vet J Suppl**, n. 31, p. 86-94, Nov 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10999666> >.

COUPPE, C. et al. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 3, p. 880-6, Sep 2009. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556458> >.

COUPPE, C. et al. Habitual loading results in tendon hypertrophy and increased stiffness of the human patellar tendon. **J Appl Physiol** (1985), v. 105, n. 3, p. 805-10, Sep 2008. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556433> >.

DELACOUR, H. et al. [Variations of plasma concentrations of h-FABP during a muscular exercise]. **Ann Biol Clin (Paris)**, v. 65, n. 1, p. 27-32, Jan-Feb 2007. ISSN 0003-3898 (Print)

0003-3898 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17264036> >.

DICESARE, P. et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. **FEBS Lett**, v. 354, n. 2, p. 237-40, Nov 7 1994. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957930> >.

DIVISION, U. N. D. O. E. A. S. A. P. World Populations Prospect - The 2012 Revision. **Department of Economic and Social Affairs**, 2012.

DUDHIA, J. et al. Aging enhances a mechanically-induced reduction in tendon strength by an active process involving matrix metalloproteinase activity. **Aging Cell**, v. 6, n. 4, p. 547-56, Aug 2007. ISSN 1474-9718 (Print)

1474-9718 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578513> >.

EFIMOV, V. P.; LUSTIG, A.; ENGEL, J. The thrombospondin-like chains of cartilage oligomeric matrix protein are assembled by a five-stranded alpha-helical bundle between residues 20 and 83. **FEBS Lett**, v. 341, n. 1, p. 54-8, Mar 14 1994. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137922> >.

FUGERE, N. A.; FERRINGTON, D. A.; THOMPSON, L. V. Protein nitration with aging in the rat semimembranosus and soleus muscles. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 61, n. 8, p. 806-12, Aug 2006. ISSN 1079-5006 (Print)

1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912096> >.

GIANAZZA, E. et al. Monitoring the effects of drug treatment in rat models of disease by serum protein analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 771, n. 1-2, p. 107-30, May 5 2002. ISSN 1570-0232 (Print)

1570-0232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015995> >.

GOMES DA SILVA, S. et al. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain Dev**, v. 32, n. 2, p. 137-42, Feb 2010. ISSN 1872-7131 (Electronic)

0387-7604 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168302> >.

HALASZ, K. et al. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. **J Biol Chem**, v. 282, n. 43, p. 31166-73, Oct 26 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17716974> >.

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**, v. 582, n. Pt 3, p. 1303-16, Aug 1 2007. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540706> >.

HOLLMANN, W. et al. Physical activity and the elderly. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 14, n. 6, p. 730-9, Dec 2007. ISSN 1741-8267 (Print)

1741-8267 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043292> >.

HOOK, P.; VALLEE, R. B. The dynein family at a glance. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 21, p. 4369-71, Nov 1 2006. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074830> >.

IBGE. Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980-2050. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010.

IPPOLITO, E. et al. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. **J Bone Joint Surg Am**, v. 62, n. 4, p. 583-98, 1980. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6991502> >.

IRELAND, D. et al. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. **Matrix Biol**, v. 20, n. 3, p. 159-69, Jun 2001. ISSN 0945-053X (Print)

0945-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420148> >.

JEFFERY, S. et al. The effects of aging on carbonic anhydrase concentrations in rat liver and skeletal muscle. **Biochem J**, v. 250, n. 1, p. 303-5, Feb 15 1988. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3128278> >.

JELINSKY, S. A. et al. Regulation of gene expression in human tendinopathy. **BMC Musculoskeletal Disord**, v. 12, p. 86, 2011. ISSN 1471-2474 (Electronic)

1471-2474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539748> >.

JIALILI, A. et al. Differentially expressed proteins on postoperative 3 days healing in rabbit Achilles tendon rupture model after early kinesitherapy. **Chin J Traumatol**, v. 14, n. 2, p. 84-91, Apr 1 2011. ISSN 1008-1275 (Print)

1008-1275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21453573> >.

JIELILE, J. et al. Active Achilles tendon kinesitherapy accelerates Achilles tendon repair by promoting neurite regeneration. **Neural Regen Res**, v. 7, n. 35, p. 2801-10, Dec 15 2012. ISSN 1673-5374 (Print)

1673-5374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25317130> >.

KJAER, M. et al. Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 5, n. 1, p. 41-52, Mar 2005. ISSN 1108-7161 (Print)

1108-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788870> >.

KUZNICKI, J. et al. Calcyclin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. **Exp Cell Res**, v. 200, n. 2, p. 425-30, Jun 1992. ISSN 0014-4827 (Print)

0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1572406> >.

MAFFULLI, N. et al. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. **Am J Sports Med**, v. 28, n. 4, p. 499-505, Jul-Aug 2000. ISSN 0363-5465 (Print)

0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921640> >.

MAFFULLI, N. et al. The genetics of sports injuries and athletic performance. **Muscles Ligaments Tendons J**, v. 3, n. 3, p. 173-89, 2013. ISSN 2240-4554 (Electronic)

2240-4554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367777> >.

MILLER, B. F. et al. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. **J Physiol**, v. 567, n. Pt 3, p. 1021-33, Sep 15 2005. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002437> >.

MOINUDDIN, I.; LEEHEY, D. J. A comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 15, n. 1, p. 83-96, Jan 2008. ISSN 1548-5609 (Electronic)

1548-5609 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155113> >.

MURPHY, E. J. et al. Liver fatty acid-binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake and metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1301, n. 3, p. 191-8, Jun 11 1996. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8664328> >.

MURPHY, K. T. et al. Parvalbumin gene transfer impairs skeletal muscle contractility in old mice. **Hum Gene Ther**, v. 23, n. 8, p. 824-36, Aug 2012. ISSN 1557-7422 (Electronic)

1043-0342 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22455364> >.

NACHEMSON, A. L.; EVANS, J. H. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum). **J Biomech**, v. 1, n. 3, p. 211-20, Aug 1968. ISSN 0021-9290 (Print)

0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16329292> >.

NAKAGAKI, W. R. et al. Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. **Connect Tissue Res**, v. 48, n. 5, p. 219-28, 2007. ISSN 0300-8207 (Print)

0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882697> >.

NOYES, F. R.; GROOD, E. S. The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys. **J Bone Joint Surg Am**, v. 58, n. 8, p. 1074-82, Dec 1976. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1002748> >.

NUERAI, S. et al. Kazakh therapy on differential protein expression of Achilles tendon healing in a 7-day postoperative rabbit model. **J Tradit Chin Med**, v. 31, n. 4, p. 367-75, Dec 2011. ISSN 0255-2922 (Print)

0255-2922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22462247> >.

O'BRIEN, M. The anatomy of the Achilles tendon. **Foot Ankle Clin**, v. 10, n. 2, p. 225-38, Jun 2005. ISSN 1083-7515 (Print)

1083-7515 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922915> >.

PATARIDIS, S. et al. Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. **J Sep Sci**, v. 31, n. 20, p. 3483-8, Oct 2008. ISSN 1615-9314 (Electronic)

1615-9306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18837476> >.

PEFFERS, M. J. et al. Proteomic analysis reveals age-related changes in tendon matrix composition, with age- and injury-specific matrix fragmentation. **J Biol Chem**, v. 289, n. 37, p. 25867-78, Sep 12 2014. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077967> >.

RIBBANS, W. J.; COLLINS, M. Pathology of the tendo Achillis: do our genes contribute? **Bone Joint J**, v. 95-B, n. 3, p. 305-13, Mar 2013. ISSN 2049-4408 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450012> >.

ROSENBERG, K. et al. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. **J Biol Chem**, v. 273, n. 32, p. 20397-403, Aug 7 1998. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685393> >.

SCHALK, B. W. et al. Change in serum albumin and subsequent decline in functional status in older persons. **Aging Clin Exp Res**, v. 17, n. 4, p. 297-305, Aug 2005. ISSN 1594-0667 (Print) 1594-0667 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16285196> >.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 65, n. 9, p. 963-75, Sep 2010. ISSN 1758-535X (Electronic) 1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478906> >.

SHADWICK, R. E. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. **J Appl Physiol** (1985), v. 68, n. 3, p. 1033-40, Mar 1990. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2341331> >.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 6, n. 2, p. 181-90, Apr-Jun 2006. ISSN 1108-7161 (Print) 1108-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849830> >.

SHEARER, J. et al. Heart-type fatty acid-binding protein reciprocally regulates glucose and fatty acid utilization during exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 2, p. E292-7, Feb 2005. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454399> >.

SHIMA, K. et al. Carbonic anhydrase-III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. **Acta Neuropathol**, v. 59, n. 3, p. 237-9, 1983. ISSN 0001-6322 (Print) 0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6221502> >.

SMITH, R. K. et al. Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. **Equine Vet J Suppl**, n. 30, p. 201-9, Jul 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10659252> >.

SMITH, R. K. et al. Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. **Equine Vet J Suppl**, n. 34, p. 241-4, Sep 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405694> >.

SMITH, R. K. et al. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. **Matrix Biol**, v. 16, n. 5, p. 255-71, Nov 1997. ISSN 0945-053X (Print) 0945-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501326> >.

SMITH, S. M.; THOMAS, C. E.; BIRK, D. E. Pericellular proteins of the developing mouse tendon: a proteomic analysis. **Connect Tissue Res**, v. 53, n. 1, p. 2-13, 2012. ISSN 1607-8438 (Electronic) 0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851252> >.

SODERSTEN, F. et al. Immunolocalization of collagens (I and III) and cartilage oligomeric matrix protein in the normal and injured equine superficial digital flexor tendon. **Connect Tissue Res**, v. 54, n. 1, p. 62-9, 2013. ISSN 1607-8438 (Electronic) 0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020676> >.

TKACZUK, H. Tensile properties of human lumbar longitudinal ligaments. **Acta Orthop Scand**, p. Suppl 115:1+, 1968. ISSN 0001-6470 (Print) 0001-6470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5707337> >.

TUMILTY, S. et al. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 1, p. 3-16, Feb 2010. ISSN 1557-8550 (Electronic) 1549-5418 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19708800> >.

VERRILLS, N. M. Clinical proteomics: present and future prospects. **Clin Biochem Rev**, v. 27, n. 2, p. 99-116, May 2006. ISSN 0159-8090 (Print) 0159-8090 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077880> >.

VISSER, M. et al. Lower serum albumin concentration and change in muscle mass: the Health, Aging and Body Composition Study. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 3, p. 531-7, Sep 2005. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155264> >.

VOGEL, H. G. Species differences of elastic and collagenous tissue--influence of maturation and age. **Mech Ageing Dev**, v. 57, n. 1, p. 15-24, Jan 1991. ISSN 0047-6374 (Print) 0047-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2002697> >.

WANG, J. H. Mechanobiology of tendon. **J Biomech**, v. 39, n. 9, p. 1563-82, 2006. ISSN 0021-9290 (Print) 0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000201> >.

WEINTRAUB, W. **Tendon and Ligament Healing: A New Approach to Sports and Overuse Injury**. 2003. 236.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology (N Y)**, v. 14, n. 1, p. 61-5, Jan 1996. ISSN 0733-222X (Print) 0733-222X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636313> >.

XU, A. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. **Clin Chem**, v. 52, n. 3, p. 405-13, Mar 2006. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423904> >.

YAMADA, J.; JINNO, S. Upregulation of calcium binding protein, S100A6, in activated astrocytes is linked to glutamate toxicity. **Neuroscience**, v. 226, p. 119-29, Dec 13 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22982625> >.

ZONDERLAND, M. L. et al. Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 79, n. 5, p. 391-6, Apr 1999. ISSN 0301-5548 (Print)

0301-5548 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208246> >.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, M. et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 3, p. 235, 2009. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19591655> >.

AHN, J. S. et al. Aging-associated increase of gelsolin for apoptosis resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 312, n. 4, p. 1335-41, Dec 26 2003. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652020> >.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, M. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009. ISSN 1530-0315 (Electronic)

0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204579> >.

ARAMPATZIS, A.; KARAMANIDIS, K.; ALBRACHT, K. Adaptational responses of the human Achilles tendon by modulation of the applied cyclic strain magnitude. **J Exp Biol**, v. 210, n. Pt 15, p. 2743-53, Aug 2007. ISSN 0022-0949 (Print)

0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644689> >.

ARAMPATZIS, A. et al. Plasticity of human Achilles tendon mechanical and morphological properties in response to cyclic strain. **J Biomech**, v. 43, n. 16, p. 3073-9, Dec 1 2010. ISSN 1873-2380 (Electronic)

0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863501> >.

BAILEY, A. J. et al. Collagen polymorphism in experimental granulation tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 66, n. 4, p. 1160-5, Oct 27 1975. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1191284> >.

BENJAMIN, M.; KAISER, E.; MILZ, S. Structure-function relationships in tendons: a review. **J Anat**, v. 212, n. 3, p. 211-28, Mar 2008. ISSN 1469-7580 (Electronic)

0021-8782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304204> >.

BENJAMIN, M.; TYERS, R. N.; RALPHS, J. R. Age-related changes in tendon fibrocartilage. **J Anat**, v. 179, p. 127-36, Dec 1991. ISSN 0021-8782 (Print)

0021-8782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1817130> >.

BERCHTOLD, M. W.; CELIO, M. R.; HEIZMANN, C. W. Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. Quantitation and immunohistochemical localization. **J Biol Chem**, v. 259, n. 8, p. 5189-96, Apr 25 1984. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6715341> >.

BERGLUND, M. E. et al. Neuropeptide, mast cell, and myofibroblast expression after rabbit deep flexor tendon repair. **J Hand Surg Am**, v. 35, n. 11, p. 1842-9, Nov 2010. ISSN 1531-6564 (Electronic)

0363-5023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888142> >.

BIRCH, H. L. et al. Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons. **Equine Vet J**, v. 31, n. 5, p. 391-6, Sep 1999. ISSN 0425-1644 (Print)

0425-1644 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505954> >.

BLOOMQUIST, K. et al. Effect of range of motion in heavy load squatting on muscle and tendon adaptations. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 8, p. 2133-42, Aug 2013. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604798> >.

BOESEN, M. I. et al. Tendinopathy and Doppler activity: the vascular response of the Achilles tendon to exercise. **Scand J Med Sci Sports**, v. 16, n. 6, p. 463-9, Dec 2006. ISSN 0905-7188 (Print)

0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17121650> >.

BUCKLEY, M. R. et al. Distributions of types I, II and III collagen by region in the human supraspinatus tendon. **Connect Tissue Res**, v. 54, n. 6, p. 374-9, 2013. ISSN 1607-8438 (Electronic)

0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088220> >.

BURGESS, K. E. et al. Plyometric vs. isometric training influences on tendon properties and muscle output. **J Strength Cond Res**, v. 21, n. 3, p. 986-9, Aug 2007. ISSN 1064-8011 (Print)

1064-8011 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17685695> >.

BURNISTON, J. G. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity endurance exercise. **Biochim Biophys Acta**, v. 1784, n. 7-8, p. 1077-86, Jul-Aug 2008. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18482594> >.

CAI, D. Q. et al. Parvalbumin expression is downregulated in rat fast-twitch skeletal muscles during aging. **Arch Biochem Biophys**, v. 387, n. 2, p. 202-8, Mar 15 2001. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11370842> >.

CARROLL, C. et al. Heart-type fatty acid binding protein as an early marker for myocardial infarction: systematic review and meta-analysis. **Emerg Med J**, v. 30, n. 4, p. 280-6, Apr 2013. ISSN 1472-0213 (Electronic)

1472-0205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593266> >.

CHEN, H. et al. Morphological changes of skeletal muscle, tendon and periosteum in the senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. **Tissue Cell**, v. 38, n. 5, p. 325-35, Oct 2006. ISSN 0040-8166 (Print)

0040-8166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010403> >.

CHERDCHUTHAM, W. et al. Age-related changes and effect of exercise on the molecular composition of immature equine superficial digital flexor tendons. **Equine Vet J Suppl**, n. 31, p. 86-94, Nov 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10999666> >.

CHIQUET, M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. **Matrix Biol**, v. 18, n. 5, p. 417-26, Oct 1999. ISSN 0945-053X (Print)

0945-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601729> >.

CHUEN, F. S. et al. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. **J Histochem Cytochem**, v. 52, n. 9, p. 1151-7, Sep 2004. ISSN 0022-1554 (Print)

0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15314082> >.

COUPPE, C. et al. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 3, p. 880-6, Sep 2009. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556458> >.

COUPPE, C. et al. Habitual loading results in tendon hypertrophy and increased stiffness of the human patellar tendon. **J Appl Physiol (1985)**, v. 105, n. 3, p. 805-10, Sep 2008. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556433> >.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R., 3RD. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991-1000, Dec 13 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075578> >.

DEL BUONO, A. et al. Metalloproteases and tendinopathy. **Muscles Ligaments Tendons J**, v. 3, n. 1, p. 51-7, Jan 2013. ISSN 2240-4554 (Electronic)

2240-4554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885345> >.

DELACOUR, H. et al. [Variations of plasma concentrations of h-FABP during a muscular exercise]. **Ann Biol Clin (Paris)**, v. 65, n. 1, p. 27-32, Jan-Feb 2007. ISSN 0003-3898 (Print)

0003-3898 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17264036> >.

DICESARE, P. et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. **FEBS Lett**, v. 354, n. 2, p. 237-40, Nov 7 1994. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957930> >.

DIVISION, U. N. D. O. E. A. S. A. P. World Populations Prospect - The 2012 Revision. **Department of Economic and Social Affairs**, 2012.

DUDHIA, J. et al. Aging enhances a mechanically-induced reduction in tendon strength by an active process involving matrix metalloproteinase activity. **Aging Cell**, v. 6, n. 4, p. 547-56, Aug 2007. ISSN 1474-9718 (Print)

1474-9718 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578513> >.

EFIMOV, V. P.; LUSTIG, A.; ENGEL, J. The thrombospondin-like chains of cartilage oligomeric matrix protein are assembled by a five-stranded alpha-helical bundle between residues 20 and 83. **FEBS Lett**, v. 341, n. 1, p. 54-8, Mar 14 1994. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137922> >.

FOURE, A.; NORDEZ, A.; CORNU, C. Plyometric training effects on Achilles tendon stiffness and dissipative properties. **J Appl Physiol (1985)**, v. 109, n. 3, p. 849-54, Sep 2010. ISSN 1522-1601 (Electronic)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576842> >.

FRANCHI, M. et al. Collagen structure of tendon relates to function. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 404-20, 2007. ISSN 1537-744X (Electronic)

1537-744X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450305> >.

FROLKIS, V. V.; MARTYNENKO, O. A.; ZAMOSTYAN, V. P. Aging of the neuromuscular apparatus. **Gerontology**, v. 22, n. 4, p. 244-79, 1976. ISSN 0304-324X (Print)

0304-324X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1269935> >.

FUGERE, N. A.; FERRINGTON, D. A.; THOMPSON, L. V. Protein nitration with aging in the rat semimembranosus and soleus muscles. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 61, n. 8, p. 806-12, Aug 2006. ISSN 1079-5006 (Print)

1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912096> >.

GABRIEL, D. A.; KAMEN, G.; FROST, G. Neural adaptations to resistive exercise: mechanisms and recommendations for training practices. **Sports Med**, v. 36, n. 2, p. 133-49, 2006. ISSN 0112-1642 (Print)

0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464122> >.

GAUTIERI, A. et al. Molecular and mesoscale mechanisms of osteogenesis imperfecta disease in collagen fibrils. **Biophys J**, v. 97, n. 3, p. 857-65, Aug 5 2009. ISSN 1542-0086 (Electronic)

0006-3495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651044> >.

GIANAZZA, E. et al. Monitoring the effects of drug treatment in rat models of disease by serum protein analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 771, n. 1-2, p. 107-30, May 5 2002. ISSN 1570-0232 (Print)

1570-0232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015995> >.

GOMES DA SILVA, S. et al. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain Dev**, v. 32, n. 2, p. 137-42, Feb 2010. ISSN 1872-7131 (Electronic)

0387-7604 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168302> >.

GROSSET, J. F. et al. Influence of exercise intensity on training-induced tendon mechanical properties changes in older individuals. **Age (Dordr)**, v. 36, n. 3, p. 9657, Jun 2014. ISSN 1574-4647 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760611> >.

HALASZ, K. et al. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. **J Biol Chem**, v. 282, n. 43, p. 31166-73, Oct 26 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17716974> >.

HARRIS, C. A.; PEDUTO, A. J. Achilles tendon imaging. **Australas Radiol**, v. 50, n. 6, p. 513-25, Dec 2006. ISSN 0004-8461 (Print)

0004-8461 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17107521> >.

HAUT, T. L.; HAUT, R. C. The state of tissue hydration determines the strain-rate-sensitive stiffness of human patellar tendon. **J Biomech**, v. 30, n. 1, p. 79-81, Jan 1997. ISSN 0021-9290 (Print)

0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8970928> >.

HEINEMEIER, K. et al. Role of TGF-beta1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue. **J Appl Physiol (1985)**, v. 95, n. 6, p. 2390-7, Dec 2003. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12923117> >.

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**, v. 582, n. Pt 3, p. 1303-16, Aug 1 2007. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540706> >.

HOLLMANN, W. et al. Physical activity and the elderly. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 14, n. 6, p. 730-9, Dec 2007. ISSN 1741-8267 (Print)

1741-8267 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043292> >.

HOOK, P.; VALLEE, R. B. The dynein family at a glance. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 21, p. 4369-71, Nov 1 2006. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074830> >.

HOUGHTON, L. A.; DAWSON, B. T.; RUBENSON, J. Effects of plyometric training on achilles tendon properties and shuttle running during a simulated cricket batting innings. **J Strength Cond Res**, v. 27, n. 4, p. 1036-46, Apr 2013. ISSN 1533-4287 (Electronic)

1064-8011 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739327> >.

HYNES, R. O. The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 6, p. 2588-90, Mar 16 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077553> >.

IBGE. Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980-2050. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010.

IPPOLITO, E. et al. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendon at various ages. **J Bone Joint Surg Am**, v. 62, n. 4, p. 583-98, 1980. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6991502> >.

IRELAND, D. et al. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. **Matrix Biol**, v. 20, n. 3, p. 159-69, Jun 2001. ISSN 0945-053X (Print)

0945-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420148> >.

JARVINEN, T. A. et al. Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. **J Cell Sci**, v. 112 Pt 18, p. 3157-66, Sep 1999. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462531> >.

JEFFERY, S. et al. The effects of aging on carbonic anhydrase concentrations in rat liver and skeletal muscle. **Biochem J**, v. 250, n. 1, p. 303-5, Feb 15 1988. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3128278> >.

JELINSKY, S. A. et al. Regulation of gene expression in human tendinopathy. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 12, p. 86, 2011. ISSN 1471-2474 (Electronic)

1471-2474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539748> >.

JIALILI, A. et al. Differentially expressed proteins on postoperative 3 days healing in rabbit Achilles tendon rupture model after early kinesiotherapy. **Chin J Traumatol**, v. 14, n. 2, p. 84-91, Apr 1 2011. ISSN 1008-1275 (Print)

1008-1275 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21453573> >.

JIELILE, J. et al. Active Achilles tendon kinesiotherapy accelerates Achilles tendon repair by promoting neurite regeneration. **Neural Regen Res**, v. 7, n. 35, p. 2801-10, Dec 15 2012. ISSN 1673-5374 (Print)

1673-5374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25317130> >.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scand J Med Sci Sports**, v. 10, n. 6, p. 312-20, Dec 2000. ISSN 0905-7188 (Print)

0905-7188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085557> >.

KAVATHIA, N. et al. Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. **Aging (Albany NY)**, v. 1, n. 7, p. 652-63, Jul 2009. ISSN 1945-4589 (Electronic)

1945-4589 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20157546> >.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**, v. 84, n. 2, p. 649-98, Apr 2004. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044685> >.

KJAER, M. et al. Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 5, n. 1, p. 41-52, Mar 2005. ISSN 1108-7161 (Print)

1108-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788870> >.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, n. 3, p. 231-43, 1975. ISSN 0018-7348 (Print)

0018-7348 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1093965> >.

KOCHER, T.; SUPERTI-FURGA, G. Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks. **Nat Methods**, v. 4, n. 10, p. 807-15, Oct 2007. ISSN 1548-7091 (Print)

1548-7091 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901870> >.

KONGSGAARD, M. et al. Fibril morphology and tendon mechanical properties in patellar tendinopathy: effects of heavy slow resistance training. **Am J Sports Med**, v. 38, n. 4, p. 749-56, Apr 2010. ISSN 1552-3365 (Electronic)

0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154324> >.

KONGSGAARD, M. et al. Region specific patellar tendon hypertrophy in humans following resistance training. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 191, n. 2, p. 111-21, Oct 2007. ISSN 1748-1708 (Print) 1748-1708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524067> >.

KUZNICKI, J. et al. Calcyclin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. **Exp Cell Res**, v. 200, n. 2, p. 425-30, Jun 1992. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1572406> >.

LANGBERG, H.; ROSENDAL, L.; KJAER, M. Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. **J Physiol**, v. 534, n. Pt 1, p. 297-302, Jul 1 2001. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433010> >.

MAFFULLI, N. et al. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. **Am J Sports Med**, v. 28, n. 4, p. 499-505, Jul-Aug 2000. ISSN 0363-5465 (Print) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921640> >.

MAFFULLI, N. et al. The genetics of sports injuries and athletic performance. **Muscles Ligaments Tendons J**, v. 3, n. 3, p. 173-89, 2013. ISSN 2240-4554 (Electronic) 2240-4554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367777> >.

MAGANARIS, C. N.; NARICI, M. V.; REEVES, N. D. In vivo human tendon mechanical properties: effect of resistance training in old age. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 4, n. 2, p. 204-8, Jun 2004. ISSN 1108-7161 (Print) 1108-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15615128> >.

MAGNUSSON, S. P. et al. Increased cross-sectional area and reduced tensile stress of the Achilles tendon in elderly compared with young women. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 58, n. 2, p. 123-7, Feb 2003. ISSN 1079-5006 (Print) 1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586849> >.

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**, v. 34, n. 8, p. 1274-80, Aug 2006. ISSN 0363-5465 (Print) 0363-5465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636352> >.

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**, v. 104, n. 6, p. 1087-93, Dec 2008. ISSN 1439-6319 (Print)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810485> >.

MCNEILLY, C. M. et al. Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. **J Anat**, v. 189 ( Pt 3), p. 593-600, Dec 1996. ISSN 0021-8782 (Print)

0021-8782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982835> >.

MILES, C. A. et al. The role of the alpha2 chain in the stabilization of the collagen type I heterotrimer: a study of the type I homotrimer in oim mouse tissues. **J Mol Biol**, v. 321, n. 5, p. 797-805, Aug 30 2002. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206762> >.

MILLER, B. F. et al. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. **J Physiol**, v. 567, n. Pt 3, p. 1021-33, Sep 15 2005. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002437> >.

MOINUDDIN, I.; LEEHEY, D. J. A comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 15, n. 1, p. 83-96, Jan 2008. ISSN 1548-5609 (Electronic)

1548-5595 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155113> >.

MOOR, B. K. et al. Age, trauma and the critical shoulder angle accurately predict supraspinatus tendon tears. **Orthop Traumatol Surg Res**, v. 100, n. 5, p. 489-94, Sep 2014. ISSN 1877-0568 (Electronic)

1877-0568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25012397> >.

MORSE, C. I. et al. Changes in triceps surae muscle architecture with sarcopenia. **Acta Physiol Scand**, v. 183, n. 3, p. 291-8, Mar 2005. ISSN 0001-6772 (Print)

0001-6772 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743389> >.

MORSE, C. I. et al. Gastrocnemius specific force is increased in elderly males following a 12-month physical training programme. **Eur J Appl Physiol**, v. 100, n. 5, p. 563-70, Jul 2007. ISSN 1439-6319 (Print)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16858613> >.

MORSE, C. I. et al. In vivo physiological cross-sectional area and specific force are reduced in the gastrocnemius of elderly men. **J Appl Physiol (1985)**, v. 99, n. 3, p. 1050-5, Sep 2005. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905324> >.

MURPHY, E. J. et al. Liver fatty acid-binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake and metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1301, n. 3, p. 191-8, Jun 11 1996. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8664328> >.

MURPHY, K. T. et al. Parvalbumin gene transfer impairs skeletal muscle contractility in old mice. **Hum Gene Ther**, v. 23, n. 8, p. 824-36, Aug 2012. ISSN 1557-7422 (Electronic)

1043-0342 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22455364> >.

NACHEMSON, A. L.; EVANS, J. H. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum). **J Biomech**, v. 1, n. 3, p. 211-20, Aug 1968. ISSN 0021-9290 (Print)

0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16329292> >.

NAKAGAKI, W. R. et al. Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. **Connect Tissue Res**, v. 48, n. 5, p. 219-28, 2007. ISSN 0300-8207 (Print)

0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882697> >.

NAKAGAWA, Y. et al. Age-related changes in biomechanical properties of the Achilles tendon in rabbits. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 73, n. 1-2, p. 7-10, 1996. ISSN 0301-5548 (Print)

0301-5548 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861663> >.

NAKAGAWA, Y.; MAJIMA, T.; NAGASHIMA, K. Effect of ageing on ultrastructure of slow and fast skeletal muscle tendon in rabbit Achilles tendons. **Acta Physiol Scand**, v. 152, n. 3, p. 307-13, Nov 1994. ISSN 0001-6772 (Print)

0001-6772 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7872008> >.

NOYES, F. R.; GROOD, E. S. The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys. **J Bone Joint Surg Am**, v. 58, n. 8, p. 1074-82, Dec 1976. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1002748> >.

NUERAI, S. et al. Kazakh therapy on differential protein expression of Achilles tendon healing in a 7-day postoperative rabbit model. **J Tradit Chin Med**, v. 31, n. 4, p. 367-75, Dec 2011. ISSN 0255-2922 (Print)

0255-2922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22462247> >.

O'BRIEN, M. The anatomy of the Achilles tendon. **Foot Ankle Clin**, v. 10, n. 2, p. 225-38, Jun 2005. ISSN 1083-7515 (Print)

1083-7515 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922915> >.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v. 250, n. 10, p. 4007-21, May 25 1975. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/236308> >.

ONAMBELE, G. L.; NARICI, M. V.; MAGANARIS, C. N. Calf muscle-tendon properties and postural balance in old age. **J Appl Physiol** (1985), v. 100, n. 6, p. 2048-56, Jun 2006. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455811> >.

PATARIDIS, S. et al. Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. **J Sep Sci**, v. 31, n. 20, p. 3483-8, Oct 2008. ISSN 1615-9314 (Electronic)

1615-9306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18837476> >.

PEFFERS, M. J. et al. Proteomic analysis reveals age-related changes in tendon matrix composition, with age- and injury-specific matrix fragmentation. **J Biol Chem**, v. 289, n. 37, p. 25867-78, Sep 12 2014. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077967> >.

PETRIZ, B. A. et al. Proteomics applied to exercise physiology: a cutting-edge technology. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 3, p. 885-98, Mar 2012. ISSN 1097-4652 (Electronic)

0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21503895> >.

REES, S. G. et al. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. **Biochem J**, v. 350 Pt 1, p. 181-8, Aug 15 2000. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10926842> >.

REEVES, N. D.; MAGANARIS, C. N.; NARICI, M. V. Effect of strength training on human patella tendon mechanical properties of older individuals. **J Physiol**, v. 548, n. Pt 3, p. 971-81, May 1 2003. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626673> >.

REID, K. F. et al. Muscle power failure in mobility-limited older adults: preserved single fiber function despite lower whole muscle size, quality and rate of neuromuscular activation. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 6, p. 2289-301, Jun 2012. ISSN 1439-6327 (Electronic)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005960> >.

RIBBANS, W. J.; COLLINS, M. Pathology of the tendo Achillis: do our genes contribute? **Bone Joint J**, v. 95-B, n. 3, p. 305-13, Mar 2013. ISSN 2049-4408 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450012> >.

RICH, A.; CRICK, F. H. The molecular structure of collagen. **J Mol Biol**, v. 3, p. 483-506, Oct 1961. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14491907> >.

RILEY, G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. **Rheumatology (Oxford)**, v. 43, n. 2, p. 131-42, Feb 2004. ISSN 1462-0324 (Print)

1462-0324 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867575> >.

\_\_\_\_\_. Tendinopathy--from basic science to treatment. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 4, n. 2, p. 82-9, Feb 2008. ISSN 1745-8390 (Electronic)

1745-8382 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235537> >.

RILEY, G. P. et al. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. **Ann Rheum Dis**, v. 53, n. 6, p. 359-66, Jun 1994. ISSN 0003-4967 (Print)

0003-4967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8037494> >.

RITTY, T. M.; HERZOG, J. Tendon cells produce gelatinases in response to type I collagen attachment. **J Orthop Res**, v. 21, n. 3, p. 442-50, May 2003. ISSN 0736-0266 (Print)

0736-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706016> >.

ROSENBERG, K. et al. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. **J Biol Chem**, v. 273, n. 32, p. 20397-403, Aug 7 1998. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685393> >.

SABIDO, E.; SELEVSEK, N.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry-based proteomics for systems biology. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 4, p. 591-7, Aug 2012. ISSN 1879-0429 (Electronic)

0958-1669 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169889> >.

SALE, D. G. Neural adaptation to resistance training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 20, n. 5 Suppl, p. S135-45, Oct 1988. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3057313> >.

SCHALK, B. W. et al. Change in serum albumin and subsequent decline in functional status in older persons. **Aging Clin Exp Res**, v. 17, n. 4, p. 297-305, Aug 2005. ISSN 1594-0667 (Print)

1594-0667 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16285196> >.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 65, n. 9, p. 963-75, Sep 2010. ISSN 1758-535X (Electronic)

1079-5006 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478906> >.

SHADWICK, R. E. Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age. **J Appl Physiol** (1985), v. 68, n. 3, p. 1033-40, Mar 1990. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2341331> >.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 1, p. 187-202, Jan 2005. ISSN 0021-9355 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634833> >.

\_\_\_\_\_. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **J Musculoskeletal Neuronal Interact**, v. 6, n. 2, p. 181-90, Apr-Jun 2006. ISSN 1108-7161 (Print)

1108-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849830> >.

SHEARER, J. et al. Heart-type fatty acid-binding protein reciprocally regulates glucose and fatty acid utilization during exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 2, p. E292-7, Feb 2005. ISSN 0193-1849 (Print)

0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454399> >.

SHIMA, K. et al. Carbonic anhydrase-III immunohistochemical localization in human skeletal muscle. **Acta Neuropathol**, v. 59, n. 3, p. 237-9, 1983. ISSN 0001-6322 (Print)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6221502> >.

SKLENKA, A. M.; LEVY, M. S.; BOIVIN, G. P. Effect of age on collagen fibril diameter in rabbit patellar tendon repair. **Comp Med**, v. 56, n. 1, p. 8-11, Feb 2006. ISSN 1532-0820 (Print)

1532-0820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16521853> >.

SMITH, R. K. et al. Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. **Equine Vet J Suppl**, n. 30, p. 201-9, Jul 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10659252> >.

SMITH, R. K. et al. The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration--hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n. 4, p. 1039-50, Dec 2002. ISSN 1095-6433 (Print)

1095-6433 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485691> >.

SMITH, R. K. et al. Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. **Equine Vet J Suppl**, n. 34, p. 241-4, Sep 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405694> >.

SMITH, R. K. et al. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. **Matrix Biol**, v. 16, n. 5, p. 255-71, Nov 1997. ISSN 0945-053X (Print)

0945-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501326> >.

SMITH, S. M.; THOMAS, C. E.; BIRK, D. E. Pericellular proteins of the developing mouse tendon: a proteomic analysis. **Connect Tissue Res**, v. 53, n. 1, p. 2-13, 2012. ISSN 1607-8438 (Electronic)

0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851252> >.

SODERSTEN, F. et al. Immunolocalization of collagens (I and III) and cartilage oligomeric matrix protein in the normal and injured equine superficial digital flexor tendon. **Connect Tissue Res**, v. 54, n. 1, p. 62-9, 2013. ISSN 1607-8438 (Electronic)

0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020676> >.

STENROTH, L. et al. Age-related differences in Achilles tendon properties and triceps surae muscle architecture in vivo. **J Appl Physiol (1985)**, v. 113, n. 10, p. 1537-44, Nov 2012. ISSN 1522-1601 (Electronic)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042907> >.

SUMPIO, B. E.; RILEY, J. T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 12, p. 1508-12, Dec 2002. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379270> >.

TANJORE, H.; KALLURI, R. The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. **Am J Pathol**, v. 168, n. 3, p. 715-7, Mar 2006. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507886> >.

THORPE, C. T. et al. Aspartic acid racemization and collagen degradation markers reveal an accumulation of damage in tendon collagen that is enhanced with aging. **J Biol Chem**, v. 285, n. 21, p. 15674-81, May 21 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20308077> >.

TKACZUK, H. Tensile properties of human lumbar longitudinal ligaments. **Acta Orthop Scand**, p. Suppl 115:1+, 1968. ISSN 0001-6470 (Print)

0001-6470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5707337> >.

TUMILTY, S. et al. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 1, p. 3-16, Feb 2010. ISSN 1557-8550 (Electronic)

1549-5418 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19708800> >.

VAILAS, A. C. et al. Adaptation of bone and tendon to prolonged hindlimb suspension in rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 65, n. 1, p. 373-6, Jul 1988. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3403480> >.

VERRILLS, N. M. Clinical proteomics: present and future prospects. **Clin Biochem Rev**, v. 27, n. 2, p. 99-116, May 2006. ISSN 0159-8090 (Print)

0159-8090 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077880> >.

VIIDIK, A. The effect of training on the tensile strength of isolated rabbit tendons. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 1, n. 2, p. 141-7, 1967. ISSN 0036-5556 (Print)

0036-5556 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5605143> >.

VISSER, M. et al. Lower serum albumin concentration and change in muscle mass: the Health, Aging and Body Composition Study. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 3, p. 531-7, Sep 2005. ISSN 0002-9165 (Print)

0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155264> >.

VOGEL, H. G. Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats. **Mech Ageing Dev**, v. 14, n. 3-4, p. 283-92, Nov-Dec 1980. ISSN 0047-6374 (Print)

0047-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7206819> >.

\_\_\_\_\_. Species differences of elastic and collagenous tissue--influence of maturation and age. **Mech Ageing Dev**, v. 57, n. 1, p. 15-24, Jan 1991. ISSN 0047-6374 (Print)

0047-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2002697> >.

WANG, J. H. Mechanobiology of tendon. **J Biomech**, v. 39, n. 9, p. 1563-82, 2006. ISSN 0021-9290 (Print)

0021-9290 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000201> >.

WEINTRAUB, W. **Tendon and Ligament Healing: A New Approach to Sports and Overuse Injury**. 2003. 236.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology (N Y)**, v. 14, n. 1, p. 61-5, Jan 1996. ISSN 0733-222X (Print)

0733-222X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636313> >.

WOO, S. L. et al. The effects of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. **J Biomech Eng**, v. 103, n. 1, p. 51-6, Feb 1981. ISSN 0148-0731 (Print)

0148-0731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7253614> >.

XU, A. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. **Clin Chem**, v. 52, n. 3, p. 405-13, Mar 2006. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423904> >.

YAMADA, J.; JINNO, S. Upregulation of calcium binding protein, S100A6, in activated astrocytes is linked to glutamate toxicity. **Neuroscience**, v. 226, p. 119-29, Dec 13 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22982625> >.

YAMAMOTO, N. et al. Effects of stress shielding on the mechanical properties of rabbit patellar tendon. **J Biomech Eng**, v. 115, n. 1, p. 23-8, Feb 1993. ISSN 0148-0731 (Print)

0148-0731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8445894> >.

YOON, J. H.; HALPER, J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 5, n. 1, p. 22-34, Mar 2005. ISSN 1108-7161 (Print)

1108-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788868> >.

YU, T. Y. et al. Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in tenocytes. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 14, p. 2, 2013. ISSN 1471-2474 (Electronic)

1471-2474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23281803> >.

ZHANG, G. et al. Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 5, n. 1, p. 5-21, Mar 2005. ISSN 1108-7161 (Print)

1108-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788867> >.

ZONDERLAND, M. L. et al. Different metabolic adaptation of heart and skeletal muscles to moderate-intensity treadmill training in the rat. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 79, n. 5, p. 391-6, Apr 1999. ISSN 0301-5548 (Print)

0301-5548 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208246> >.

## 6. ANEXOS

### Anexo I - Documento de Aprovação do Projeto por Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
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  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

Protocolo nº. 056/2010

A Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos – CEUA/UFSCar analisou e **APROVOU** “ad referendum” o pedido formulado pelo (a) pesquisador (a) *Rita de Cassia Marqueti* referente ao projeto “*Matriz extracelular no envelhecimento e suas adaptações ao treinamento de força no tendão calcâneo de ratos: abordagem molecular, celular e biomecânica.*”.

São Carlos, 1 de março de 2011.

  
Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

## Anexo II - Normas de Publicação do Periódico ao qual foi submetido o artigo científico em questão

# Template for Submission of Manuscripts to American Chemical Society Journals

### Word 2010, single-column, double-spaced (2013)

This template is a guide to be used to prepare manuscripts for submission. Please consult the Instructions to Authors or a recent issue of the journal for detailed guidelines and procedures for submission. This template is intended to benefit to the author in that the entire manuscript (text, tables, and graphics) may be submitted in one file. Inserting graphics and tables close to the point at which they are discussed in the text of the manuscript can also be a benefit for the reviewer.

When you submit a manuscript using this template, you will not actually see the page formatting that appears in the printed journal. This will occur as part of the editorial production process. Abbreviated instructions for using the template follow. Consult the documentation for your specific application and version for more information. Additional instructions can be found in the readme file at the web page where you downloaded this template.

#### Using the template

In ACS publications there are many different components of a manuscript (i.e., title, abstract, main text, figure captions, etc.) that are represented in the template. See the Guide, Notes, Notice, or Instructions for Authors on the journal's homepage to determine which parts should be included for the manuscript that you are preparing

1. If typing your manuscript directly into the template, select (highlight) the text of the template that you want to replace and begin typing your manuscript (i.e., select the Title section for typing in your title).
2. If you have already prepared your document in a Word file, you will need to attach the template to your working document in order to apply the Word Style tags. Further instructions can be found in the readme file at the web page where you downloaded this template.
  - a. Go to the Add-Ins tab and you will see all the Word Styles from the template that has now been imported into the current document. A Styles toolbar has been generated that will display the different Styles for you to choose from. If this is not present, type in the following command (Alt+Ctrl+Shift+S) and it should appear. You can close this at any time and then reopen it when needed.
  - b. Click in the sentence or paragraph and then go to the Add-Ins tab and select the relevant Word Style. This will apply the Word Style to the entire text (sentence or paragraph). Do this for all sections of the manuscript.
3. To insert graphics within the text or as a figure, chart, scheme, or table, create a new line and insert the graphic where desired. If your graphic is not visible, ensure that the Word Style is "Normal" with an automatic height adjustment. If the size of the artwork needs to be adjusted, re-size the artwork in your graphics program and re-paste the artwork into the template (maximum width for single-column artwork, 3.3 in. (8.5 cm); maximum width for double-column artwork, 7 in. (17.8 cm)). **NOTE:** If you are submitting a Table of Contents graphic, please insert the graphic at the end of the file.
4. Ensure that page numbers are present on all pages before submitting your manuscript.

5. Delete these instructions and any sections that are not needed.
6. Save the file with the graphics in place: select **Save As (File menu)** and save it as a document file (not a .dot template file).
7. Proof the manuscript to ensure that all parts of the manuscript are present and clearly legible.

**TITLE** (Word Style “BA\_Title”). The title should accurately, clearly, and concisely reflect the emphasis and content of the paper. The title must be brief and grammatically correct

*AUTHOR NAMES (Word Style “BB\_Author\_Name”). Include in the byline all those who have made substantial contributions to the work, even if the paper was actually written by only one person. Use first names, initials, and surnames (e.g., John R. Smith) or first initials, second names, and surnames (e.g., J. Robert Smith). Do not use only initials with surnames (e.g., J. R. Smith) because this causes indexing and retrieval difficulties and interferes with unique identification of an author. Do not include professional or official titles or academic degrees. At least one author must be designated with an asterisk as the author to whom correspondence should be addressed.*

**AUTHOR ADDRESS** (Word Style “BC\_Author\_Address”). The affiliation should be the institution where the work was conducted. If the present address of an author differs from that at which the work was done, indicate with a symbol and give the Present Address under Author Information. If more than one address, use symbols to match author names to address(es).

**KEYWORDS** (Word Style “BG\_Keywords”). If you are submitting your paper to a journal that requires keywords, provide significant keywords to aid the reader in literature retrieval.

ABSTRACT (Word Style “BD\_Abstract”). All manuscripts must be accompanied by an abstract. The abstract should briefly state the problem or purpose of the research, indicate the theoretical or experimental plan used, summarize the principal findings, and point out major conclusions. Abstract length is one paragraph.

TEXT (Word Style “TA\_Main\_Text”). For full instructions, please see the journal’s Instructions for Authors. Depending on the journal, the manuscript may include sections such as an introduction, experimental details (sections titled Experimental Methods, Experimental Section, or Materials and Methods), theoretical basis (sections titled Theoretical Basis or Theoretical Calculations), results, discussion, and conclusions.

FIGURES (Word Style “VA\_Figure\_Caption”). Each figure must have a caption that includes the figure number and a brief description, preferably one or two sentences. The caption should immediately follow the figure with the format “**Figure 1.** Figure caption.” All figures must be mentioned in the text consecutively and numbered with Arabic numerals. The caption should be understandable without reference to the text. It is preferable to place the keys to symbols used in the figure in the caption, not in the artwork. Ensure that the symbols and abbreviations in the caption agree with those in the figure itself and in the text and that the figure is already sized appropriately.

SCHEMES (Word Style “VC\_Scheme\_Title”). Chemical reactions and flow diagrams may be called schemes. Schemes may have brief titles describing their contents. The artwork for each scheme should immediately follow the scheme title. The title should follow the format “**Scheme 1.** Scheme Title”. All schemes must be mentioned in the text consecutively and numbered with Arabic numerals. Schemes may also have footnotes (use Word Style “FD\_Scheme\_Footer”), inserted after the artwork.

CHARTS (Word Style “VB\_Chart\_Title”). Lists of structures may be called charts.

Charts may have brief titles describing their contents. The title should follow the format

“**Chart 1.** Chart Title”. Charts may also have footnotes (use Word Style

“FC\_Chart\_Footnote”). To insert the chart into the template, be sure it is already sized appropriately and paste it immediately after the chart title.

TABLES. Each table must have a brief (one phrase or sentence) title that describes its

contents. The title should follow the format “**Table 1.** Table Title” (Word Style

“VD\_Table\_Title”). The title should be understandable without reference to the text.

Put details in footnotes, not in the title (use Word Style “FE\_Table\_Footnote”). Define nonstandard abbreviations in footnotes.

Use tables (Word Style “TC\_Table\_Body”) when the data cannot be presented clearly as narrative, when many precise numbers must be presented, or when more meaningful interrelationships can be conveyed by the tabular format. Do not use Word Style “TC\_Table\_Body” for tables containing artwork. Tables should supplement, not duplicate, text and figures. Tables should be simple and concise. It is preferable to use the Table Tool in your word-processing package, placing one entry per cell, to generate tables.

**Displayed equations** can be inserted where desired making sure they are assigned

Word Style "Normal". Displayed equations can only be one column wide. If the artwork needs to be two columns wide, it must be relabeled as a figure, chart, or scheme and mentioned as such in the text.

ASSOCIATED CONTENT

(Word Style “TE\_Supporting\_Information”). **Supporting Information.** A brief statement in non-sentence format listing the contents of material supplied as Supporting Information should be included, ending with “This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.” For instructions on what should be included in the Supporting Information, as well as how to prepare this material for publication, refer to the journal’s Instructions for Authors.

## AUTHOR INFORMATION

### **Corresponding Author**

\*(Word Style “FA\_Corresponding\_Author\_Footnote”). \* (Word Style “FA\_Corresponding\_Author\_Footnote”). Give contact information for the author(s) to whom correspondence should be addressed.

### **Present Addresses**

†If an author’s address is different than the one given in the affiliation line, this information may be included here.

### **Author Contributions**

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally.

(match statement to author names with a symbol)

### **Funding Sources**

Any funds used to support the research of the manuscript should be placed here (per journal style).

### **Notes**

Any additional relevant notes should be placed here.

#### ACKNOWLEDGMENT

(Word Style “TD\_Acknowledgments”). Generally the last paragraph of the paper is the place to acknowledge people, organizations, and financing (you may state grant numbers and sponsors here). Follow the journal’s guidelines on what to include in the Acknowledgments section.

#### ABBREVIATIONS

CCR2, CC chemokine receptor 2; CCL2, CC chemokine ligand 2; CCR5, CC chemokine receptor 5; TLC, thin layer chromatography.

#### REFERENCES

(Word Style “TF\_References\_Section”). References are placed at the end of the manuscript. Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references. Examples of the recommended format for the various reference types can be found at <http://pubs.acs.org/page/4authors/index.html>. Detailed information on reference style can be found in *The ACS Style Guide*, available from Oxford Press.

Insert Table of Contents Graphic and Synopsis Here

**JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH - QUALIS A1 – IMPACT FATOR 5.0**