

FABRÍCIO REICHERT BARIN

**ALTERAÇÕES MOLECULARES, ESTRUTURAIS E MECÂNICAS NO
TENDÃO INDUZIDAS POR LESÃO MUSCULAR**

BRASÍLIA - DF

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM
SAÚDE

ALTERAÇÕES MOLECULARES, ESTRUTURAIS E MECÂNICAS NO TENDÃO
INDUZIDAS POR LESÃO MUSCULAR

FABRÍCIO REICHERT BARIN

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília – UnB como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Rita de Cassia Marqueti Durigan

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPDF

BRASÍLIA - DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ra Reichert Barin, Fabrício
ALTERAÇÕES MOLECULARES, ESTRUTURAIS E MECÂNICAS NO TENDÃO
INDUZIDAS POR LESÃO MUSCULAR / Fabrício Reichert Barin;
orientador Rita de Cassia Marqueti Durigan. -- Brasília,
2019.
115 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências e Tecnologias em
Saúde) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Interação músculo-tendão. 2. Tendão Calcâneo. 3.
Tendinopatias. 4. Lesão Muscular. I. Marqueti Durigan,
Rita de Cassia, orient. II. Título.

MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Rita de Cássia Marqueti Durigan
(Presidente)
(Universidade de Brasília - UnB)

Prof. Dr. Wagner Fontes
(Universidade de Brasília - UnB)

Prof. Dr. Jeaser Alves de Almeida
(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

Prof^a Dr^a. Andrea Aparecida de Aro
(Centro Universitário Herminio Ometto de Araras -FHO)

Prof. Dr. Wagner Rodrigues
Suplente
(Universidade de Brasília - UnB)

BRASÍLIA - DF

2019

Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas, mas sim preparar a mente para pensar.

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

À minha amada família, meus pais, Geovani Brum Barin e Nilsa Teresinha Reichert Barin, e à minha irmã, Geovana Reichert Barin.

Coloco-me em lágrimas para agradecer o apoio incondicional, o carinho constante e a luta diária para possibilitar a realização dos meus sonhos e dos meus objetivos de vida.

Obrigado por se doarem tanto em prol do meu crescimento.

Nas horas em que precisei, recebi conforto e, em momentos de fragilidade, nunca me senti só. Palavras jamais conseguirão expressar o tamanho do meu amor e da minha gratidão.

Obrigado por tanto.

Amo vocês de alma e de coração.

Família é alicerce existencial.

À minha admirável orientadora, professora Rita de Cassia Marqueti Durigan, meus mais sinceros agradecimentos por tornar possíveis todas as minhas impossibilidades.

A oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente ao seu lado foi um presente.

Serei eternamente grato pela confiança, paciência, carinho e pelos inúmeros ensinamentos ao longo destes 6 anos de convivência.

Agradeço a Deus por ter sido agraciado com uma orientadora que me ensinou virtudes, que vão muito além da área acadêmica.

Ser professor é ajudar a escrever a história do futuro.

A Deus, obrigado por me abençoar diariamente.

Sou grato por minha vida, pela família que tenho, pelos amigos que me rodeiam, pelo carinho e amor que recebo de todos.

Agradeço todos os dias pela dádiva da vida. Obrigado por me ouvir, abençoar, guardar e cuidar.

*De um lado a outro da Bíblia, somos ordenados a sermos gratos.
A gratidão é o fluxo natural de um coração que está sintonizado com Deus.*

AGRADECIMENTOS

À minha eterna companheira de vida, Ingrid Aquino Amorim, obrigado pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou.

Obrigado por todo o carinho e compreensão com que me acolhe, por entender este período da minha vida, por compartilhar minhas vitórias e me ajudar a levantar sempre que precisei.

Amar você, ter você e fazer você feliz é um privilégio para mim.

Aos meus amigos e colegas de grupo de pesquisa em plasticidade músculo-tendínea (Gplast) da Universidade de Brasília, foi uma honra dividir este período com vocês.

Obrigado pela oportunidade de aprender e crescer com vocês; sempre estive rodeado de pessoas de grande capacidade e intelecto. Levarei cada momento comigo eternamente.

Meus agradecimentos especiais aos colegas, professores e amigos Gracielle Vieira Ramos e Ivo Neto, pela paciência e ajuda em todos os momentos, pelas palavras de incentivo e pela imensa contribuição para a realização deste trabalho.

Sem vocês, essa conquista seria mais difícil. Sou grato por ter recebido a oportunidade de melhorar como pesquisador, como professor e como ser humano, com os ensinamentos diários que recebi de vocês. Minha eterna gratidão.

Agradeço aos alunos de iniciação científica da Universidade de Brasília, com ênfase às alunas Amanda Ruivo e Juliana Oliveira, que contribuíram substancialmente para a realização deste estudo durante a parte experimental e durante as análises morfológicas realizadas.

Aos amigos de infância, pela força diária e pela compreensão neste período em minha vida.

Agradeço calorosamente ao professor João Luiz Quagliotti Durigan, por todo aprendizado compartilhado, pelos ensinamentos diários e pelas contribuições acrescentadas neste estudo; aos professores Octavio Luiz Franco, Wagner Fontes e Mariana Hecht, por acreditarem no trabalho realizado e por manterem sempre abertas as portas dos seus laboratórios.

À técnica de laboratório do Hospital Universitário de Brasília, Maria Zelia da Mota, sempre muito presente e dedicada, obrigado pelo auxílio nas análises histológicas. Agradeço também aos técnicos de laboratório e biotério da Universidade Católica de Brasília (UCB) e do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), pela importante ajuda durante o período de experimentação animal.

Agradeço às instituições de ensino, Universidade Católica de Brasília e Centro Universitário de Brasília, por todo o auxílio fornecido, pela disponibilização da estrutura, desde a aquisição dos animais aos espaços físicos para a realização da experimentação. Sou grato por todo o apoio.

À FAPDF, CAPES e CNPQ, pela concessão da bolsa e financiamentos que deram base para a realização deste trabalho.

Obrigado a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a geração deste momento. Serei eternamente grato.

A gratidão é a memória do coração.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Propriedades morfofuncionais do tendão.....	1
1.2 Adaptações tendíneas ao mecanismo de carga músculo-dependente	7
1.3 Fatores determinantes para o desenvolvimento de tendinopatias	10
1.4 Especificidades sobre o tendão calcâneo (TC)	18
1.5 Alterações morfológicas, moleculares e biomecânicas no tendão após lesão muscular	22
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
3. MANUSCRITO.....	28
CALCANEAL TENDON PLASTICITY FOLLOWING GASTROCNEMIUS MUSCLE INJURY IN RAT	29
4. DISCUSSÃO GERAL	65
5. CONCLUSÃO	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
7. ANEXOS.....	82

RELAÇÃO DE TABELAS - MANUSCRITO

TABELA 1. Lista das sequências dos genes alvos (TaqMan) utilizados.....	36
TABELA 2. Área transversal total lesionada do músculo gastrocnêmio.....	39

RELAÇÃO DE FIGURAS - TESE

FIGURA 1 Estrutura hierárquica do tendão.....	2
FIGURA 2. Síntese de fibrilas de colágeno para matriz extracelular tendínea (MEC).....	4
FIGURA 3. Visão esquemática do tendão calcâneo.....	5
FIGURA 4. Adaptações do tendão ao estímulo mecânico músculo dependente.....	9
FIGURA 5. Curva hipotética de ilustração da relação entre a magnitude e a frequência de carga tolerável pelo tendão.....	11
FIGURA 6. Principais alterações moleculares e morfológicas observadas em tendinopatias...	13
FIGURA 7. Modelo contínuo de tendinopatia.....	14
FIGURA 8. Algoritmo da patogênese multifatorial da tendinopatia.....	15
FIGURA 9. Curva de tensão/deformação e suas quatro distintas regiões.....	22
FIGURA 10. Representação esquemática das três fases inter-relacionadas e dependentes do reparo muscular após lesão.....	24

RELAÇÃO DE FIGURAS – MANUSCRITO

- FIGURA 1.** Seções histológicas do processo de cicatrização do músculo gastrocnêmio nos quatro grupos analisados coradas com Hematoxilina e Eosina.....55
- FIGURA 2.** A lesão do músculo gastrocnêmio modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelação e reparo de tendões da matriz extracelular.....56
- FIGURA 3.** Secções histológicas do tendão calcâneo após lesão do músculo gastrocnêmio coradas com Hematoxilina e Eosina.....57
- FIGURA 4.** Coloração de *tricoma de Masson* nas regiões proximal e distal do tendão calcâneo após lesão do músculo gastrocnêmio.....58
- FIGURA 5.** A lesão do músculo gastrocnêmio afeta a curva comprimento-tensão do tendão do calcâneo.....59
- FIGURA 6.** Modificações das propriedades biomecânicas no tendão do calcâneo em resposta à lesão do músculo gastrocnêmio.....59
- FIGURA 7.** A lesão do musculoesquelético modula a plasticidade do tendão do calcâneo. Principais análises temporais da expressão gênica, propriedades morfológicas e biomecânicas do tendão do calcâneo em relação ao grupo controle.....60

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

MEC: Matriz Extracelular

GAGs: Glicosaminoglicanos

TSCs: Células-tronco do tendão

GA: Músculo Gastrocnêmio

TC: Tendão calcâneo

TGF- β : Fator de crescimento transformação beta

CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo

LOX: Lipoxigenase

MMP: Metaloproteases de matriz

TIMP: Inibidor tecidual de metaloproteinases de matriz

IGF-1: Fator de crescimento derivado de insulina

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

COX-2: Cicloxigenase 2

PGE2: Prostaglandina E2

IL-1 β : Interleucina 1 β

TNF- α : Fator de necrose tumoral alpha

AGEs: Produtos finais de glicação avançada

BGN: Biglicana

COL1A1: Colágeno do tipo I

COL1A3: Colágeno do tipo III

DCN: Decorina

Fmod: Fibromodulina

IL6: Interleucina 6

RPLPO: Proteína ribossomal

RESUMO

A inter-relação entre o tecido musculoesquelético e o tendão é primordial para a homeostase tecidual. Enquanto a resposta musculoesquelética à lesão do tendão já foi bem estudada e documentada, até onde sabemos, a resposta do tendão à lesão muscular esquelética foi negligenciada. Assim, investigamos a remodelação da matriz extracelular (MEC) do tendão calcâneo após lesão muscular a nível de gastrocnêmio, utilizando modelo animal. Ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle (C), animais que não foram expostos à lesão muscular; grupo lesão muscular 3 dias (3D); grupo lesão muscular 14 dias (14D); e grupo lesão muscular 28 dias (28D), para realização de expressão gênica, análise morfológica e biomecânica. Aos 3 dias após a lesão, observamos alterações no nível de mRNA das vias de sinalização associadas ao colágeno I, acompanhadas por diminuições em propriedades biomecânicas. Aos 14 dias após a lesão, encontramos um conteúdo histológico reduzido de colágeno, acompanhado por invasão de vasos sanguíneos no tendão e uma abundância de células da bainha peritendinosa. Finalmente, 28 dias após a lesão, houve sinais de recuperação no nível de expressão gênica, incluindo a regulação positiva dos fatores de transcrição relacionados à síntese, remodelação e reparo da MEC. Nesse momento, os tendões também apresentavam aumento das células da bainha peritendinosa, diminuição das células adiposas, aumento nos módulos de Young e menor tensão até a falha em comparação com o controle não lesionado, e todos os *time-points* pós-lesão. Em resumo, demonstramos que o tendão calcâneo sofre extenso remodelamento da MEC em resposta à lesão do músculo gastrocnêmio, levando a propriedades funcionais alteradas em um modelo de rato. A plasticidade do tendão, em resposta à lesão musculoesquelética, merece uma investigação mais aprofundada para entender sua relevância fisiológica e possíveis implicações clínicas.

Palavras Chaves: interação músculo-tendão, tendinopatia, tenócitos, lesão muscular, tendão calcâneo

ABSTRACT

Cross-talk between skeletal muscle and tendon is important for tissue homeostasis. Whereas the skeletal muscle response to tendon injury has been well-studied, to the best of our knowledge the tendon response to skeletal muscle injury has been neglected. Thus, we investigated calcaneal tendon extracellular matrix (ECM) remodeling after gastrocnemius muscle injury using a rat model. Wistar rats were randomly divided into four groups: control group (C; animals that were not exposed to muscle injury) and harvested at different time points post gastrocnemius muscle injury (3, 14, and 28 days) for gene expression, morphological, and biomechanical analyses. At 3 days post injury, we observed mRNA-level dysregulation of signaling pathways associated with collagen I accompanied with disrupted biomechanical properties. At 14 days post injury, we found reduced collagen content histologically accompanied by invasion of blood vessels into the tendon proper and an abundance of peritendinous sheath cells. Finally, at 28 days post injury, there were signs of recovery at the gene expression level including upregulation of transcription factors related to ECM synthesis, remodeling, and repair. At this time point, tendons also presented with increased peritendinous sheath cells, decreased adipose cells, higher Young's modulus, and lower strain to failure compared to the uninjured controls and all post injury time points. In summary, we demonstrate that the calcaneal tendon undergoes extensive ECM remodeling in response to gastrocnemius muscle injury leading to altered functional properties in a rat model. Tendon plasticity in response to skeletal muscle injury merits further investigation to understand its physiological relevance and potential clinical implications.

Keywords: muscle-tendon interaction, tendon disorders, tenocyte, muscle damage, calcaneal tendon

1. INTRODUÇÃO

1.1 Propriedades morfofuncionais do tendão

Os movimentos articulares são gerados por meio da força de contração oriunda do tecido musculoesquelético, a qual é transmitida aos ossos pelos tendões. Essa mecânica de alavancas biológicas são possíveis graças ao arranjo estrutural contínuo existente entre estes segmentos teciduais (1). No seu ponto de inserção, os tendões surgem a partir do periósteo, uma fina camada de tecido conjuntivo que recobre a estrutura óssea. Na sua outra extremidade, despontam a partir da fáscia muscular. Esta junção mio-ósseo-tendinosa determina o grau de movimentação articular, sendo assim essencial em todos os movimentos corpóreos (2, 3).

Além dessa função primária e fundamental de transmissão de tensão, os tendões proporcionam armazenamento e transformação de energia elástica em mecânica durante a atividade, gerando economia de movimento e amplificação de potência em atividades como salto e aceleração (*spring-like properties*) (4).

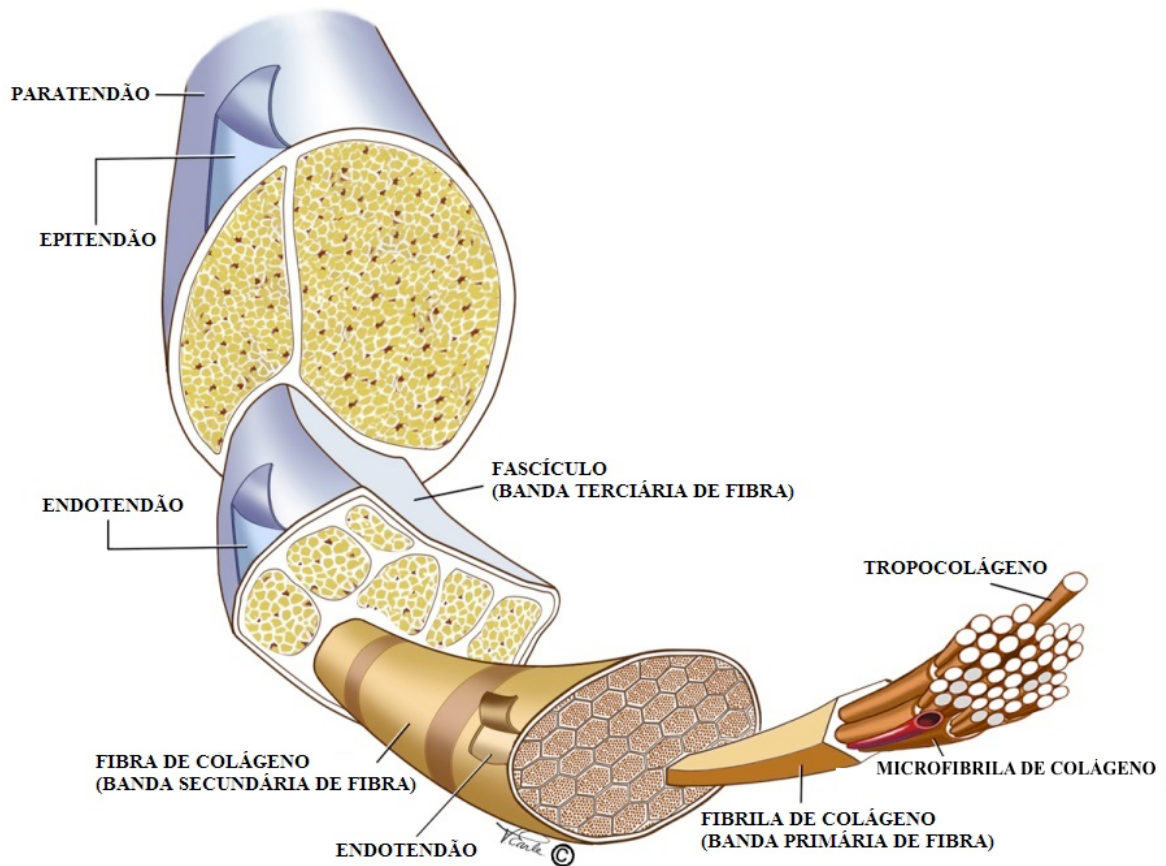
Para garantir essa complexidade de funções, a organização estrutural e celular de um tecido é extremamente importante (5). Além disso, compreender a morfologia do tecido tendíneo sadio é fator primário para se abordarem possíveis causas e fatores geradores de lesões (6).

Estruturalmente, os tendões são organizados em forma hierárquica (5). O tropocolágeno, constituído por três cadeias peptídicas helicoidais e espiraladas, dá origem às microfibrilas de colágeno, que estão organizadas em fibrilas de colágeno, originando, assim, as fibras de colágeno, fascículos e unidade de tendão (7) (Figura 1).

O tendão é revestido por uma quantidade de tecido conjuntivo frouxo, denominado paratendão, que permite a livre circulação do tecido. A segunda camada, denominada epitendão,

é contínua com o paratendão em sua superfície externa e, com o endotendão, na sua superfície interna, agrupando os endotendões de forma organizacional. Finalmente, o endotendão envolve cada fibra individualmente e conduz vasos sanguíneos e nervos (8, 9).

Figura 1. Estrutura hierárquica do tendão. Adaptado de (10).



Em relação à sua constituição, os tendões apresentam uma grande matriz extracelular (MEC), extremamente resistente a forças de tração e compressão e uma quantidade relativamente pequena de células, responsáveis pela manutenção dessa matriz (11, 12).

A MEC tendínea é composta por aproximadamente 70% de água, com boa parte associada aos glicosaminoglicanos (GAGs), proteínas importantes para a viscoelasticidade

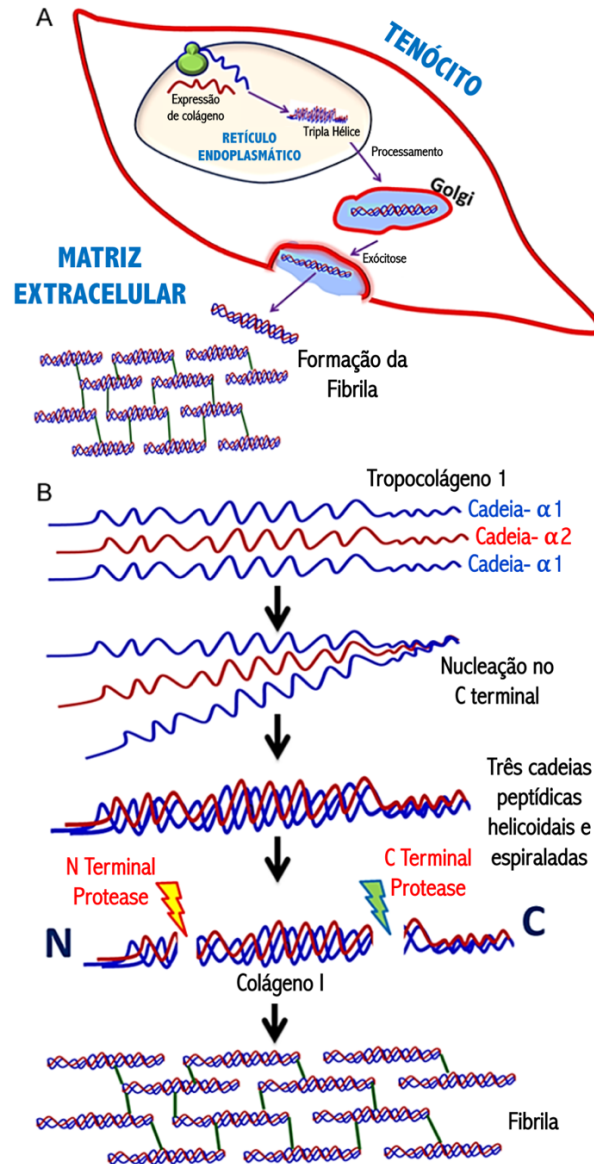
tendínea, garantindo redução de energia metabólica durante a locomoção (5), além de proteoglicanos, glicoproteínas de adesão e proteínas fibrosas (colágeno e elastina) (1, 13).

Dar destaque aos proteoglicanos (compostos por um ou mais GAGs), como decorina, biglicana, fibromodulina, entre outros, é importante uma vez que, presentes entre as fibras de colágeno, atuam na organização do tecido, regulam o processo de fibrilogenese do colágeno, controlam o diâmetro das fibrilas, sendo assim essenciais para a manutenção da estrutura da matriz (7, 8). Estudos realizados em animais *knockout* investigaram o papel da decorina, um proteoglicano rico em leucina, e evidenciaram que a formação inadequada de fibrilas de colágeno e a diminuição das propriedades mecânicas foram resultantes da ausência deste proteoglicano na MEC tendínea (14).

O principal constituinte dessa matriz é o colágeno, que representa 60-85% do peso seco do tendão (90% do tipo I), arranjado paralelamente na direção de aplicação da força do músculo, em fibras resistentes às tensões, garantindo a integridade estrutural do tecido (5, 15, 16) (Figura 2).

Figura 2. Síntese de fibrilas de colágeno para matriz extracelular tendínea (MEC). **A.** Expressão do gene colágeno e a montagem da tripla hélice (três cadeias peptídicas helicoidais e espiraladas) ocorrem no Retículo Endoplasmático (RE) dos Tenócitos. O tropocolágeno é, então, processado no Complexo de Golgi e transportado à membrana plasmática para exocitose do colágeno maduro à MEC, onde ocorre a formação de fibrilas. **B.** Os eventos moleculares na montagem de fibrilas de colágeno. As subunidades do tropocolágeno tipo I (duas cadeias polipeptídicas $\alpha 1$ e uma cadeia polipeptídica $\alpha 2$) são sintetizadas no RE e se alinham para formar uma tripla hélice. A tripla hélice do colágeno amadurece a partir da ação das proteases.

As moléculas de colágeno maduro alinham-se na MEC para formação das fibrilas de colágeno.
Adaptado de (16).



O segundo colágeno mais abundante no tecido, em termos de percentagem, é o tipo III (até 10%), que está localizado principalmente no epitendão e no endotendão. Nas fases iniciais após dano tecidual, a produção desse colágeno aumenta, caracterizando um período biomecanicamente inferior (suas fibras são mais finas e aceitam maior extensibilidade), com alinhamento irregular das fibras colágenas (17) (Figura 3). Durante o processo de reparo

tecidual, a substituição gradual por colágeno do tipo I deve ocorrer naturalmente, devolvendo ao tecido sua total capacidade de gerenciar as cargas externas (18).

Figura 3. Visão esquemática do tendão. O lado esquerdo evidencia um aspecto branco/translúcido do tecido tendíneo, com feixes de colágeno arranjado em fibras muito bem dispostas, baixa celularidade e vascularização. No lado direito, notamos um tendão doente (tendinopatia), com uma aparência amarelada, menor organização fibrilar, aumento na celularidade, vascularização e maior acúmulo de proteoglicanos (azul). Adaptado de (19).



Em relação ao meio celular, os fibroblastos, denominados tenócitos nos tendões e responsáveis pela produção, manutenção e renovação da MEC, representam 90 a 95% dos elementos celulares do tendão, juntamente a mastócitos, células endoteliais e adipócitos (1, 5). Mais recentemente, um novo tipo de célula tendínea, identificada em estudos com animais e humanos, denominada células-tronco do tendão (TSCs), vem ganhando grande destaque em virtude da sua capacidade de se autorrenovar, diferenciar-se em tenócitos e, até mesmo, em

condrócitos ou osteócitos, estando intimamente ligada e correlacionada a processos de manutenção e reparo, mas também ao desenvolvimento de lesões no tendão (3).

A nível molecular, o fator de transcrição Scleraxis é apresentado na literatura como ponto-chave na proliferação e diferenciação dos tenócitos (20). Estudos com animais geneticamente modificados, na ausência da Scleraxis, evidenciam uma interrupção da diferenciação dos tenócitos, o que leva à atrofia e desorganização da MEC tendínea, vinculada a uma extrema redução na expressão de colágeno do tipo I (21). Além disso, juntamente com a Mohawk (Mkx), um segundo fator de transcrição, destacável em virtude da sua importância durante o desenvolvimento e maturação do tendão (22), interage com Smad2/3, um mediador transcricional essencial da sinalização do fator de crescimento de transformação do tipo *beta* (TGF β), regulando a produção de constituintes da MEC no tendão, como diferentes tipos de colágeno e proteoglicanos essenciais (20).

Os tenócitos estão arranjados tipicamente ao longo das fibras de colágeno, o que viabiliza o estabelecimento da relação da MEC com o meio celular. Vale ressaltar que essa inter-relação (MEC-célula) só se torna possível pela ação das integrinas, classificadas como receptores de superfície celular de adesão, que permitem a propagação dos sinais mecânicos de dentro para fora e de fora para dentro (23). Por meio desse mecanismo, ocorre a detecção e resposta celular a estímulos externos, dando início a processos de sinalização intracelular, com síntese de vários elementos da MEC, que podem culminar em alterações da arquitetura celular e morfológica (18). Todo esse processo é conhecido como mecanotransdução e garante aos tenócitos a capacidade de regular a homeostase do tecido tendíneo, gerindo a síntese e o *turnover* dos componentes da MEC (7).

1.2 Adaptações tendíneas ao mecanismo de carga músculo-dependente

A carga mecânica vem sendo apontada como fator primordial na homeostase dos tendões (3). O nível de atividade de uma pessoa ou animal, compreendida na literatura atual como demanda tecidual diária, pode ser utilizada para mensuração dessa variável (24). Estudos demonstram que os estímulos de tensão no tendão, ou a falta desses, gerados a partir do processo de contração muscular, repercutem no remodelamento da MEC tendínea (mudanças na quantidade e /ou organização dos constituintes da matriz), produzindo um aumento de capacidade estrutural e mecânica ou de fragilidade tecidual (5, 25). Tais adaptações, anabólicas ou catabólicas do meio celular e, conseqüentemente, da MEC tendínea, ocorrem quando o tecido é exposto a cargas externas com diferentes estímulos (magnitude, frequência e duração), com base em um intervalo fisiológico individual (11).

Essa relação já era apontada desde a década de 70, quando foi demonstrado que o estímulo mecânico, decorrente da contração muscular, estava associado ao remodelamento tendíneo (26). Nesse trabalho, Beckham e colaboradores demonstraram que o desenvolvimento do tendão em embriões de galinha, durante a embriogênese (formação do embrião a partir do zigoto), foi incompleto no momento em que a contração muscular foi inibida com *D-tubocurarine* (inibidor de acetilcolina), evidenciando, desse modo, que a interação musculotendínea é de suma importância, não somente para o movimento articular mas também para o desenvolvimento e manutenção da arquitetura tendínea (26).

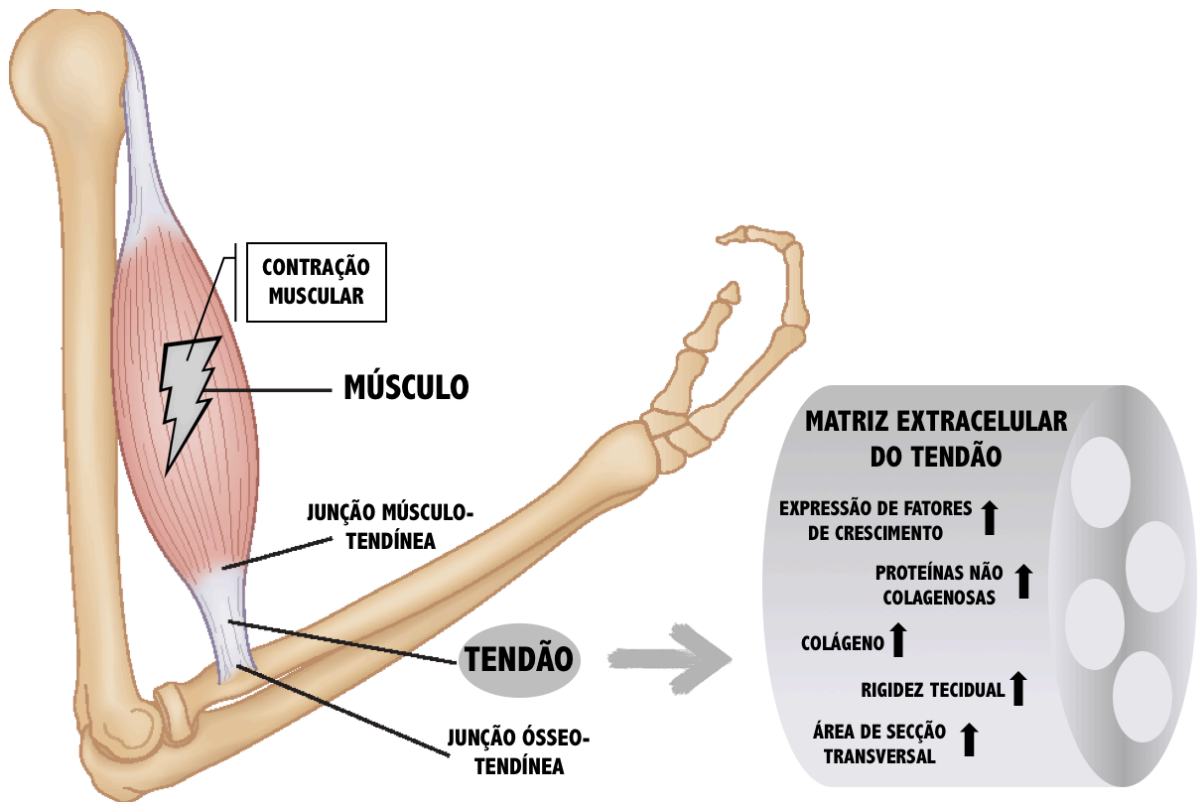
Uma série de pesquisas subsequentes foram realizadas na tentativa de demonstrar que a transmissão de carga mecânica no tendão, mediada pela contração musculoesquelética, também causava adaptações moleculares, morfológicas e mecânicas no tecido tendíneo, podendo influenciar no seu remodelamento (25, 27-31) (Figura 4).

Desse modo, foi observado que a tensão produzida em nível muscular em contrações de alta intensidade (acima de 70% da força máxima do indivíduo), controlada com base na capacidade tecidual individual, para não gerar estresse excessivo, além de ocasionar um aumento da quantidade de colágeno do tipo I de forma organizada, com um pico de síntese de 24 horas após a atividade, também promoveu melhora nos parâmetros de força e rigidez no tendão de indivíduos adultos e idosos (6, 25, 30, 31).

Também foi observado hipertrofia tendínea (aumento da área de secção transversal) e aumento dos módulos de Young (propriedade mecânica que avalia a rigidez de um material) em humanos com alta demanda muscular diária (praticantes de atividades físicas que envolvem descarga de peso como voleibol, badminton e esgrima), como também assimetrias dessas variáveis (aumento da área de secção transversal e módulo de Young), quando comparado o membro inferior dominante com o não dominante (25, 28, 29, 32).

Estudos com animais também reforçam os resultados anteriores, evidenciando que corridas de intensidade moderada foram o suficiente para aumentar a expressão de colágeno do tipo I (33).

Figura 4. Adaptações do tendão ao estímulo mecânico músculo-dependente. Teoria da conexão entre as mudanças nas propriedades tendíneas, induzidas pela atividade musculoesquelética dentro de um intervalo fisiológico de capacidade tecidual. Setas pretas identificam aumento da variável sinalizada.



Eventos moleculares, responsáveis pela regulação desse remodelamento tendíneo, também têm sido alvo de pesquisas, demonstrando que o aumento da síntese de colágeno, decorrente de estímulos mecânicos externos, pode estar relacionado à expressão aumentada do TGF- β , um dos principais reguladores da síntese e deposição dessa proteína (34).

Heinemeier e colaboradores, em 2007, também observaram que, além da regulação positiva de colágeno, outros mediadores atuantes na síntese da MEC também foram regulados mediante a atividade muscular. Neste estudo, foi observado que, após diferentes tipos de contrações do músculo gastrocnêmio (GA) (isométrica, concêntrica e excêntrica), o tendão calcâneo (TC) apresentou, além de expressão gênica aumentada do colágeno I, uma regulação positiva do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e lipoxigenase (LOX), bem como expressão aumentada de genes atuantes no turnover tendíneo, como as metaloproteases da matriz-2 (MMP-2) e inibidor tecidual de metaloproteases-1 e 2 (TIMP-1 e TIMP-2) (35).

Além das moléculas citadas acima, estudos mostram que os fatores de crescimento derivados da insulina (IGF-1) e do endotélio vascular (VEGF) também desempenham um papel de destaque na cascata de sinalização que induz a síntese do colágeno, proporcionada pela ação muscular (5, 36).

Apesar dessa importante literatura citada, ainda não está clara qual a relação entre essas vias de sinalização e o papel funcional do conjunto dessas proteínas, essenciais para o remodelamento do tendão.

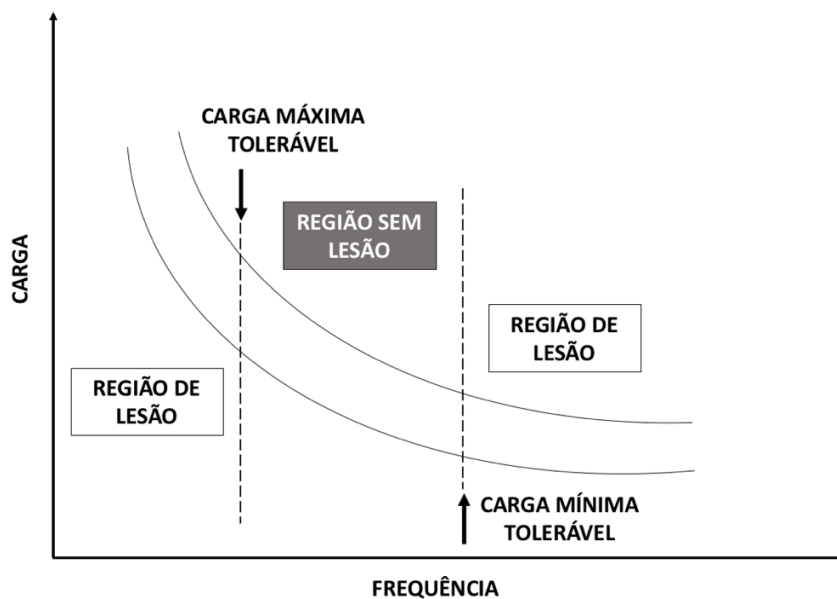
De forma conclusiva, a carga externa, controlada com base na capacidade tecidual do indivíduo, promove o remodelamento tendíneo, podendo levar a melhorias estruturais e funcionais (37). A cascata de sinalizações moleculares, que culminam na modulação da MEC do tendão, por meio da carga mecânica gerada pela contração muscular, parece ter início por meio da síntese de fatores de crescimento (CTGF, IGF-1, VEGF e TGF- β) pelas células tendíneas, com posterior sinalização de reguladores (SMAD 2/3) dos fatores de transcrição (Scx e Mxx), gerando respostas celulares e alterações na própria MEC tendínea (7, 20, 38). Porém, não surpreendentemente, esses mesmos fatores parecem estar envolvidos em tendinopatias (como veremos no próximo capítulo), sugerindo que os seus papéis são altamente contextuais e devem ser melhor investigados.

1.3 Fatores determinantes para o desenvolvimento de tendinopatias

Apesar de os estudos supracitados demonstrarem que o estímulo mecânico é primordial para a manutenção da arquitetura tendínea e para a evolução de parâmetros estruturais e biomecânicos, sabemos também que a variabilidade das intensidades e frequências

das cargas externas impostas são uma das principais causas de lesão no tendão, pois inibem a capacidade de as células se manterem em homeostasia (39) (Figura 5).

Figura 5. Curva hipotética de ilustração da relação entre a magnitude e a frequência de carga tolerável pelo tendão. O máximo e o mínimo de carga tolerável estão indicados pelas setas pretas. A demanda tolerável (máxima ou mínima) é dependente da capacidade do tecido tendíneo de cada indivíduo.

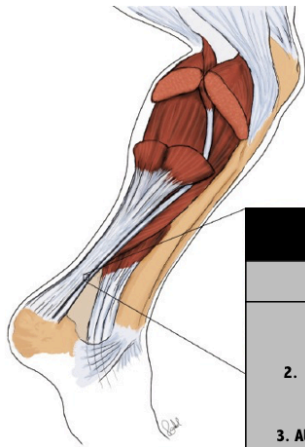


Trabalhos evidenciam que a exposição aguda ou crônica (sobrecarga repetitiva /*overuse*) do tendão a grandes volumes e magnitudes de carga (tensão, compressão e fricção), que estão acima da capacidade fisiológica do tecido (capacidade *versus* demanda), como também a relação de baixas cargas com altas frequências de repetição, presentes em atividades com predomínio metabólico aeróbico ou anaeróbico, induzem a uma estimulação aumentada de genes e enzimas inflamatórias/degradativas, resultando uma estrutura globalmente enfraquecida com maior propensão à lesão e ao estabelecimento de tendinopatias (nomenclatura atualmente utilizada para indicar um processo de lesão sem ruptura do tendão) (18, 40, 41).

Um exemplo claro dessa característica “dose-dependente” do tecido tendíneo, em relação à carga externa, como o exercício físico, pode ser observado na diferença de interação entre cargas mecânicas, citocinas inflamatórias e as TSCs, quando o tendão é exposto a magnitudes de cargas distintas. Um alongamento uniaxial cíclico de 4% do tendão resulta uma diminuição da expressão de cicloxigenase 2 (COX-2), MMP-1, produção de prostaglandina E2 (PGE2), que é estimulada pela interleucina 1 β (IL-1 β) e diferenciação das TSCs em tenócitos, podendo proporcionar, assim, um aumento de capacidade tecidual. Porém, este cenário é totalmente alterado, quando a carga externa imposta é aumentada e, conseqüentemente, o alongamento tendíneo é maximizado (8%), gerando elevação na expressão das citocinas inflamatórias, anteriormente descritas, e diferenciação das TSCs em condrócitos e osteócitos, o que determina regiões no tendão com baixíssima habilidade de reparo tecidual (3, 42).

Da mesma forma, uma abolição de estímulos externos (*stress-shielded*) também está ligada a possíveis mudanças patológicas no tendão, apresentando alterações similares a tendões expostos à sobrecarga. Estudos demonstram diminuição na expressão de proteínas-chaves envolvidas na capacidade biomecânica do tecido (colágeno e proteoglicanos) (7), um aumento desorganizado da atividade celular (40), apresentando alterações na forma (mais arredondados) e coloração dos núcleos de tenócitos (mais escuros), contribuindo, assim, para uma completa perda da arquitetura normal da MEC (37) (figura 6). Vale ressaltar que uma parcela da população com diagnósticos de tendinopatia tem estilos de vida sedentários (19, 43).

Figura 6. Principais alterações moleculares e morfológicas observadas em tendinopatias (7, 18, 40, 44-49).



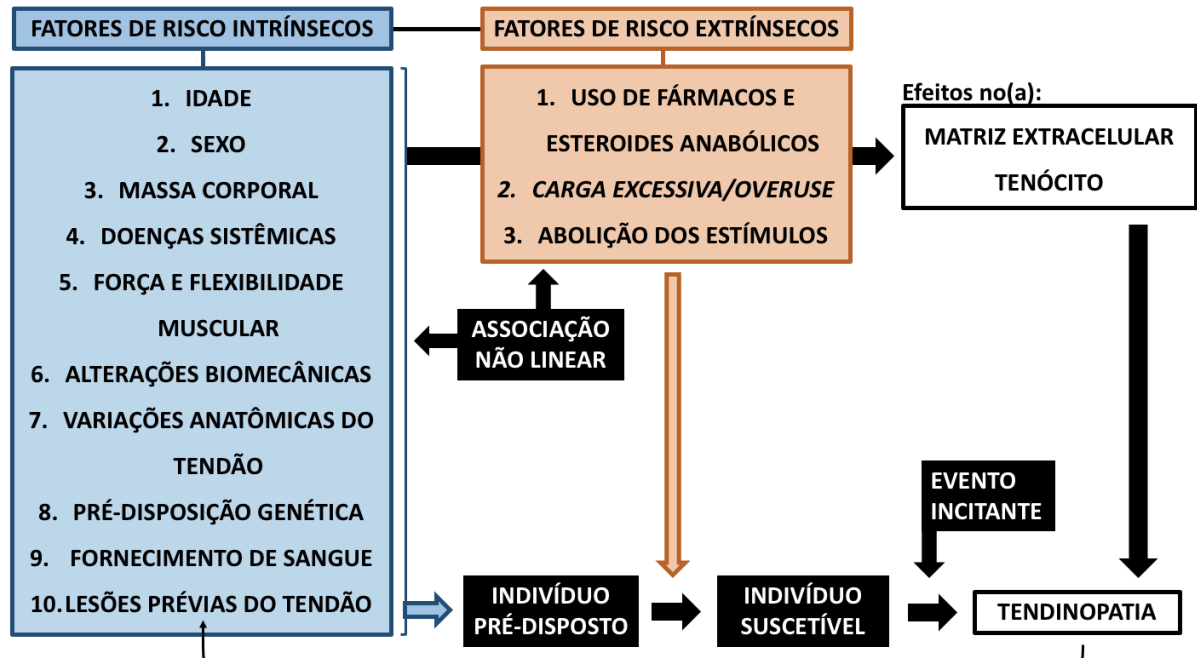
ALTERAÇÕES MOLECULARES E MORFOLÓGICAS EM TENDINOPATIAS	
PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES MOLECULARES	
<ol style="list-style-type: none"> 1. AUMENTO NA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO (VEGF e TGF-β); 2. AUMENTO DOS FATORES DE DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMP-2 E 9) E FATORES INFLAMATÓRIOS (IL-6 e PGE2); 3. AUMENTO NA EXPRESSÃO DE COLÁGENO IMATURO (COLÁGENO DO TIPO III) E PROTEOGLICANOS; 4. DIMINUIÇÃO DOS INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES (TIMP 1 e 2). 	Cook e Purdam, 2009; J et al., 2012; Galloway et al., 2013; Abate, 2014; Rees et al., 2014; Spang et al., 2015; Morita et al., 2016; Vasta et al., 2016; Millar et al., 2017; Walden et al., 2017.
PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS	
<ol style="list-style-type: none"> 1. ANORMALIDADES NA ESTRUTURA DAS FIBRAS E DESORGANIZAÇÃO DO COLÁGENO; 2. DIMINUIÇÃO NO NÚMERO DE CÉLULAS E AUMENTO NA VASCULARIZAÇÃO; 3. ALTERAÇÃO NO FORMATO DAS CÉLULAS (ARREDONDADAS). 	Cook e Purdam, 2009; Galloway et al., 2013; Vasta et al., 2016; Millar et al., 2017; Walden et al., 2017.

As causas de mudança no meio celular e na MEC do tendão, que predisõem o tecido a tendinopatias, classificadas como reativas na fase aguda (termo descrito para caracterizar um tendão que apresenta espessamento adaptativo e homogêneo, com capacidade de armazenamento de energia limitada, comparado ao tendão sadio, aumento da produção de proteoglicanos e pequenas falhas ao longo das fibras de colágeno) e que podem evoluir para a degeneração do tecido (grande desorganização da MEC e falhas nas fibras de colágeno, aumento no número de veias, nervos sensoriais, colágeno do tipo III e alterações na estrutura dos tenócitos) durante a progressão para o estado crônico da lesão (40, 50) (Figura 7), são divididas entre fatores de risco individuais, intrínsecos e extrínsecos e suas relações geram um perfil de risco, tornando os indivíduos suscetíveis à lesão (24, 51-53).

Figura 7. Modelo contínuo de tendinopatia. Transição entre o tendão normal até a tendinopatia degenerativa, com destaque para o potencial de reversibilidade da lesão. Adaptado de (40).

Em relação aos fatores de risco intrínsecos, a idade, sexo, massa corporal, doenças sistêmicas, força e flexibilidade muscular, alterações biomecânicas durante o movimento, lesões prévias no tecido tendíneo, variações anatômicas do tendão, predisposições genéticas e o fornecimento de sangue são os principais citados na literatura científica (52, 53, 56) (figura 8).

Figura 8. Algoritmo da patogênese multifatorial da tendinopatia. Associação não linear entre fatores de risco intrínsecos e extrínsecos, juntamente com o evento incitante, que induzem a alterações nos tenócitos e na matriz extracelular do tendão, predispondo ao desenvolvimento de tendinopatias. A seta abaixo da tendinopatia, que volta para o quadro de fatores de risco intrínsecos, indica que as lesões prévias do tendão predispõem o indivíduo a novas lesões. Adaptado de (51-53).



Dentre os fatores inclusos nessa lista, que também podem ser classificados como não modificáveis, três deles vêm sendo alvo de diversas pesquisas (pré-disposição genética, idade

e sexo). Recentemente, variações específicas de sequências genéticas têm sido correlacionadas como fatores de risco importantes para tendinopatias (57). Trabalhos também evidenciam que o envelhecimento está diretamente correlacionado com um aumento da atividade das MMPs 2 e 9 (56) e uma diminuição da rigidez do tecido, gerando um aumento clínico na incidência de lesões tendíneas (58). Além disso, estudos biomecânicos evidenciam que os tendões de homens parecem ter uma capacidade superior de resistência ao estresse mecânico (26% a mais), em relação às mulheres (59). Isso provavelmente estaria ligado à diferença na taxa de síntese de colágeno, que se mostra superior no sexo masculino, tanto no estado de repouso como após o exercício físico. Da mesma forma, a menopausa teria ligação direta com a diminuição de colágeno do tipo I, alterando a razão entre colágeno do tipo I e III e resultando em um tendão mecanicamente mais fraco (60).

O fator massa corporal também se mostra diretamente ligado à evolução de uma tendinopatia. O sobrepeso estaria intimamente relacionado ao aumento de carga em tendões de membros inferiores, facilitando a progressão para tendinopatias (61). Além disso, níveis aumentados no sangue de fatores inflamatórios como PGE2 e fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), observados em indivíduos obesos, podem interferir na homeostase do tendão ao afetarem, diretamente, a síntese e proliferação de colágeno (61, 62).

A pobre vascularização e as variações anatômicas do tendão, dois aspectos que terão maior explanação no tópico seguinte, juntamente com lesões prévias e alterações biomecânicas, geralmente ligadas a aspectos de força e flexibilidade muscular, são outros fatores intimamente correlacionados à diminuição da resistência à tração tendínea e alterações degenerativas, que predisõem o tecido à lesão (63-68).

Um exemplo disso pode ser observado em um estudo desenvolvido com militares em que indivíduos, com fraqueza de flexores plantares, diminuíram a capacidade de absorção e

geração de força da unidade músculo-tendínea, ficando assim mais suscetíveis ao desenvolvimento de tendinopatias do TC por *overuse* (68). Em um contexto ainda mais biomecânico, foi demonstrado que a diminuição da dorsoflexão de tornozelo aumenta o estresse gerado na região do joelho, por diminuição da capacidade de absorção de carga no tornozelo, elevando o risco de tendinopatias patelares em atletas saltadores (64).

Por fim, doenças sistêmicas, como diabetes mellitus e artrite reumatoide, apesar de serem mais raramente correlacionadas a lesões no tendão, comprometem a força e elasticidade do tecido, deteriorando a estrutura normal do tendão (69). Mais especificamente, estudos evidenciam que existe um acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) no tendão de pacientes diabéticos. Os AGEs elevam a regulação do CTGF, favorecendo a formação de fibrose no tendão ao longo do tempo (63).

Dentre os fatores citados acima, um importante aspecto que sempre deve ser considerado é a íntima dependência dos tendões às relações existentes no tecido musculoesquelético, podendo essa relação estar vinculada às tendinopatias (20). O funcionamento normal da junção miotendínea requer comunicação bidirecional contínua entre miócitos e tenócitos para permitir remodelamento adequado (70). No entanto, por mais que a literatura enfatize os aspectos de mecanotransdução tendínea, seja em um cenário de melhora ou piora da capacidade tecidual, processos lesivos no músculo, como a presença de inflamação durante as fases iniciais, podem interferir diretamente na saúde tendínea, não apenas pelo decréscimo de tensão, mas também pela ação dos fatores inflamatórios do músculo nas células do tendão (71). Nessa perspectiva, as investigações que elucidam *o crosstalk* entre musculoesquelético e tendão são de extrema importância devido às possíveis alterações que afetam a homeostase geral desses tecidos, fragilizando e predispondo a novas lesões.

1.4 Especificidades sobre o tendão calcâneo (TC)

Neste tópico, após elucidarmos de forma ampla o tecido tendíneo nos tópicos anteriores, abordaremos uma descrição mais específica sobre o TC, abrangendo desde aspectos moleculares, histológicos e biomecânicos.

Durante a atividade, o TC pode suportar cargas superiores a 3500 N, caracterizando-se como o mais forte tendão do corpo humano (72).

Porém, quando abordamos tendinopatias, o TC também ganha grande destaque, uma vez que é o tendão mais afetado por lesões (73). Patologias agudas e crônicas do TC são responsáveis por mais de 50% das lesões em todos os esportes (72). Dados apontam que 30% dos atletas não retornam ao esporte após um episódio de rompimento do TC e aqueles que retornam apresentam e mantêm uma *performance* abaixo da condição anterior à lesão (74).

Anatomicamente, em sua região proximal, as fibras do TC têm sua origem nas fibras musculares do grupamento tríceps sural (grupo muscular formado pelos músculos sóleo e gastrocnêmio lateral e medial), formando a junção miotendínea. Distalmente, a inserção do TC se dá na região superior, medial e inferior da tuberosidade do osso calcâneo (67).

Estudos recentes apontam que o TC tem uma estrutura torcida (*twisted structure*), o que estaria intimamente ligado à sua capacidade de manipulação de cargas funcionais, resultantes das atividades diárias (75). As diferenças no grau de torção deste tecido entre indivíduos (as torções no TC foram divididas em três graus de intensidade, sendo o tipo I com pouca torção, tipo II com moderada torção e tipo III com torções extremas) podem aumentar a suscetibilidade às lesões do TC (66, 75). As fibras mais superficiais, originadas da região medial do gastrocnêmio, apresentam um grau de torção muito menor, se comparadas às fibras mais profundas, que têm origem nos músculos gastrocnêmio lateral e sóleo (66).

Em relação às tendinopatias do TC, essas são caracterizadas de forma clínica, por uma combinação de dor, inchaço, rigidez matinal, aumento da sensibilidade e dificuldade na realização de atividades físicas, levando a uma diminuição da *performance* atlética (53). Além dos fatores de risco já comentados em capítulos anteriores, existe uma grande correlação estabelecida na literatura entre o uso de fármacos, como os corticosteroides e as fluoroquinolonas, e um maior risco a tendinopatias e, até mesmo, rupturas do TC (55, 76).

As doenças crônicas do TC são caracterizadas por um processo de cura do tendão fracassado (aumento da atividade celular com grande desorganização da MEC), com alterações histológicas e moleculares que predispõem o tecido ao desenvolvimento de instabilidades mecânicas, tornando-o, assim, mais suscetível ao dano (40, 53). São geralmente encontradas em atletas de meia idade (30 a 55 anos), como resultado de repetitivas lesões por *overuse* (73). Lesões bilaterais são comuns, e estudos apontam um índice de 30% dos pacientes com esta característica (53).

Em termos de localização, as lesões são divididas em dois grupos, dependendo do sítio de dor do indivíduo. As injúrias com maior incidência (55% a 65%) acometem a região medial do tendão (2 a 6 centímetros da inserção). O local com menor percentagem de casos (20% a 25%) é a região insercional do tendão, também conhecida como entese (52).

Essa maior incidência de lesões, na região medial do TC, pode ser explicada pela pequena vascularização do local (67). O TC é vascularizado por duas grandes artérias: a artéria tibial posterior fornece sangue às regiões proximais e distais, enquanto a artéria peroneal é responsável pela região medial do TC. Esse suprimento sanguíneo é caracterizado como idade-dependente, uma vez que diminui progressivamente com o envelhecimento (77).

Como já percebemos, as cargas mecânicas incidentes no TC são imensas (72). Sendo assim, análises biomecânicas que objetivam alcançar a falha deste tecido, principalmente em

testes de fadiga, são extremamente relevantes, gerando, por consequência, um maior entendimento das capacidades desse tecido (78).

Existem três parâmetros principais que visam a descrever as propriedades mecânicas teciduais (79): a tensão, relacionada à capacidade de alongamento/deformação do tendão em relação ao seu comprimento normal; o estresse, que está ligado à força incidida no tendão em relação à área de secção transversal; e a rigidez, referente às mudanças no comprimento do tendão em relação à força aplicada, caracterizando o grau de rigidez do tecido (módulos de Young) (78, 80).

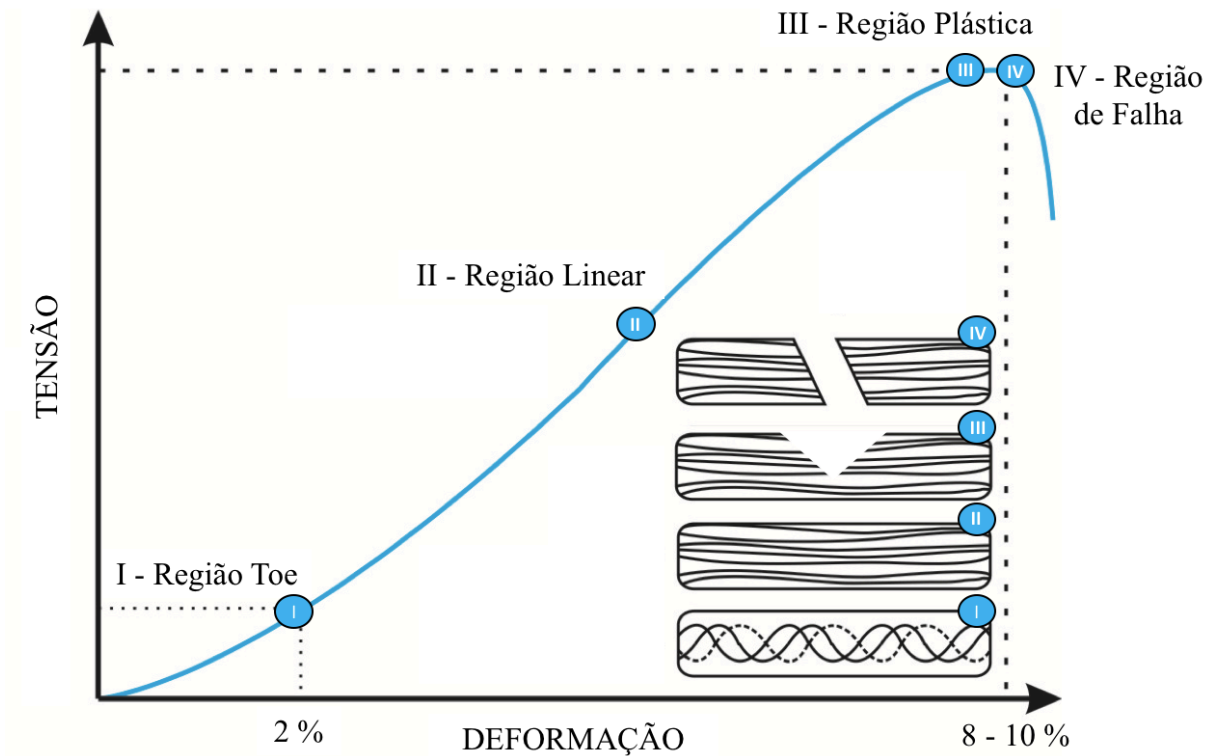
O comportamento do TC, durante atividades que exijam contrações do complexo tríceps sural, é semelhante a uma mola e está relacionado às propriedades viscoelásticas do tecido, garantindo, dessa forma, a capacidade de armazenar e liberar energia, especialmente em atividades como as corridas (80). Nesse tipo de exercício físico, o principal objetivo da unidade musculotendínea é consumir menos energia (33). O tendão tem papel crucial nessa finalidade, principalmente por sua característica anteriormente destacada de retenção de energia elástica (7). Dessa forma, é plausível hipotetizar que uma eventual disfunção muscular na sua capacidade de contração, como ocorre após uma lesão muscular, pode gerar um aumento de demanda no tecido tendíneo e predispor-lo a lesões.

Um mecanismo biomecânico aborda a relação força-comprimento e tensão-deformação do TC. Até certo ponto, com o aumento da força incidida, os tendões conseguem aumentar a rigidez do tecido, uma propriedade biomecânica extremamente importante (81, 82). Quando a ligação entre a capacidade e a demanda necessária (força e a carga) não são mais convincentes, a resultante é o aparecimento de microfalhas no tecido, até o seu rompimento total (81). Tais observações levam ao entendimento de que o acúmulo de lesões advindas do

overuse causam a degeneração do tecido, observada em diversos estudos (40, 50, 53), levando à fraqueza e posterior ruptura completa tecidual (81).

A identificação da quantidade de carga que o TC suporta, baseado na sua capacidade fisiológica, é a resultante de uma curva de tensão-deformação (*stress-strain*), que pode ser dividida em quatro regiões (83): a região inicial, classificada como região “*toe*”, é caracterizada pelo alinhamento das fibras de colágeno, saindo do estado “*crimped*” (aspecto ondulado no qual as fibras de colágeno se apresentam em seu estado natural). Esta primeira região possui um grau de rigidez muito pequeno, se comparado à região subsequente. A segunda região está relacionada ao alongamento das fibras de colágeno de forma elástica, sem causar danos ao tecido (região linear). A grande maioria das atividades físicas geram tensões que mantêm o tecido nestes dois primeiros graus. Se a tensão imposta for menor que 4%, o tendão retorna ao seu tamanho original. A terceira (região plástica) e quarta região (região de falha) são correspondentes ao início das microlesões das fibras de colágeno, até seu rompimento completo (alongamentos maiores que 10%) (78, 84) (figura 9).

Figura 9. Curva de tensão/deformação e suas quatro distintas regiões. (I) região *toe*, (II) região Linear, (III) região Plástica e (IV) região de Falha. A região *toe* representa o alinhamento das fibras de colágeno. Com 2% de tensão, todas as fibras já estão fora do seu estado “*crimped*”. Na região Linear, as fibras de colágeno respondem à carga de forma linear. As duas regiões subsequentes (plástica e de falha) representam o começo e a falha total das fibras de colágeno (acúmulo de microfalhas).



Por meio de análises biomecânicas dessa natureza, é possível a extração de dados a respeito da elasticidade, plasticidade, rigidez, ponto de falha e energia absorvida até a ruptura tecidual (84, 85).

1.5 Alterações morfológicas, moleculares e biomecânicas no tendão após lesão muscular

Os conhecimentos elucidados nos capítulos anteriores esclarecem a importância do maior entendimento sobre aspectos moleculares, morfoestruturais e biomecânicos dos mecanismos de adaptação do tecido tendíneo sadio ao estímulo de carga músculo-dependente, assim como frente às lesões. Estes dados evidenciam a necessidade de utilização e grande importância desse conhecimento na prática clínica, durante a elaboração de planos de

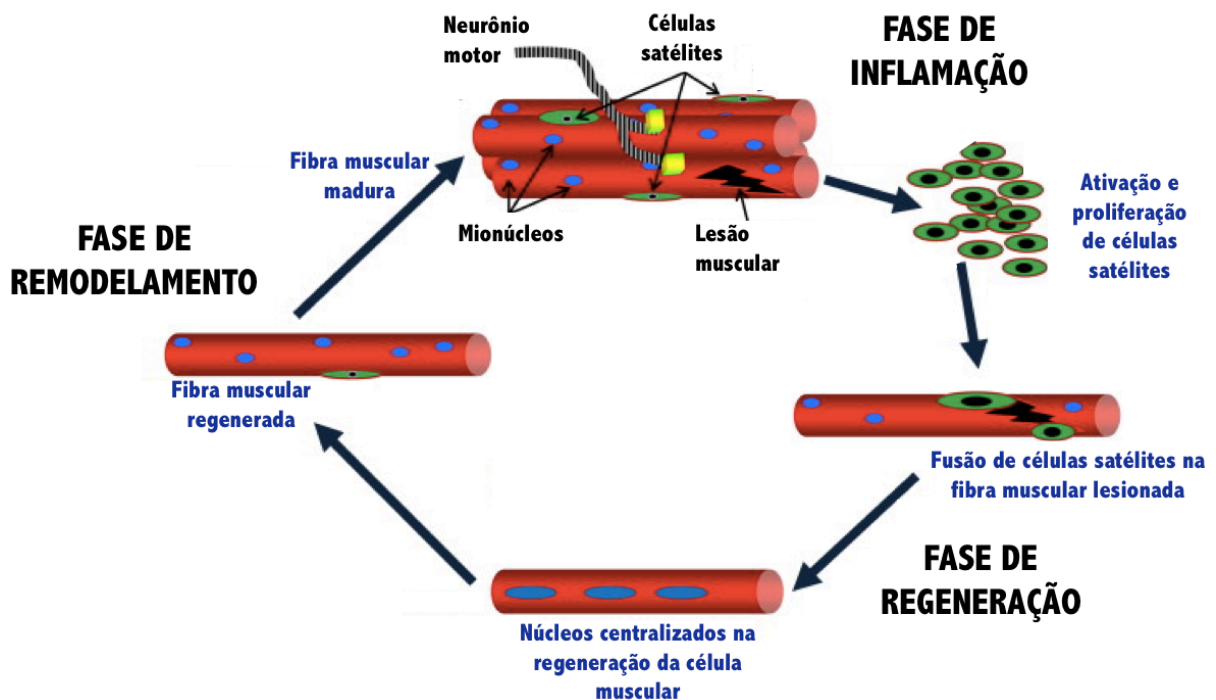
reabilitação e prevenção de injúrias, demonstrando o valor dos conhecimentos de ciência básica em um cenário aplicado.

No entanto, embora a ciência tenha se tornado robusta no que tange a pesquisas acerca de aspectos anatômicos do tendão, até possíveis mudanças moleculares, estruturais e biomecânicas, desencadeadas pela relação complexa de fatores intrínsecos e extrínsecos durante o processo lesivo, a bibliografia atual não contempla estudos *in vivo* que abordem possíveis alterações no tendão mediante um quadro de lesão muscular.

O tecido musculoesquelético representa cerca de 40% da massa corporal, formado a partir de feixes contráteis de fibras musculares multinucleadas. Sua grande capacidade de reparação está intimamente vinculada à presença de células tronco-musculares, conhecidas como células satélites, entre o sarcoplasma e a lâmina basal muscular (86).

A quebra da homeostase muscular, caracterizada por um processo lesivo, pode ser compreendida a partir de 3 fases distintas e sequenciais, conhecidas como inflamação, regeneração e remodelamento (86). Esta primeira etapa é caracterizada por ruptura e necrose das miofibras, formação de um hematoma e uma importante reação inflamatória que perdura, em média, até o quarto dia após lesão. Tais alterações são seguidas pela fagocitose do tecido danificado, levando à ativação das células satélites e início do processo de regeneração, persistindo por cerca de 2 semanas. A maturação das fibras e recuperação funcional caracteriza a última fase do processo, com duração média de três a quatro semanas (86, 87) (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática das três fases inter-relacionadas e dependentes, inerentes ao reparo muscular após lesão. Adaptado de (87).



Sabemos que as lesões musculares são responsáveis pela maioria das limitações funcionais observadas nos esportes, bem como na medicina ocupacional (88, 89). Embora o músculo tenha uma potencial capacidade de se regenerar e de restabelecer suas funções diante de um quadro de pequenas lesões, após lesões graves, o processo de regeneração muscular e cicatrização pode ser incompleto, geralmente resultando na formação de tecido fibrótico que prejudica a função muscular. Em virtude desses fatos, a literatura é extensa no que tange à investigação de abordagens de reabilitação, sendo o tratamento conservador, por meio da fisioterapia, uma estratégia com bom prognóstico (90, 91). No entanto, ainda não conhecemos o comportamento do remodelamento tendíneo, bem como de suas propriedades mecânicas, mediante um processo de degeneração e regeneração pós-lesão muscular.

Visto que as propriedades biomecânicas do tecido conjuntivo, advindas da MEC do tendão, sejam de suma importância para a transformação efetiva da tensão muscular em movimento (92) e que a principal função do tecido tendíneo (transferência da energia criada

pela contração muscular à unidade subsequente) também seja um dos principais estímulos mecânicos necessários para a manutenção da homeostase do seu próprio tecido (tendão) (11), é possível esperar uma quebra da homeostase tendínea, advinda da incapacidade muscular em gerar tensão.

Além disso, *déficits* funcionais, queda de *performance* atlética e até mesmo tendinopatias, ocorridas após uma lesão muscular, podem estar correlacionados a um desequilíbrio estrutural e funcional prévio do tendão, causado por uma redução de transmissão de carga mecânica temporária durante o processo de degeneração e regeneração muscular ou, até mesmo, a perturbação da comunicação contínua entre miócitos e tenócitos, causada pelo processo de inflamação e remodelamento muscular pós-lesão.

Dessa forma, o grande número de lesões agudas e crônicas no tendão, observadas principalmente no esporte (72), pode estar relacionado com possíveis mudanças estruturais no tecido tendíneo, após uma lesão muscular já restabelecida.

Nesse sentido, a hipótese deste estudo é que uma lesão no músculo GA, que acarrete prejuízo à manutenção do trofismo muscular, também será capaz de comprometer a integridade do TC e ocasionar adaptações deletérias a ambos os tecidos, podendo, assim, ser classificado como um novo fator de risco intrínseco para o desenvolvimento de tendinopatias.

Esperamos que, no tendão, a lesão muscular cause diminuição do conteúdo de colágeno do tipo I, aumento na expressão de colágeno do tipo III (indicando possível mau remodelamento tecidual), menor organização fibrilar, hipervascularização, grandes concentrações de MMP2 e MMP9 (indicando aumento na degradação de colágeno), aumento no conteúdo de glicosaminoglicanos na região fibrocartilaginosa e do número de células e proteoglicanos (figura 2), além de aumento da expressão gênica de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, ligados a processos de degradação do tecido. Essas são modificações

que podem prejudicar a função tendínea e sua capacidade de absorver energia no ensaio biomecânico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da lesão ocasionada nas porções medial e lateral do músculo gastrocnêmio (GA) nas propriedades biomecânicas, morfológicas/celulares e moleculares que implicam o remodelamento do tendão calcâneo (TC) de ratos após 3, 14 e 28 dias de lesão muscular (*time points* que caracterizam as três fases de regeneração muscular).

2.2. Objetivos Específicos

Determinar como a lesão do músculo GA influencia o remodelamento do TC sobre as propriedades da MEC junto aos componentes celulares após 3, 14 e 28 dias.

Identificar as alterações morfológicas e estruturais no TC acometidas pela lesão no músculo GA após 3, 14 e 28 dias.

Avaliar a função do TC por meio de testes biomecânicos após 3, 14 e 28 dias da lesão muscular no GA.

Identificar a expressão de genes chaves, relacionados ao remodelamento tendíneo do TC, após 3, 14 e 28 dias da lesão muscular no GA.

3. MANUSCRITO

Barin FR, de Sousa Neto IV, Vieira Ramos G, Szojka A, Ruivo AL, Anflor CTM, Agualimpia JDH, Domingues AC, Franco OL, Adesida AB, Durigan JLQ, Marqueti RC. Calcaneal Tendon Plasticity Following Gastrocnemius Muscle Injury in Rat. *Front Physiol.* 2019;10:1098.

Published 2019 Sep 3. doi:10.3389/fphys.2019.01098

CALCANEAL TENDON PLASTICITY FOLLOWING GASTROCNEMIUS MUSCLE INJURY IN RAT

Short Title: Tendon plasticity following skeletal muscle injury in rat

Fabrcio Reichert Barin^{1*}, Ivo Vieira de Sousa Neto^{1*}, Graciele Vieira Ramos^{1*} Alexander Szojka^{4*}, Amanda Lima Ruivo¹, Carla Tatiana Mota Anfror², José David Hurtado Agualimpia²; Allan Corra Domingues², Octávio Luiz Franco³, Adetola B. Adesida⁴, João Luiz Quaglioti Durigan¹, Rita de Cassia Marqueti¹

¹ Universidade de Brasilia, Faculdade de Ceilândia, Distrito Federal, Brazil

² Universidade de Brasilia, Faculdade do Gama, Distrito Federal, Brazil

³ Centro de Análises Protemicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

⁴ University of Alberta, Divisions of Orthopaedic Surgery & Surgical Research, Edmonton, Alberta, Canada

INTRODUCTION

Acute and chronic tendon disorders, most commonly affecting the calcaneus tendon (CT), account for up to 50% of all sports injuries (Jarvinen et al., 2005b; Egger and Berkowitz, 2017). Tendons are fundamental biomechanical structures that connect muscles to bone to produce movement through force transmission (Wang et al., 2012). Tendons improve the economy of movement and amplify power output by their spring-like properties (Benjamin et al., 2008; Roberts and Azizi, 2010; Wilson and Lichtwark, 2011; Wang et al., 2012). Tendons also perform as mechanical buffers to protect skeletal muscle during contraction (Konow et al., 2012).

To perform this range of actions, tendons present abundant specialized extracellular matrix (ECM) resistant to tensile and compressive forces composed of approximately 70% of water by mass and collagen (mostly type I and III), proteoglycans, and other non-collagenous proteins organized in a hierarchical manner (Kjaer, 2004; Lavagnino et al., 2015). In addition, tendon contains a relatively small number of cells known as tenocytes arranged along collagen type I fibers forming an interconnected 3-dimensional network of cell and ECM. Importantly, the tenocytes transduce muscle-dependent loads to elicit functional remodeling of the ECM; tendons therefore demonstrate plasticity for dynamic adaptation in response to mechanical demands (Benjamin et al., 2008; Andarawis-Puri et al., 2015; Bohm et al., 2015; Lavagnino et al., 2015).

Homeostasis between tendon and muscle units requires a continuous bidirectional communication or cross-talk between tenocytes and muscle cells, known as myocytes (Schweitzer et al., 2010; Peng et al., 2017; Connizzo and Grodzinsky, 2018). Peng et al. (2017) reported that CT rupture and reconstruction led to “morphomechanical alterations” including a decrease of fascicle length, muscle thickness, and mechanical properties of the associated gastrocnemius muscle. This implies that tendon rupture and immobilization perturbed the bidirectional communication between tendon and muscle with functional consequences. On the other hand, Connizzo and Grodzinsky (2018) demonstrated that tendon can be affected by muscle using a mouse rotator cuff explant culture model which included the humeral head, supraspinatus tendon, and supraspinatus muscle. The authors found that pro-inflammatory cytokines from muscle and bone during stress deprivation culture, i.e., culture without mechanical stimuli, may cause tenocyte death after 3 days, which suggests a potential muscle-

derived mechanism for onset of tendinopathy. Elsewhere, abnormal tendon loading such as underloading in cases of stress-shielding has been shown to induce an inflammatory response that weakens the structure and raise susceptibility to tendinopathies (Arnoczky et al., 2007; Cook and Purdam, 2009; Freedman et al., 2015; Bittencourt et al., 2016; Fouda et al., 2017). Such heterotypic interactions between tendon and skeletal muscle units may thus play a role in the etiology of tendinopathies and be relevant for clinical rehabilitation (Subramanian and Schilling, 2015).

Tendon morphogenesis is mediated by interactions with skeletal muscle *via* growth factors, protein migration, and force transmission (Freedman et al., 2015; Subramanian and Schilling, 2015). One of the major mechanosensitive pathways that control tendon responses to muscle-dependent loads during development and throughout life involves activation of latent transforming growth factor beta (*TGF- β*) in tendon ECM. This induces *SMAD 2/3*-dependent signal transduction and expression of transcription factors [e.g., mohawk homeobox (*MKX*), scleraxis (*SCX*), and *ERGI*] to induce collagen and proteoglycan synthesis (Subramanian and Schilling, 2015). Presumably, disruptions in muscle integrity as in the case of injury might lead to imbalances in these well-coordinated dynamic systems that in turn disrupt tendon integrity as well.

Although the cross-talk between tendon and muscle has been studied in recent years, to the best of our knowledge tendon plasticity in response to skeletal muscle injury has been neglected entirely. Thus, the aim of this study was to investigate the temporal effects of gastrocnemius muscle injury on the CT. We hypothesized that skeletal muscle injury would induce the CT to undergo maladaptive remodeling at the transcriptional level with concomitant harmful effects to morphology and biomechanical properties.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Experimental Groups

All procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. National Research Council, Washington D.C., USA). The research protocol received approval from the Animal Research Ethics Committee of the Catholic University of Brasilia, Brasília, Brazil (protocol number: 028/2015). Sixty-eight male Wistar

rats (*Rattus norvegicus albinus*; weighing 300 +/- 25 g and 4 months of age at the start of experiments) were randomly divided into four experimental groups: control (C) group (animals not exposed to muscle injury) and 3, 14, and 28 days post gastrocnemius muscle (GA) injury (3D, 14D, and 28D). These time points were chosen to capture possible alterations in tendon during the three phases of the muscle regeneration process. Three days post-injure represents a degeneration/inflammation phase characterized by rupture and necrosis of the myofibers, formation of a hematoma, and inflammatory response. Fourteen days post-injure represents the remodeling phase characterized by maturation of regenerated myofibers with recovery of muscle function, fibrosis, and scar tissue formation. Twenty-eight days post-injure represents the complete or partial muscle maturation/ functional repair. (Laumonier and Menetrey, 2016). The rats were placed in collective cages with members of the same group (3–4 animals/cage) with water and standard rodent chow (Purina®, Descalvado, São Paulo, Brazil) available *ad libitum* and exposed to 12 h light/dark cycles with temperature maintained at 20–22°C during the experiments.

Muscle Injury (Cryolesion) Protocol

The rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg of body weight) and ketamine (95 mg/kg of body weight) for the surgical procedures. To induce muscle injury in the medial and lateral belly of the GA, the skin around the muscle was first trichotomized and cleaned. A transversal skin incision (1 cm) over the muscle belly was then performed to expose the GA muscle. To induce cryolesions, a rectangular iron bar (length = 4 cm; width = 0.4 cm and height = 0.4 cm; total area = 6.56 cm²) was frozen in liquid nitrogen and then applied twice for 10 s to the GA muscle belly. The same procedure was repeated twice with a 30 s interval in between. After that, the skin was sutured using nylon thread 4–0 (Shalon Medical). This protocol is a common procedure and has already used in other studies (Miyabara et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Durigan et al., 2008; Vieira Ramos et al., 2016) promoting muscle injury in TA muscle. This model induces a homogeneous injury in GA restricted to the surface region of the muscle belly which produces injuries similar to muscle contusion lesions (Jarvinen et al., 2005a).

Muscle and Tendon Sample Collection

One at a time, the animals were euthanized using an intraperitoneal injection of

xylazine solution (24 mg/kg of body weight) and ketamine (100 mg/kg of body weight) after the experimental periods and harvested. The CT was immediately dissected from posterior paws (3–8 min) and either; (1) frozen in RNase-free microtubes using liquid nitrogen (for qPCR) and then stored at -80°C ; (2) fixed with 4% formaldehyde in (PBS, pH 7.4) for histological analysis; or (3) placed in physiological saline to prevent drying for mechanical testing. CT samples were approximately 8 mm in length and 1.5–2.5 mm in diameter.

Muscle Histological Analysis

Serial histological cross-sections of the GA belly muscles were obtained (10 μm) using a cryostat microtome (Microm HE 505, Jena, Germany). The cross-sections were stained with hematoxylin and eosin (HE, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pictures of the cross-sections were acquired using an Olympus BV51 microscope equipped with an SV Micro Sound Vision digital camera (Preston South, Australia) at 10 \times magnification.

To confirm the presence of GA muscle injury in the cryolesion model, the signs characterized were: the presence of tissue infiltration with polymorphonuclear cells, disrupted and hypercontracted muscle fibers as well as centralized nuclei as previously reported (Oliveira et al., 2006; Durigan et al., 2008; Vieira Ramos et al., 2016). Posteriorly, one histological cross-section of each GA muscle located in the central region of muscle injury was chosen to measure the total cross-sectional area, injury area, and uninjured area of the muscle using a software for morphometry (Image J 1.44p - National Institutes of Health, Bethesda, MD). To measure those areas, previously, pictures of the cross-section of each muscle were obtained by light microscopy to reconstruct the total muscle cross-section using a software PTGui Pro version 11.15. These procedures permitted us to identify and measure the injury and uninjured areas of the muscle for clarifying the injury \times recovery time points.

Calcaneus Tendon Histological Analysis

To evaluate morphological properties, the CT from 16 animals (4 per group) was fixed using 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h at 4°C . After this step, they were washed in distilled water, serially dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin.

Serial longitudinal sections (5 μm) of the peritendinous sheath and tendon proper were taken from the proximal and distal regions. The whole tendon was dissected out, and the

longitudinal sectioning was cut (including proximal and distal regions) using glass knives and stained with hematoxylin and eosin (HE). This allowed investigation of adipose cells, blood vessels, and tendon cells from each region of the CT. Moreover, Masson's trichrome staining was performed according to the standard procedures to examine the general appearance of collagen deposition (Woo et al., 2006; Tang et al., 2014). Pictures of the longitudinal-sections were acquired as described above. The proximal region of CT was determined by the myotendinous junction to its middle portion, and the distal region was determined by the middle portion to the CT enthesis.

Image Analysis

For tendon H&E staining, 10 nonconsecutive digital images per region (peritendinous sheath and tendon proper, proximal and distal) were analyzed using Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). A planimetry system using a translucent Weibel grid (Weibel, 1979) superimposed to each image was used to determine the volume density ($V_v\%$) of adipose cells, blood vessels (lumen of blood vessel, endothelial cells, and perivascular sheath), other peritendinous sheath cells (includes all types of sheath cells, such as tenocytes, synovial cells, except adipose, and blood vessels cells), and tendon proper cells (fibroblasts and fibrochondrocyte-like cells). The stereology was performed by the point-counting method using coincidence of the grid points with the structures mentioned above. For the volume density estimation, the percentage of each structure in the peritendinous sheath and tendon proper was determined by multiplying the total number of grid points that coincide with the structures of interest by 100 and dividing by the total number of grid points falling on the peritendinous sheath or on the tendon proper.

ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) was used in quantitative Masson's trichrome analysis (Hernandez-Morera et al., 2016). Collagen fibers were quantified using these steps: image acquisition and processing, setting the scale, deconvolution of the color images, and quantification of the collagen fibers. The entire protocol was performed as described previously by Chen et al. (2018).

RNA Extraction From TC Samples

Samples from 24 animals (6 per group) were homogenized in a tube containing five

stainless steel balls (diameter, 2.3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) and three silicon- carbide sharp particles (1 mm) (BioSpec Products) by being shaken in a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). To attain complete tissue homogenization, the shaking process was repeated seven times with ice cooling between each shaking step to help prevent RNA degradation. Total RNA was extracted according to the TRIzol method described by Chomczynski and Sacchi (1987). A NanoDrop® spectrophotometer (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) was used to quantify RNA concentrations in each sample by determining the absorbance ratio of 260–280 nm. *TURBO DNA-freeKit* (Ambion – Life Technologies – 1907 M) was used for DNA digestion, according to the manufacturer’s recommendations.

qRT-PCR Reverse Transcription

For the evaluation of CT gene expression, a total of 1 µg of RNA extracted from each tendon were converted into cDNA (final volume 20 µL) using *SuperScript™ VILO™ MasterMix* reverse transcriptase (Invitrogen-Cat. 11755-010) according to the manufacturer’s protocol. To perform reverse transcription, the samples were incubated at 25°C for 10 min, at 42°C for 60 min, and at 85°C for 5 min before being stored at –20°C in a freezer.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR was performed using *TaqMan Universal PCR Master Mix* system (Applied Biosystems, CA, USA – Cat. 4304437). Ten microliters of GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega – A6102) were homogenized and combined with 1 µL of the primer 20×, an amount of cDNA determined according to the standard curve, and water for a final volume of 20 µL. The amplification reaction was performed by QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems) according to the manufacturer’s instructions.

qRT-PCR was performed using a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) for the following genes: β-actin (*ACTB*), *ADAMTS-4*, biglycan (*BGN*), Type I collagen alpha 1 chain (*COL1A1*), Type III collagen alpha 1 chain (*COL3A1*), connective tissue growth factor (*CTGF*), decorin (*DCN*), *ERGI*, fibromodulin (*FMOD*), fibronectin (*FN*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), pro-insulin like growth factor IA (*IGF-1a*), interleukin-6 (*IL-6*), mohawk (*MKX*), matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*), ribosomal

protein lateral stalk subunit P0 (*RPLP0*), scleraxis (*SCX*), Smad2 (*SMAD-2*), Smad3 (*SMAD-3*), syndecan-4 (*SDC-4*), transforming growth factor beta 1 (*TGF- β 1*), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (*TIMP-1*), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (*TIMP-2*), tenascin C (*TNC*), tenomodulin (*TNMD*) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*) (**Table 1**).

Table 1. List of tested genes:

mRNA	Code (Life technologies)	mRNA	Code (Life technologies)
<i>ACTB</i>	rn00667869	<i>MKX</i>	rn01755203
<i>ADAMTS-4</i>	rn02103282	<i>MMP-2</i>	rn01538170
<i>BGN</i>	rn01529736	<i>RPLP0</i>	rn03302271
<i>COL1A1</i>	rn01463848	<i>SCX</i>	rn01504576
<i>COL3A1</i>	rn01437681	<i>SMAD-2</i>	rn00569900
<i>CTGF</i>	rn01537279	<i>SMAD-3</i>	rn00565331
<i>DCN</i>	rn01503161	<i>SDC-4</i>	rn00561900
<i>ERG1</i>	rn00561138	<i>TGF-β1</i>	rn00572010
<i>FMOD</i>	rn00589918	<i>TIMP-1</i>	rn01430873
<i>FN</i>	rn00569575	<i>TIMP-2</i>	rn00573232
<i>GAPDH</i>	rn01775763	<i>TNC</i>	rn01454947
<i>IGF-1a</i>	rn00710306	<i>TNMD</i>	rn00574164
<i>IL-6</i>	rn01410330	<i>VEGF</i>	rn01511602

β -actin (*ACTB*), ADAMTS-4, Biglycan (*BGN*), Type I collagen alpha 1 chain (*COL1A1*), Type III collagen alpha 1 chain (*COL3A1*), Connective tissue growth factor (*CTGF*), Decorin (*DCN*), ERG1, Fibromodulin (*FMOD*), Fibronectin (*FN*), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), Pro-insulin like growth factor IA (*IGF-1a*), Interleukin-6 (*IL-6*), Mohawk (*MKX*), Matrix Metalloproteinase-2 (*MMP-2*), Ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (*RPLP0*), Scleraxis (*SCX*), Smad2 (*SMAD-2*), Smad3 (*SMAD-3*), Syndecan-4 (*SDC-4*), Transforming growth factor beta 1 (*TGF- β 1*), Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (*TIMP-1*), Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (*TIMP-2*), Tenascin C (*TNC*), Tenomodulin (*TNMD*) and Vascular endothelial growth factor (*VEGF*).

For each gene, all samples were amplified simultaneously with technical duplicates from the same cDNA in a single run. The expression of each target gene was normalized based on the expression of the constitutive RPLPO gene, which was used as the control of endogenous

RNA, due to lower intra and intergroup variability compared to the other housekeeping genes tested (*GAPDH* and β -actin). The Δ Ct values of the samples were determined by subtracting the mean Ct value of the target gene from the mean Ct value of the housekeeping gene. Subsequently, the $\Delta\Delta$ Ct values were calculated by subtracting the Δ Ct value of the condition of interest from the Δ Ct of the control condition. Finally, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ values were computed for presentation of relative expression data.

It is important to highlight that the amount of sample and the efficiency of the reaction of each gene analyzed in the present study were determined from a standardization curve, having slope reference parameters equal to -3.3 , $R^2 = 0.9-1.0$ and efficiency above 90%. All data generated or analyzed in this study were displayed at a database repository Gene Expression Omnibus (GEO, NCBI) (Accession-GSE131884)¹.

Biomechanical Tests

The test length and cross-sectional area (CSA) of tendons were determined by measuring the width and thickness of three different parts of the test region using digital calipers (Digimess Instrumentos de Precisão Ltda., São Paulo, SP, Brazil) and multiplying their means before the test. The 28 tendons (7 per group) were fixed to an Instron 5500R test instrument by clamps attached to their proximal and distal regions. Custom-sized clamps wrapped with filter paper were used to protect the specimens from macroscopic damage and/or slipping off during testing (Probst et al., 2000). Each tendon was stretched to failure at a constant displacement rate of 1 mm/min using a 0.2 kN load cell (S2 transducer force – S2M/200N-1 – HBM, Inc., USA) (Tohyama and Yasuda, 2000). The data were used to construct force- displacement curves from which the stress-strain curves were derived. Based on these curves, the following parameters were calculated: displacement at maximum load (mm), maximum load (N), maximum stress (MPa), maximum strain (%), elastic modulus (MPa), energy to failure (N-mm), and CSA (mm^2) according to de Cassia Marqueti et al. (2017) and Nakagaki et al. (2007). Each sample elastic modulus was calculated based on the slope of the linear portion of the stress-strain curve. All biomechanical tests for each time point were performed in a single day by a single operator.

Statistical Analysis

The results from gene expression were presented according to Heinemeier et al.

(2007b) and Marqueti et al. (2018). The Shapiro-Wilk test was applied to check for normality of variables, and Levene's test was used to analyze homogeneity of variance. For the variables that did not have homogeneity of variance, the Welch test was applied to adjust the degrees of freedom of the residuals. Mean values were compared between groups by one-way ANOVA with the Bonferroni correction. In relation to the data that did not present normal distribution, the nonparametric Kruskal-Wallis test was applied. When appropriate pairwise comparisons were performed using Dunn's procedure with Bonferroni correction for multiple comparisons, the level of significance was $p \leq 0.05$. All analyses were conducted with statistical package for social sciences (SPSS, Inc., v. 21.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, California, USA). Stress-strain and force-displacement curves were generated using MATLAB (Release 2018A).

RESULTS

Morphology of Muscle Lesions

In order to evaluate the presence of muscle injury after cryolesion, qualitative analysis of histological sections stained with HE was performed in all experimental groups (Figure 1). Cross-sectional area of GA muscle in C group showed intact muscle fibers, with no sign of injury (Figure 1A). In contrast, in 3D group post-injury, necrotic fibers, hypercontracted fibers, and inflammatory infiltrate, labeled in the figure by the flags [hash (#), paragraph (§), and asterisk (*), respectively], indicated the lesion was in the inflammatory phase of healing (Figure 1B). In the 14D group post-injury, centralized nuclei were visible (indicated in the figure by the black arrow), characterizing a regenerative process (Figure 1C). Finally, in the 28D group post-injury central nucleation had almost disappeared (a sign of regeneration in injured muscles) (Vieira Ramos et al., 2016), evidencing that muscle regeneration was nearing completion. In general, the characteristics described above confirm that cryolesion caused injury in the GA muscle.

Animals Weight, Muscle Weight, and Injury and Uninjured Cross-Sectional Area of GA Muscle Middle Belly

We observed higher injury area in the 3D and 14 D groups when compared with the C group, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.001$), besides the 14D group showed the lowest values

when compared to the 3D group ($p = 0.001$). Additionally, the 28D group displayed lower injury area when compared with the 3D and 14D group, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.001$). The total area was lower in the 14D group when compared with the C and 3D group, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.01$; Table 2). No changes were observed in animals and muscle weight among the experimental groups ($p > 0.05$).

Table 2. Animals weight, Muscle weight and injury and uninjured cross-sectional area of GA muscle middle belly (mm^2). The experimental groups: control (C), 3 days (3D), 14 days (14D) and 28 days post gastrocnemius muscle injury (28D). a = significantly different from C; b = significantly different from 3D; c = significantly different from 14D, $p < 0.05$. (n = 4 per group).

Groups	Animal Weight (g)	Muscle Weight (g)	Total area (mm^2)	Injury area (mm^2)	Injury area (%)	Uninjury area (mm^2)	Uninjury area (%)
C			15.975 ± 1.542	0	0	15.975 ± 1.542	100
3D	354.5 ± 34.6	1.67 ± 0.15	14.678 ± 2.303	1.773 ± 330.5 ^a	12.1	12.905 ± 3.152	87.9
14D	338.8 ± 22.2	1.56 ± 0.05	10.374 ± 1.141 ^{a,b}	0.581 ± 0.13 ^{a,b}	5.6	9.793 ± 1.068 ^a	94.4
28D	361.5 ± 38.0	1.63 ± 0.15	12.484 ± 921.4 ^a	0 ^{b,c}	0	12.484 ± 921.4	100

Muscle Injury Alters Gene Expression in Rat Calcaneus Tendon

In order to analyze the GA lesion impact on CT, the expression of key genes that regulate the ECM in tendon homeostasis and remodeling was evaluated. Gene expression analysis was normalized by constitutive gene RPLP0. We also tested housekeeping genes β -actin and GAPDH but they were not stable; notably, GAPDH was the least stable gene expressed of all genes tested.

Growth factors: TGF- β 1 mRNA levels were upregulated in the 28D group when compared with C and 3D groups, respectively ($p = 0.02$; $p = 0.001$; Figure 2A). No changes were observed in mRNA levels of VEGF gene expression among the groups ($p > 0.05$; Figure 2B). IGF-1a mRNA levels were significantly upregulated in the 28D group when compared with the 3D group ($p = 0.02$; Figure 2C). CTGF mRNA levels were downregulated in the 3D group when compared with the C group ($p = 0.001$; Figure 2D), whereas the 14D and 28D groups demonstrated upregulation when compared with the 3D group ($p = 0.02$ and $p = 0.01$, respectively; Figure 2D).

Structural proteins: COL1A1 mRNA levels were downregulated in the 3D group when

compared with the C group ($p = 0.03$; Figure 2E). However, the 14D group showed upregulation when compared with the 3D group ($p = 0.001$; Figure 2E). Regarding COL3A1, the 14D group displayed upregulation in mRNA levels when compared with the C group ($p = 0.02$; Figure 2F).

Small leucine rich proteoglycans (SLRP): DCN mRNA levels were significantly upregulated in the 28D group when compared with the 3D group ($p = 0.001$; Figure 2H). No changes were observed in mRNA levels of BGN and FMOD ($p > 0.05$; Figures 2G,I).

Matrix remodeling enzymes: MMP-2 mRNA levels were upregulated in the 3D group when compared with the C group ($p = 0.02$; Figure 2J), whereas the 14D and 28D groups demonstrated upregulation when compared with the 3D group, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.001$; Figure 2J). Additionally, TIMP-1 mRNA levels were downregulated in the 28D group when compared with the C and 3D group, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.002$; Figure 2K). On the other hand, TIMP-2 mRNA levels were downregulated in the 3D group when compared with the C group ($p = 0.01$; Figure 2L); however, the 14D and 28D groups showed upregulation compared with the C ($p = 0.01$; $p = 0.04$ Figure 2L) and 3D groups, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.001$; Figure 2L).

Cytokine: No changes were observed in mRNA levels of IL-6 among the groups ($p > 0.05$; Figure 2M).

Developmental/progenitor and differentiation factors: TNMD mRNA levels were significantly upregulated in the 28D group when compared with the C, 3D, and 14D groups, respectively ($p = 0.01$; $p = 0.001$; $p = 0.001$; Figure 2N). No changes were observed in mRNA levels of SMAD-2 among the groups ($p > 0.05$; Figure 2O). However, SMAD-3 mRNA levels were upregulated in the 14D group when compared with the 3D group ($p = 0.01$; Figure 2P), but the 28D displayed downregulation when compared with the 14D group ($p = 0.01$; Figure 2P). SCX and ERG-1 mRNA levels were significantly upregulated in the 28D group when compared with the C ($p = 0.001$; $p = 0.02$; Figures 2Q,T), 3D ($p = 0.002$; $p = 0.001$; Figures 2Q,T), and 14D groups, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.004$; Figures 2Q,T). Moreover, MKX mRNA levels were upregulated in CT of the 14D and 28D groups when compared with the C ($p = 0.04$; $p = 0.001$; Figure 2R) and 3D groups, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.001$; Figure 2R). No changes were observed in mRNA levels of ADAMTS-4 among the groups ($p > 0.05$; Figure 2S).

Matricellular proteins: No changes were observed in mRNA levels of SDC-4 among the experimental groups ($p > 0.05$). However, FN and TNC mRNA levels were significantly upregulated in the 14D and 28D groups when compared with the 3D group, respectively ($p = 0.01$; $p = 0.01$; $p = 0.01$; $p = 0.01$; Figures 2G,H,U,V,X).

Light Microscopy of Tendon Hematoxylin and Eosin Staining

HE staining was performed to investigate adipose cells, blood vessels, peritendinous sheath cells, and tendon proper cells in proximal and distal regions of CT (Figures 3A-P,A1-J1). The 14D group presented lower adipose cell Vv% in the proximal region of the CT when compared with 3D group ($p = 0.01$; Figures 3K,A1). Moreover, the 28D group displayed decreased adipose cell Vv% when compared with the C and 3D groups, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.001$; Figures 3O,B1). We also observed higher blood vessel Vv% in the proximal region of tendon proper in the 14D group when compared with the C group ($p = 0.002$; Figures 3I,E1); however, the 28D group showed lower blood vessel Vv% in the same region of tendon proper when compared with the 14D group ($p = 0.01$; Figures 3M,E1). Finally, 14D and 28D groups demonstrated increased peritendinous sheath cell Vv% in the proximal region when compared with the C ($p = 0.04$; $p = 0.001$; Figures 3K,O,G1) and 3D groups, respectively ($p = 0.04$; $p = 0.001$; Figures 3K,O,G1).

No significant differences were observed between the groups with respect to blood vessel Vv% of peritendinous sheath and tendon proper cell Vv% in the proximal region of the CT ($p > 0.05$; Figures 3C,I1).

On the other hand, the 28D group presented lower cell Vv% in the distal region of tendon proper of the CT when compared with the C and 14D groups, respectively ($p = 0.04$; $p = 0.04$; Figures 3N,J1). Lastly, no significant differences were observed between groups with respect to adipose cell Vv% and blood vessel Vv% of peritendinous sheath and in tendon proper and peritendinous sheath cell Vv% in the distal region of the CT ($p > 0.05$; Figures 3B1,D1,F1,H1).

Light Microscopy of Tendon Masson's Trichrome Staining

Subsequently, the collagen content was analyzed in CT by Masson's trichrome staining. Collagen content decreased in the distal region of the 3D group when compared with

the C group ($p = 0.02$; Figures 4C,I). The 14D group displayed lower collagen content when compared with the C and 3D groups, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.03$; Figures 4E,I). However, collagen content increased in the 28D group when compared with the 3D and 14D groups, respectively ($p = 0.01$; $p = 0.001$; Figures 4G,I).

With regard to the proximal region, collagen content decreased in the 14D group when compared with the C and 3D groups, respectively ($p = 0.001$; $p = 0.01$; Figures 4F,J), whereas collagen content increased in the 28D in comparison with 14D group ($p = 0.01$; Figures 4H,J).

Tendon Biomechanical Properties Analysis

Figure 5 shows the force-displacement curves (A) obtained for the C, 3D, 14D, and 28D groups, from which the stress-strain curves were derived (Figure 5B). Of the six samples in each group that were subject to tensile testing, any that showed a sudden drop in force without breaking, i.e., evidence of slipping, on the force-displacement curves were excluded from the analysis: 0/6 from C; 1/6 from 3D; 2/6 from 14D; 1/6 from 28D. These samples otherwise, showed similar force-displacement profiles to those in their respective experimental groups; thus, the slipping was likely due to insufficient clamping of the samples rather than those samples being of particularly high-stiffness. For this reason, we do not believe that excluding them introduced a selection bias into the study.

Differences in the profile of stress-strain curves (Figure 5B), the 28D showed a greater capacity of resistance to tensional load despite of stiffnesses observed when compared with others groups. The analysis of the material properties was based on these curves and will be described below.

The maximum load in CT increased in 28D when compared with the 3D group ($p = 0.02$; Figure 6A). Regarding tendon extension (displacement at maximum load), the 3D group showed a lower maximum extension when compared to the control group ($p = 0.04$). In addition, 28D group decreases tendon extension compared to the other experimental groups ($p = 0.02$; Figure 6B). The maximum stress in tendon increased in 28D when compared with the 3D group ($p = 0.02$; Figure 6C).

The 3D group showed a decrease of maximum strain compared to control group ($p = 0.001$). However, the 14D group showed an increase of maximum strain compared to C and 3D

groups, respectively ($p = 0.001$ and $p = 0.001$). Additionally, 28D displayed lower maximum stress when compared to the other experimental groups ($p = 0.001$; Figure 6D). Finally, 3D showed increased elastic modulus when compared with the control group and 28D groups showed the highest elastic modulus values when compared to the other groups ($p = 0.016$ and $p = 0.001$; Figure 6E). No significant differences were observed between groups with respect to energy to failure and cross-sectional area ($p > 0.05$; Figures 6F,G).

DISCUSSION

This study investigated the effects of skeletal muscle injury on time-course effects on the expression of key genes involved in tendon remodeling as well as the morphological and biomechanical properties of the calcaneal tendon (CT).

For the first time, the present study demonstrated tendon plasticity in terms of gene expression as well as morphological properties and biomechanical adaptations in response to skeletal muscle injury. The morphological analysis was performed in the proximal and distal regions of CT. Although the proximal and distal regions are basely fibrous, the distal region of the CT is subjected to different levels of compressive forces and friction than the proximal region (Covizi et al., 2001). It was observed that distinct regions of CT differ in its response to muscle injury stimuli. Our new understanding of tendon plasticity in response to skeletal muscle injury may have crucial implications for treatment of tendinopathy.

Tendon Response at Three Days Post Muscle Injury (3D)

The muscle showed the greatest disruption at 3D, indicating that the CT might also have been affected at this time point (Figure 1). Modulation in CTGF and COL1A1 gene expression has been previously reported after tendon perturbations such as exercise (net collagen degradation after 24–36 h followed by net synthesis by up to 72 h) (Magnusson et al., 2010) and tendinopathies models (reduction in COL1A1 both 24 and 72 h of glutamate exposure) (Dean et al., 2015). The novelty of our study was that skeletal muscle injury also decreases CTGF and COL1A1 gene expression in tendon after 3 days. These results coincide with decreased collagen content in the distal tendon region at the same time, indicating what may be a progression toward a degenerative status. CTGF modulates many biological processes in tendon, including cell adhesion, migration, proliferation, and angiogenesis (Chiquet et al.,

2003; Nakama et al., 2006; Liu et al., 2015b).

Blockade of CTGF action or inhibition of CTGF synthesis may be associated with a decrease of collagen synthesis in fibroblast cellular culture (Duncan et al., 1999), which can cause detrimental effects on structural support, protection, and maintenance in tendon functional integrity. A plausible explanation for the downregulation of CTGF and COL1A1 and decreased collagen content at 3D could be the lack of mechanical stimulus in tendon induced by muscle injury (i.e., stress shielding), since previous studies reported that mechanical stress can induce a high-level of CTGF expression and collagen I synthesis (Schild and Trueb, 2002; Chiquet et al., 2003; Heinemeier et al., 2007a; Galloway et al., 2013). These data suggest that collagen homeostasis is disrupted at 3D following muscle injury.

The ECM homeostasis is in part controlled by the balance of MMPs and TIMPs (Minkwitz et al., 2017); thus, the decrease of MMP-2 and TIMP-2 at 3D post injury suggests that the tendon was undergoing remodeling in response to the skeletal muscle injury. In addition, muscle injury likely hinders the normal molecular interactions between tendon and skeletal muscle such as MMPs, growth factors, and migration/proliferation of proteins that modulate tendon morphogenesis (Subramanian and Schilling, 2015; Thankam et al., 2016). Overall, muscle injury appeared to disrupt normal homeostatic molecular signaling in CT.

The disruption at the gene expression level at 3D in CT was associated with a disruption in biomechanical properties. Specifically, the maximum strain in tendons was significantly reduced by 2.9-fold at 3D stress-strain curve; further, the stress-strain curve appeared considerably steeper compared to the uninjured control. This demonstrates that just 3D of muscle injury was sufficient to induce considerable mechanical alterations in tendon with reduced ability to withstand strain. Previous studies have shown that tendon biomechanical properties depend upon small leucine-rich proteoglycans (SLRPs; decorin and biglycan in particular) (Robinson et al., 2017). SLRPs are the predominant proteoglycans in tendon with decorin accounting for around 80% of the total proteoglycan content of the tissue (Samiric et al., 2004). In the present study, there were downward trends in gene expression of both decorin and biglycan at 3D relative to the control.

The tendon ECM remodeling and biological function are intimately linked to mechanical load and muscle contraction intensity (Galloway et al., 2013). It has been

demonstrated that external controlled load through exercise is a primary factor to promote tissue remodeling, which can lead to structural and functional improvements (Galloway et al., 2013). However, overloading above the tendon capacity is widely studied for their potential damaging factor, as well as the abolition of muscle load (Millar et al., 2017). The muscle injury performed in the present study showed a great traumatic process in the muscle. Experimental studies have demonstrated biomechanical changes in CT only after 4 weeks of complete stress shielding in calcaneus tendon (Ikoma et al., 2013; Kaux et al., 2013). Likewise, at least 5 weeks of high-power strength training protocols, focused on the triceps sural complex, have been shown useful in modifying mechanical variables (Kubo et al., 2007). This factor demonstrates that mechanical privacy (by the abrupt decrease of muscle activity) in the current study have been enough to generate significant mechanical alterations in the tendon.

Fourteen Days Post Injury (14D)

Types I and III collagen showed variable expression over time. The upregulation of COL1A1 post 14 days was associated with increased MKX and SMAD3, which are important regulators of ECM production including expression of COL1A1 (Berthet et al., 2013; Liu et al., 2015a). In contrast, COL3A1 showed a trend toward a decrease at 3D post-injury relative to the control followed by a further decrease at 14D. At the same time, Masson's trichrome staining revealed lower collagen content at 14D relative to the control and the 3D post injury group. The decline in collagen content at 14D may thus be reflected in the shallower stress-strain curve at 14D relative to 3D. We might speculate that the increase of COL1A1 gene expression at 14D post-muscle injury may reflect a compensatory mechanism, producing collagen in response to the altered mechanical properties at 3D.

These findings with respect to type I collagen may be supported by the abundance of peritendinous sheath cells found in the 14D post skeletal muscle injury group. These cells may have roles in restoring collagen content. In addition, the upregulation of CTGF, FN, MMP-2, TIMP-2, SMAD3, and MKX 14 days post injury in comparison to 3D, indicating that tendon undergoes adaptation following skeletal muscle injury. This may have clinical relevance in the prevention and treatment of musculoskeletal injuries (Benjamin et al., 2008; Bohm et al., 2015).

While blood vessels in the control group were limited to the peritendinous sheath, we found them trend toward an increase in abundance at 14D in the peritendinous sheath and

penetrating the tendon proper. This may have provided the nutritional and metabolic support for the active ECM remodeling in the CT in response to skeletal muscle injury. However, we also observed a downward trend in VEGF gene expression in 3D and 14D compared to the control group. Further investigations are required to explain this contradictory result; it may suggest that other adjacent molecular pathways or post-translational regulation were involved in producing the observed vascularization.

Twenty-Eight Days Post Injury (28D)

Twenty-eight days post skeletal muscle injury had increased peritendinous sheath cell content in the proximal region of tendon compared with the control group. Moreover, 28D showed similar collagen content to the control group, suggesting recovery from the loss of collagen observed at 14D. These aspects may be linked to increased TGF- β 1 expression observed at 28D. TGF- β 1 is an important factor in stimulating ECM growth, turnover, and remodeling, being a well-known promoter of tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis (Kjaer, 2004; Gumucio et al., 2015; Goodier et al., 2016). SCX, MKX, and ERG1, which are important transcription factors during tendon development and repair, also appear to regulate expression of matrix molecules as TNMD which is consistent with the concurrent upregulation of all these genes at 28D (Murchison et al., 2007; Shukunami et al., 2016; Wu et al., 2017). As well, these genes are regulated by the TGF- β superfamily (Mendias et al., 2012; Subramanian and Schilling, 2015).

SCX regulates fibroblast proliferation and initiation of tenocyte differentiation in response to mechanical stimuli (Murchison et al., 2007). Previously, decreased SCX was shown to be related to removal of tendon load, whereas it increased dramatically in response to physiological loading (Mendias et al., 2012). For example, Murchison et al., 2007 reported that mice with loss SCX expression have a disorganized ECM and reduced collagen which compromise the power transmission capacity of tendon. Thus, these adaptations post 28 days skeletal muscle injury may be important to maintain joint movement, passive elastic response, and the restoration of tendon strength (Subramanian and Schilling, 2015). For their part, MKX and ERG1 were shown to be involved in the maintenance of differentiated tenocytes (Wu et al., 2017).

TNMD is a tendon-specific gene marker, known to be important for tendon maturation

(Docheva et al., 2005). TNMD plays a role in proliferation, differentiation, and migration of tendon progenitor cells (TSPCs) as well as endothelial cells (Shukunami et al., 2005, 2016). Our findings demonstrate that regulation of SCX, MKX, ERG1, TGF- β 1, and TNMD are linked to increased muscle activity. This agrees with previous studies showing overexpression of TGF- β , SCX, and TNMD induced by mechanical loading.

Previous studies have found structural (i.e., collagen fibrils irregularly arranged and loose) and biomechanical changes (i.e., poor dynamic storage energy) in CT after few weeks of complete stress shielding in calcaneus tendon (44, 45). In respect to biomechanical properties following skeletal muscle injury, it appears that after 28D, the CT retains similar load-bearing capacity to the uninjured control. However, the CT appeared to lose flexibility at 28D, given that it had increased Young's modulus compared to all time points and the least ability to withstand high levels of strain. The increase in Young's modulus at 28D seemed to correlate with collagen synthesis and collagen fiber organization in this period. In a future study, it may be interesting to see if these changes in biomechanical properties persist several months after the skeletal muscle injury, and whether these changes can be linked to future susceptibility to tendon injury.

Another novelty of our study was that 28 days post GA injury showed decreased adipose cells in tendon when compared with the control group. Previous data have already shown that high amounts of adipose cells may indicate tendon degeneration and deleterious effects of aging (Benjamin et al., 2004). For example, two previous studies conducted by our research group demonstrated that aging in rats is linked to high levels of fatty acid-binding protein 4 (a protein linked to adipose cells) and increased adipose cells in CT (Barin et al., 2017; Marqueti et al., 2018). These factors may compromise tendon structure leading to weakness (Marqueti et al., 2018). The finding of decreased adipose cells 28 days post injury could thus be a positive sign indicating ongoing recovery from the imbalances suffered by the GA injury. Additionally, decreased adipose cells in 28D may have contributed to lower overall thickness of the peritendinous sheath (Figure 3).

Some limitations of the present study should be highlighted, such as the inability to identify the cell types contributing to mRNA levels since gene expression analysis was conducted on the whole tendon. Moreover, the lack of immunoblot assay of essential proteins and immunofluorescence would be relevant to clarify adjacent mechanisms involved in tendon

remodeling. We further note that due to the practical necessity of testing all samples in a single day at each time point, there is a risk for batch effects from day-to-day in biomechanical data. To address this, we performed tests as consistently as possible by a single operator and present data from all samples along with the means (Figure 5). While we have no evidence that a batch effect of relevant size occurred, we state this limitation here and look forward to the results of future similar studies. We next intend to evaluate gene expression, morphology, and biomechanical properties of muscle over time following tendon injury in a similar model to the present study.

CONCLUSION

In summary, our data demonstrate plasticity of the calcaneus tendon in response to cryolesion of the gastrocnemius muscle in rats. The results suggest that such an adverse muscle condition initiates a complex period of remodeling spanning at least 28 days. At 3 days following injury, we observed dysregulation of signaling pathways associated with collagen I and disrupted mechanical properties; at 14 days, there was reduced collagen content but increased invasion of blood vessels into the tendon proper and peritendinous sheath cells; and by 28 days, there was a dramatic rise in Young's modulus and gene expression of transcription factors related to ECM synthesis, remodeling, and repair. This study highlights the importance of muscle-tendon interactions and provides insight into their underlying mechanisms. Our results suggest that tendon may be susceptible to tendinopathies following skeletal muscle injury; future human studies may be warranted to investigate this potential association.

REFERENCES

- Andarawis-Puri, N., Flatow, E.L., and Soslowky, L.J. (2015). Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *J Orthop Res* 33(6), 780-784. doi: 10.1002/jor.22869.
- Arnoczky, S.P., Lavagnino, M., and Egerbacher, M. (2007). The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? *Int J Exp Pathol* 88(4), 217-226. doi: 10.1111/j.1365-2613.2007.00548.x.
- Barin, F.R., Durigan, J.L.Q., Oliveira, K.S., Migliolo, L., Almeida, J.A., Carvalho, M., et al. (2017). Beneficial effects of resistance training on the protein profile of the calcaneal tendon during aging. *Exp Gerontol* 100, 54-62. doi:10.1016/j.exger.2017.10.019.
- Benjamin, M., Kaiser, E., and Milz, S. (2008). Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat* 212(3), 211-228. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00864.x
- Benjamin, M., Redman, S., Milz, S., Buttner, A., Amin, A., Moriggl, B., et al. (2004). Adipose tissue at entheses: the rheumatological implications of its distribution. A potential site of pain and stress dissipation? *Ann Rheum Dis* 63(12), 1549-1555. doi: 10.1136/ard.2003.019182.
- Berthet, E., Chen, C., Butcher, K., Schneider, R.A., Alliston, T., and Amirtharajah, M. (2013). Smad3 binds Scleraxis and Mohawk and regulates tendon matrix organization. *J Orthop Res* 31(9), 1475-1483. doi: 10.1002/jor.22382.
- Bittencourt, N.F.N., Meeuwisse, W.H., Mendonça, L.D., Nettel-Aguirre, A., Ocarino, J.M., and Fonseca, S.T. (2016). Complex systems approach for sports injuries: moving from risk factor identification to injury pattern recognition—narrative review and new concept. doi: 10.1136/bjsports-2015-095850.
- Bohm, S., Mersmann, F., and Arampatzis, A. (2015). "Human tendon adaptation in response to mechanical loading: a systematic review and meta-analysis of exercise intervention studies on healthy adults," in *Sports Med Open*.
- Chen, Y.Y., Qi & Xu, Cang-Bao. (2018). A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 10(10). doi: <http://dx.doi.org/>.
- Chiquet, M., Renedo, A.S., Huber, F., and Fluck, M. (2003). How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* 22(1), 73-80.

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1), 156-159. doi: 10.1006/abio.1987.9999.
- Connizzo, B.K., and Grodzinsky, A.J. (2018). Release of pro-inflammatory cytokines from muscle and bone causes tenocyte death in a novel rotator cuff in vitro explant culture model. *Connect Tissue Res*, 1-14. doi: 10.1080/03008207.2018.1439486.
- Cook, J.L., and Purdam, C.R. (2009). Is tendon pathology a continuum? A pathology model to explain the clinical presentation of load-induced tendinopathy. *Br J Sports Med* 43(6), 409-416. doi: 10.1136/bjsm.2008.051193.
- Covizi, D.Z., Felisbino, S.L., Gomes, L., Pimentel, E.R., and Carvalho, H.F. (2001). Regional adaptations in three rat tendons. *Tissue Cell* 33(5), 483-490. doi: 10.1054/tice.2001.0202.
- de Cassia Marqueti, R., Almeida, J.A., Nakagaki, W.R., Guzzoni, V., Boghi, F., Renner, A., et al. (2017). Resistance training minimizes the biomechanical effects of aging in three different rat tendons. *J Biomech* 53, 29-35. doi: 10.1016/j.jbiomech.2016.12.029.
- Dean, B.J., Snelling, S.J., Dakin, S.G., Javaid, M.K., and Carr, A.J. (2015). In vitro effects of glutamate and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonism on human tendon derived cells. *J Orthop Res* 33(10), 1515-1522. doi: 10.1002/jor.22923.
- Docheva, D., Hunziker, E.B., Fassler, R., and Brandau, O. (2005). Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Mol Cell Biol* 25(2), 699-705. doi: 10.1128/mcb.25.2.699-705.2005.
- Duncan, M.R., Frazier, K.S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X., et al. (1999). Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *Faseb j* 13(13), 1774-1786.
- Durigan, J.L., Peviani, S.M., Russo, T.L., Delfino, G.B., Ribeiro, J.U., Cominetti, M.R., et al. (2008). Effects of alternagin-C from *Bothrops alternatus* on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. *Toxicon* 52(6), 687-694. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.07.018.
- Egger, A.C., and Berkowitz, M.J. (2017). "Achilles tendon injuries," in *Curr Rev Musculoskelet Med.*, 72-80.
- Fouda, M.B., Thankam, F.G., Dilisio, M.F., and Agrawal, D.K. (2017). Alterations in tendon microenvironment in response to mechanical load: potential molecular targets for treatment strategies. *Am J Transl Res* 9(10), 4341-4360.
- Freedman, B.R., Bade, N.D., Riggin, C.N., Zhang, S., Haines, P.G., Ong, K.L., et al. (2015). The (dys)functional extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 1853(11 Pt B), 3153-3164. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.04.015.

- Galloway, M.T., Lalley, A.L., and Shearn, J.T. (2013). The role of mechanical loading in tendon development, maintenance, injury, and repair. *J Bone Joint Surg Am* 95(17), 1620-1628. doi: 10.2106/JBJS.L.01004.
- Goodier, H.C.J., Carr, A.J., Snelling, S.J.B., Roche, L., Wheway, K., Watkins, B., et al. (2016). "Comparison of transforming growth factor beta expression in healthy and diseased human tendon," in *Arthritis Res Ther.*
- Gumucio, J.P., Sugg, K.B., and Mendias, C.L. (2015). TGF- β superfamily signaling in muscle and tendon adaptation to resistance exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 43(2), 93-99. doi: 10.1249/jes.0000000000000041.
- Heinemeier, K.M., Olesen, J.L., Haddad, F., Langberg, H., Kjaer, M., Baldwin, K.M., et al. (2007a). Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *J Physiol* 582(Pt 3), 1303-1316. doi: 10.1113/jphysiol.2007.127639.
- Heinemeier, K.M., Olesen, J.L., Schjerling, P., Haddad, F., Langberg, H., Baldwin, K.M., et al. (2007b). Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol (1985)* 102(2), 573-581. doi: 10.1152/japplphysiol.00866.2006.
- Hernandez-Morera, P., Castano-Gonzalez, I., Travieso-Gonzalez, C.M., Mompeo-Corredera, B., and Ortega-Santana, F. (2016). Quantification and Statistical Analysis Methods for Vessel Wall Components from Stained Images with Masson's Trichrome. *PLoS One* 11(1), e0146954. doi: 10.1371/journal.pone.0146954
- Jarvinen, T.A., Jarvinen, T.L., Kaariainen, M., Kalimo, H., and Jarvinen, M. (2005a). Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 33(5), 745-764. doi: 10.1177/0363546505274714.
- Jarvinen, T.A., Kannus, P., Maffulli, N., and Khan, K.M. (2005b). Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin* 10(2), 255-266. doi: 10.1016/j.fcl.2005.01.013.
- Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84(2), 649-698. doi: 10.1152/physrev.00031.2003.
- Konow, N., Azizi, E., and Roberts, T.J. (2012). "Muscle power attenuation by tendon during energy dissipation," in *Proc Biol Sci.*, 1108-1113.
- Lavagnino, M., Wall, M.E., Little, D., Banes, A.J., Guilak, F., and Arnoczky, S.P. (2015). Tendon mechanobiology: Current knowledge and future research opportunities. *J Orthop Res* 33(6), 813-822. doi: 10.1002/jor.22871.

- Liu, H., Zhang, C., Zhu, S., Lu, P., Zhu, T., Gong, X., et al. (2015a). Mohawk promotes the tenogenesis of mesenchymal stem cells through activation of the TGFbeta signaling pathway. *Stem Cells* 33(2), 443-455. doi: 10.1002/stem.1866.
- Liu, J., Tao, X., Chen, L., Han, W., Zhou, Y., and Tang, K. (2015b). CTGF positively regulates BMP12 induced tenogenic differentiation of tendon stem cells and signaling. *Cell Physiol Biochem* 35(5), 1831-1845. doi: 10.1159/000373994.
- Magnusson, S.P., Langberg, H., and Kjaer, M. (2010). "The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to loading," in *Nat Rev Rheumatol*. (United States), 262-268.
- Marqueti, R.C., Durigan, J.L.Q., Oliveira, A.J.S., Mekaro, M.S., Guzzoni, V., Aro, A.A., et al. (2018). Effects of aging and resistance training in rat tendon remodeling. *FASEB J* 32(1), 353-368. doi: 10.1096/fj.201700543R
- Mendias, C.L., Gumucio, J.P., Bakhurin, K.I., Lynch, E.B., and Brooks, S.V. (2012). Physiological loading of tendons induces scleraxis expression in epitenon fibroblasts. *J Orthop Res* 30(4), 606-612. doi: 10.1002/jor.21550.
- Minkwitz, S., Schmock, A., Kurtoglu, A., Tsitsilonis, S., Manegold, S., Wildemann, B., et al. (2017). Time-Dependent Alterations of MMPs, TIMPs and Tendon Structure in Human Achilles Tendons after Acute Rupture. *Int J Mol Sci* 18(10). doi: 10.3390/ijms18102199
- Murchison, N.D., Price, B.A., Conner, D.A., Keene, D.R., Olson, E.N., Tabin, C.J., et al. (2007). Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development* 134(14), 2697-2708. doi: 10.1242/dev.001933.
- Nakagaki, W.R., Biancalana, A., Benevides, G.P., and Gomes, L. (2007). Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. *Connect Tissue Res* 48(5), 219-228. doi: 10.1080/03008200701492136.
- Nakama, L.H., King, K.B., Abrahamsson, S., and Rempel, D.M. (2006). VEGF, VEGFR-1, and CTGF cell densities in tendon are increased with cyclical loading: An in vivo tendinopathy model. *J Orthop Res* 24(3), 393-400. doi: 10.1002/jor.20053.
- Peng, W.C., Chang, Y.P., Chao, Y.H., Fu, S.N., Rolf, C., Shih, T.T., et al. (2017). Morphomechanical alterations in the medial gastrocnemius muscle in patients with a repaired Achilles tendon: Associations with outcome measures. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 43, 50-57. doi: 10.1016/j.clinbiomech.2017.02.002.

- Probst, A., Palmes, D., Freise, H., Langer, M., Joist, A., and Spiegel, H.U. (2000). A new clamping technique for biomechanical testing of tendons in small animals. *aprobst@uni-muenster.de. J Invest Surg* 13(6), 313-318.
- Roberts, T.J., and Azizi, E. (2010). "The series-elastic shock absorber: tendons attenuate muscle power during eccentric actions," in *J Appl Physiol (1985.)*, 396-404.
- Robinson, K.A., Sun, M., Barnum, C.E., Weiss, S.N., Huegel, J., Shetye, S.S., et al. (2017). Decorin and biglycan are necessary for maintaining collagen fibril structure, fiber realignment, and mechanical properties of mature tendons. *Matrix Biol* 64, 81-93. doi: 10.1016/j.matbio.2017.08.004.
- Samiric, T., Ilic, M.Z., and Handley, C.J. (2004). Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. *Matrix Biol* 23(2), 127-140. doi: 10.1016/j.matbio.2004.03.004.
- Schild, C., and Trueb, B. (2002). Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. *Exp Cell Res* 274(1), 83-91. doi: 10.1006/excr.2001.5458.
- Schweitzer, R., Zelzer, E., and Volk, T. (2010). Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development* 137(17), 2807-2817. doi: 10.1242/dev.047498
- Shukunami, C., Oshima, Y., and Hiraki, Y. (2005). Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 333(2), 299-307. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.133.
- Shukunami, C., Yoshimoto, Y., Takimoto, A., Yamashita, H., and Hiraki, Y. (2016). Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that integrate musculoskeletal components. *Jpn Dent Sci Rev* 52(4), 84-92. doi: 10.1016/j.jdsr.2016.04.003.
- Subramanian, A., and Schilling, T.F. (2015). Tendon development and musculoskeletal assembly: emerging roles for the extracellular matrix. *Development* 142(24), 4191-4204. doi: 10.1242/dev.114777
- Tang, Q.M., Chen, J.L., Shen, W.L., Yin, Z., Liu, H.H., Fang, Z., et al. (2014). Fetal and adult fibroblasts display intrinsic differences in tendon tissue engineering and regeneration. *Sci Rep* 4, 5515. doi: 10.1038/srep05515
- Thankam, F.G., Dilisio, M.F., and Agrawal, D.K. (2016). Immunobiological factors aggravating the fatty infiltration on tendons and muscles in rotator cuff lesions. *Mol Cell Biochem* 417(1-2), 17-33. doi: 10.1007/s11010-016-2710-5

- Tidball, J.G. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* 1(4), 2029-2062. doi: 10.1002/cphy.c100092.
- Tohyama, H., and Yasuda, K. (2000). The effects of stress enhancement on the extracellular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J Biomech* 33(5), 559-565. doi: S0021-9290(99)00217-1 [pii].
- Vieira Ramos, G., Pinheiro, C.M., Messa, S.P., Delfino, G.B., Marqueti Rde, C., Salvini Tde, F., et al. (2016). "Cryotherapy Reduces Inflammatory Response Without Altering Muscle Regeneration Process and Extracellular Matrix Remodeling of Rat Muscle," in *Sci Rep.*
- Wang, J.H., Guo, Q., and Li, B. (2012). Tendon biomechanics and mechanobiology--a minireview of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther* 25(2), 133-140; quiz 141. doi: 10.1016/j.jht.2011.07.004.
- Weibel, E.R. (1979). Practical Methods for Biological Morphometry. London, *Academic Press*, (1), 62.
- Wilson, A., and Lichtwark, G. (2011). "The anatomical arrangement of muscle and tendon enhances limb versatility and locomotor performance," in *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 1540-1553.
- Woo, S.L., Takakura, Y., Liang, R., Jia, F., and Moon, D.K. (2006). Treatment with bioscaffold enhances the the fibril morphology and the collagen composition of healing medial collateral ligament in rabbits. *Tissue Eng* 12(1), 159-166. doi: 10.1089/ten.2006.12.159.
- Wu, Y.F., Wang, H.K., Chang, H.W., Sun, J., Sun, J.S., and Chao, Y.H. (2017). High glucose alters tendon homeostasis through downregulation of the AMPK/Egr1 pathway. *Sci Rep* 7, 44199. doi: 10.1038/srep44199

FIGURES:

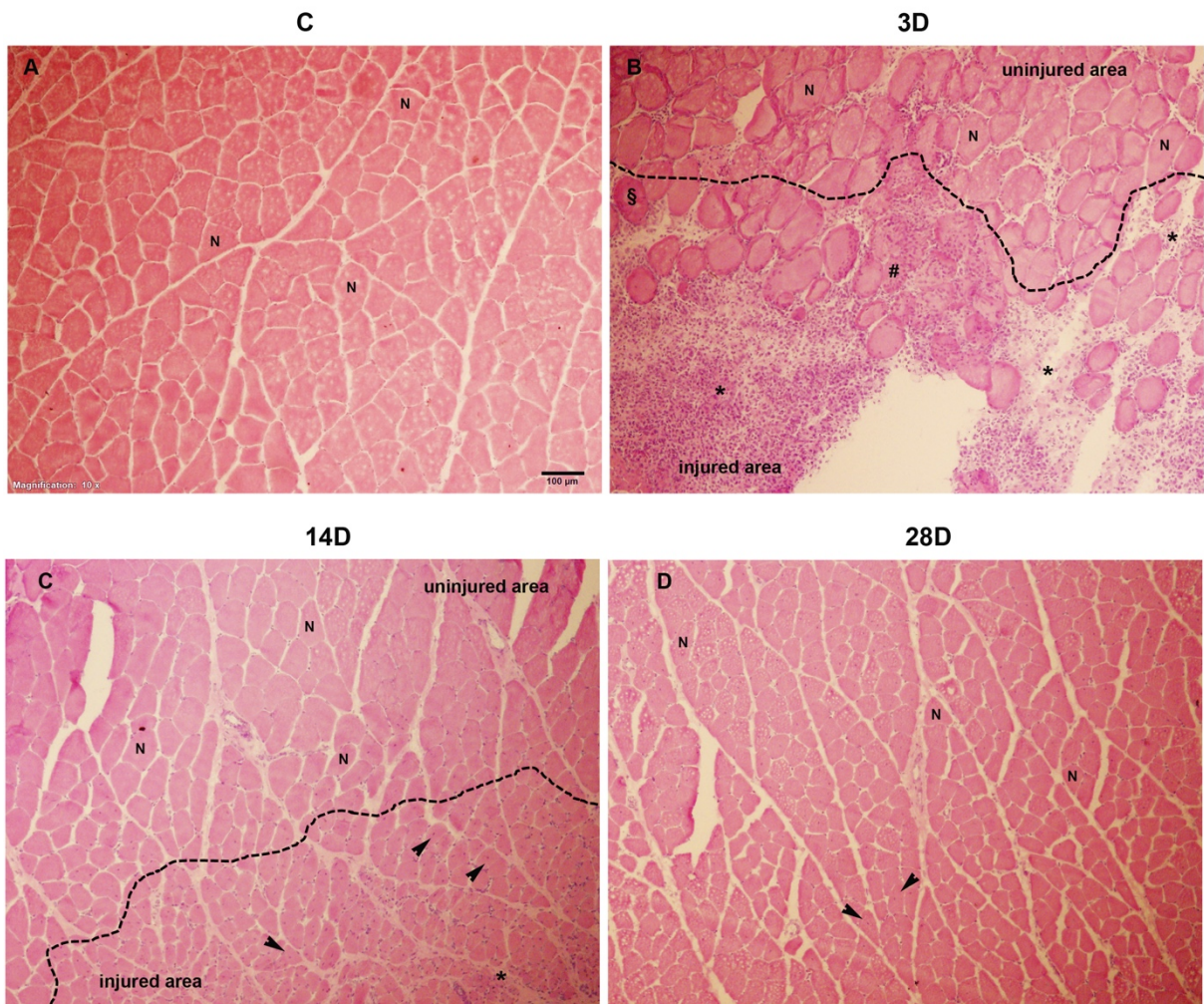


Figure 1. Histological evaluation of the muscle healing process of gastrocnemius muscle in four groups post-operation hematoxylin-eosin (HE) staining: A, control(C); B, 3 days post gastrocnemius muscle injury (3D); C, 14 days post gastrocnemius muscle injury (14D); D, 28 days post gastrocnemius muscle injury (28D). Inflammatory infiltrate (*), necrotic fiber (#), centralized nucleus (black arrow) and fibers with normal appearance (N). Magnification: 400x. The bar represents 40 µm.

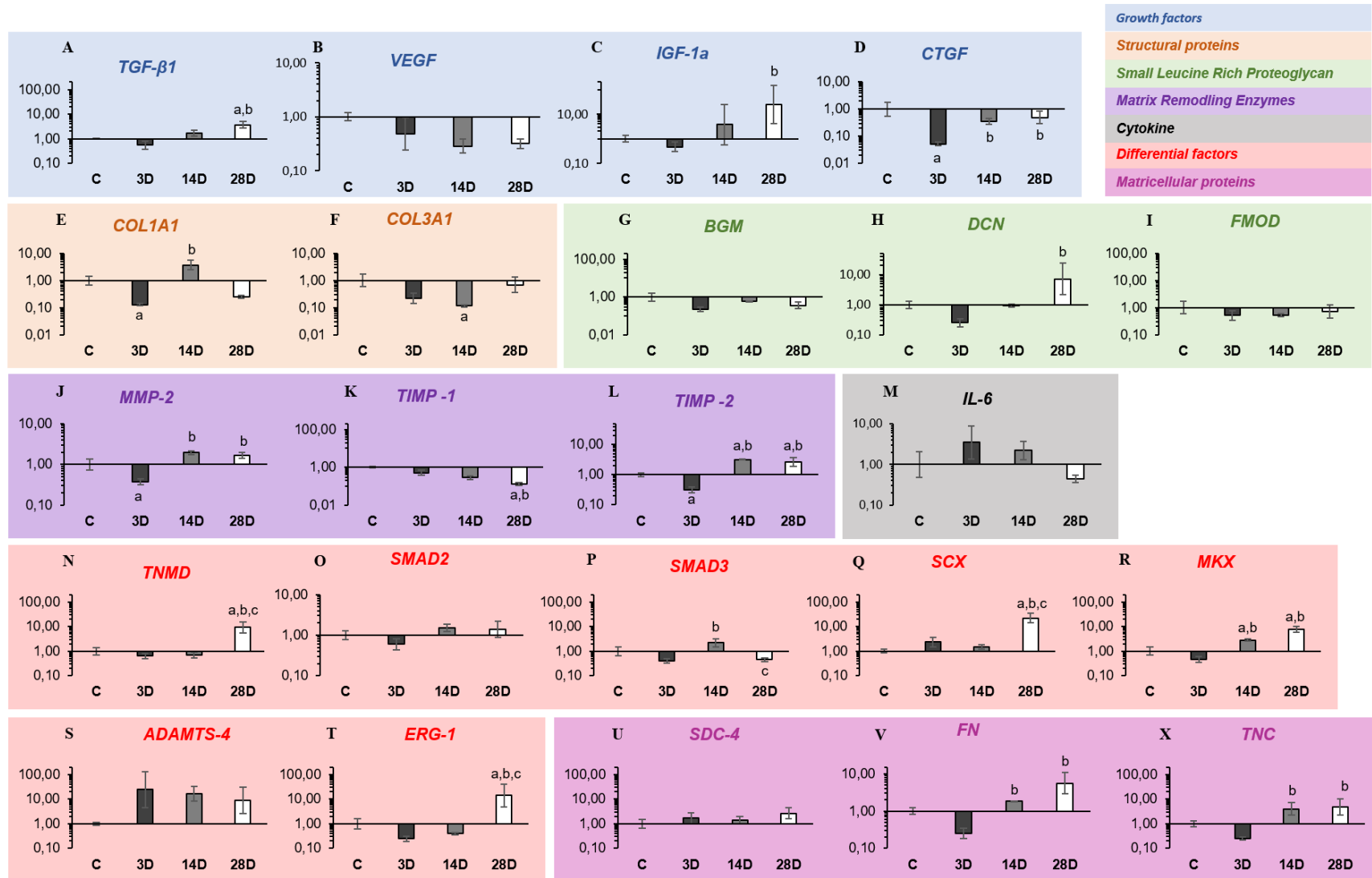


Figure. 2. Changes in gene expression following gastrocnemius muscle injury in calcaneal tendon. Growth factors (blue): Transforming growth factor beta 1 (*TGF-β1*), Vascular endothelial growth factor (*VEGF*), Pro-insulin like growth factor IA (*IGF-Ia*) and Connective tissue growth factor (*CTGF*). Structural proteins (light orange): Collagen, type I, alpha 1 (*COL1A1*) and Collagen, type III, alpha 1 (*COL3A1*). Small Leucine Rich Proteoglycan (green): Biglycan (*BGN*), Decorin (*DCN*) and Fibromodulin (*FMOD*). Matrix Remodiling Enzymes (purple): Matrix Metalloproteinase-2 (*MMP-2*), Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (*TIMP-1*) and Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 (*TIMP-2*). Cytokine (grey): Interleukin-6 (*IL-6*). Diferential Factors (beige): Tenomodulin (*Tnmd*), Smad2 (*SMAD2*), Smad3 (*SMAD3*), Scleraxis (*SCX*), Mohawk (*MKX*), ADAMTS-4 and *ERG-1*. Matricellular proteins (pink): *Syndecan4* (*SDC-4*), Fibronectin (*FN*) and Tenascin C (*TNC*). The experimental groups: control (C), 3 days post gastrocnemius muscle injury (3D), 14 days post gastrocnemius muscle injury (14D), 28 days post gastrocnemius muscle injury (28D). **a** = significantly different from C; **b** = significantly different from 3D; **c** = significantly different from 14D $p < 0.05$. (n = 6 per group).

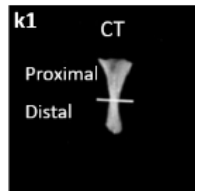
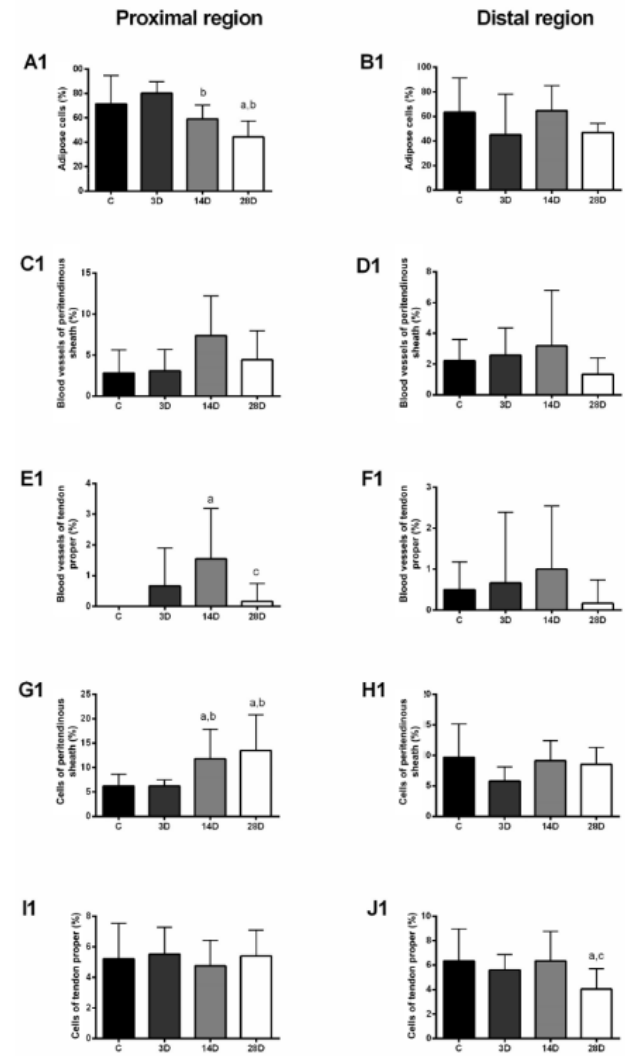
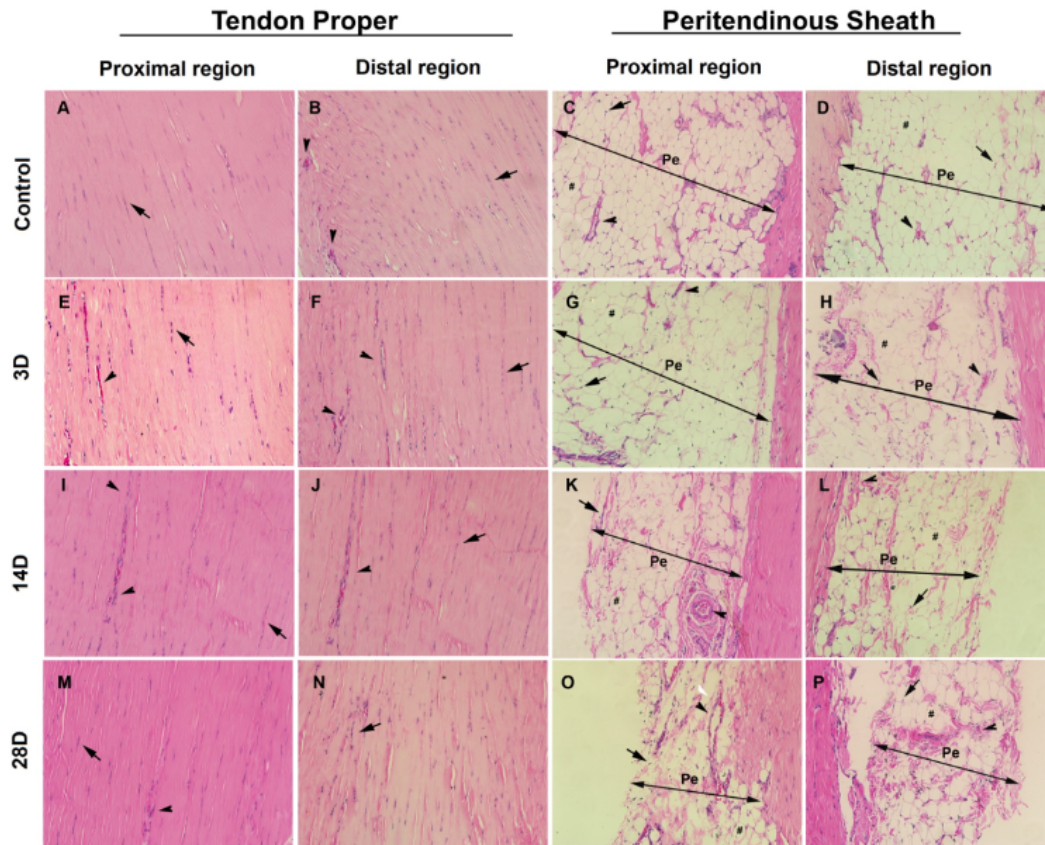


Figure. 3. Changes in morphological properties following gastrocnemius muscle injury in calcaneal tendon. A1-J1 express Vv% variation of structural elements found in the proximal and distal regions of the CT in each experimental group. A–P evidenced longitudinal sections (5µm) of the proximal and distal regions of CT (tendon proper and peritendinous sheath (Pe) stained with hematoxylin-eosin. Control group (C): tendon proper of the proximal region (A) and distal region (B) indicating cells (compact arrow) and vessels (arrowhead). Pe of proximal region (C) and distal (D) indicating cells (compact arrow), adipose cells (asterisk) and vessels (arrowhead); 3 days post gastrocnemius muscle injury (3D): tendon proper of the proximal region (E) and distal region (F) indicating cells (compact arrow) and vessels (arrowhead). Pe of the proximal (G) and distal (H) regions indicating cells (compact arrow), adipose (asterisks) and vessels (arrowhead); 14 days post gastrocnemius muscle injury (14D): tendon proper of the proximal region (I) and distal region (J) indicating cells (compact arrow) and vessels (arrowhead). Pe of the proximal (K) and distal (L) regions indicating cells (compact arrow), adipose (asterisks) and vessels (arrowhead); 28 days post gastrocnemius muscle injury (28D): tendon proper of the proximal region (M) and distal region (N) indicating cells (compact arrow) and vessels (arrowhead). Pe of the proximal (O) and distal (P) regions indicating cells (compact arrow), adipose (asterisks) and vessels (arrowhead). K1: Shows the dissected CT (Adapted from Covizi et al. 2001) and indicates the position corresponding to proximal and distal regions. The data are mean \pm SD. **a** = significantly different from C; **b** = significantly different from 3D; **c** = significantly different from 14D; $p < 0.05$ Magnification: 400x. The bar represents 40 µm. (n = 4 per group).

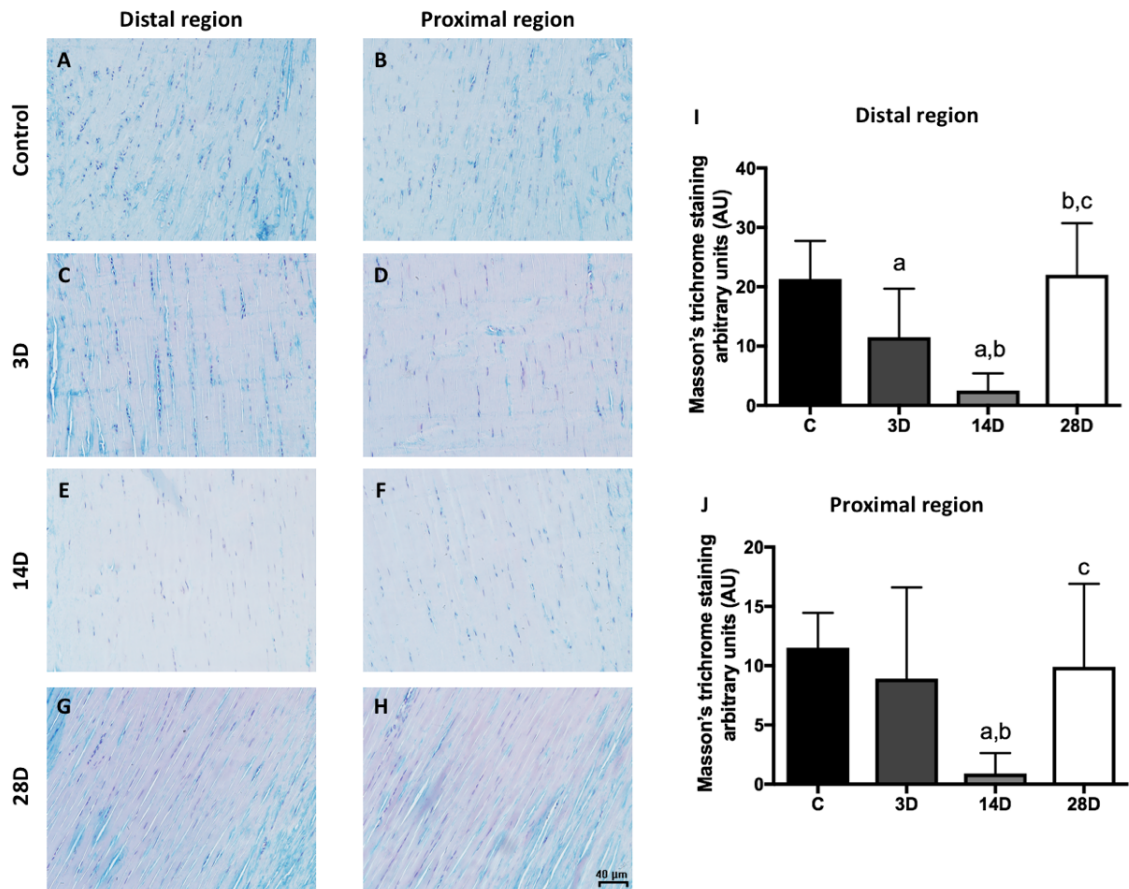


Figure 4. Masson's Trichrome staining of the proximal and distal regions of the CT for collagen detection after gastrocnemius muscle injury. A–H evidenced longitudinal sections (5 μ m) of the proximal and distal regions of CT (tendon proper). The data are mean \pm SD. The experimental groups (n=5): control (C), 3 days post gastrocnemius muscle injury (3D), 14 days post gastrocnemius muscle injury (14D), 28 days post gastrocnemius muscle injury (28D). **a** = significantly different from C; **b** = significantly different from 3D; **c** = significantly different from 14D; $p < 0.05$. Magnification; 400x. The bar represents 40 μ m. (n = 4 per group).

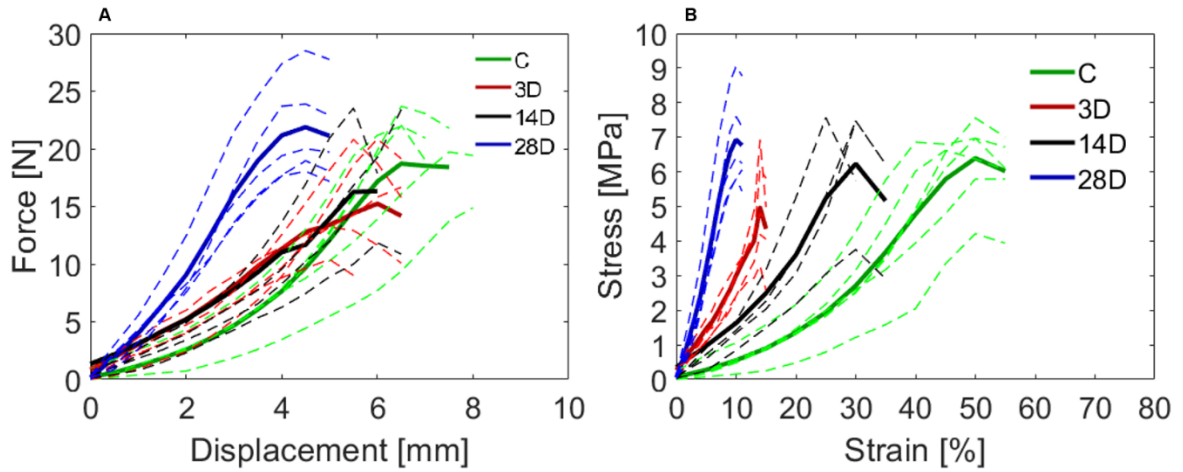


Figure 5. A. Calcaneal tendon force–displacement curves obtained after gastrocnemius muscle injury. The experimental groups: control (C), 3 days (3D), 14 days (14D) and 28 days post gastrocnemius muscle injury (28D). B. Calcaneal tendon stress–strain curves obtained after gastrocnemius muscle injury. Dotted lines indicate all the tested samples into each group and the thick line indicate the mean of the group. ($n = 7$ per group).

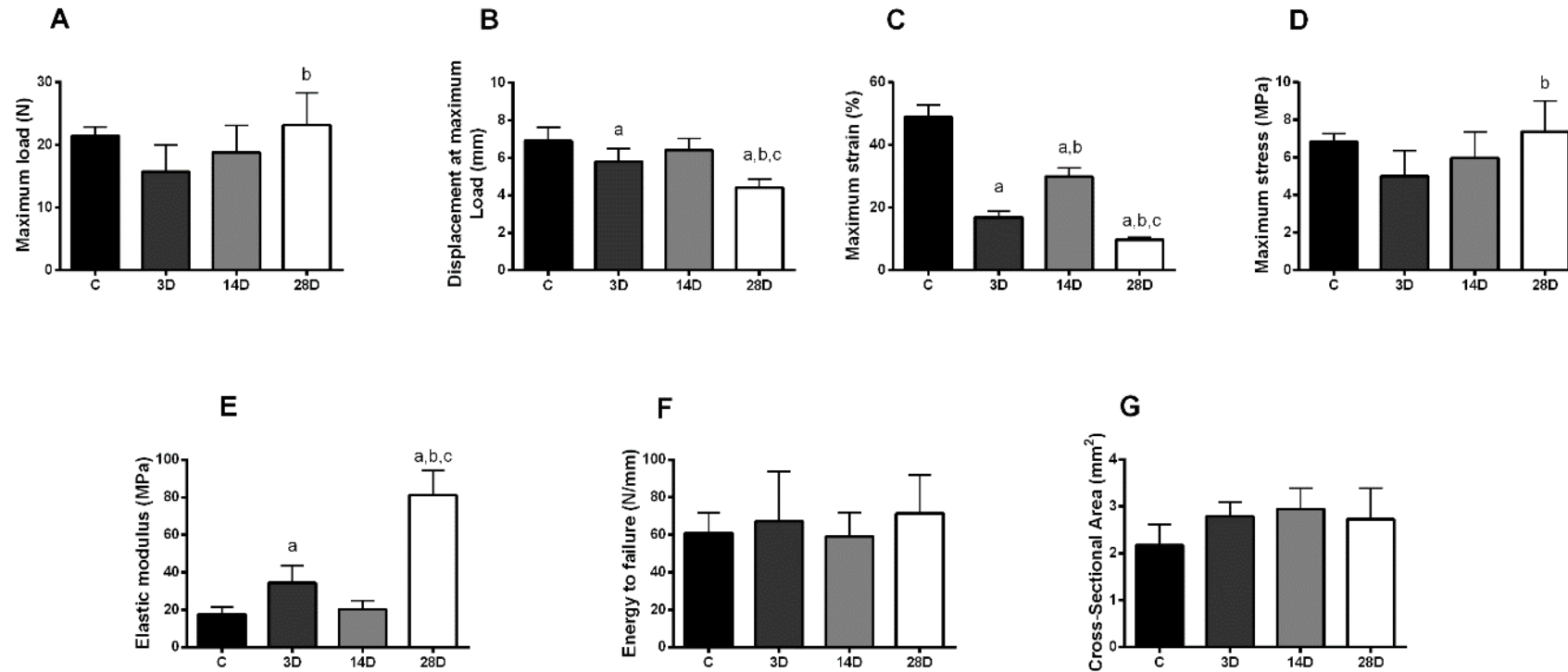
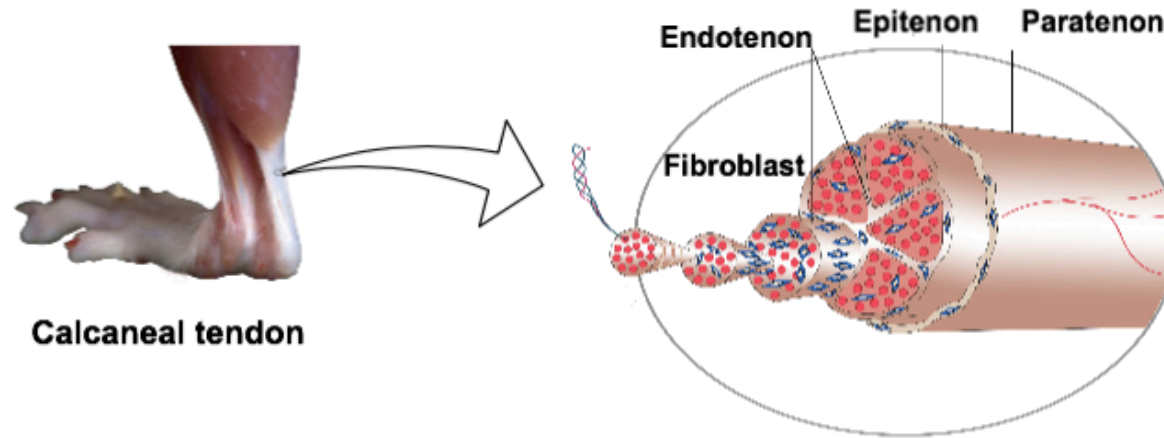


Figure 6. Biomechanical properties of the calcaneal tendon after gastrocnemius muscle injury. Maximum load (A), Displacement at maximum load (B), maximum stress (C), maximum strain (D), elastic modulus (E), energy to failure (F) and cross-sectional area (G) presented. The data are mean \pm SD. The experimental groups: control (C), 3 days (3D), 14 days (14D) and 28 days post gastrocnemius muscle injury (28D). a = significantly different from C; b = significantly different from 3D; c = significantly different from 14D, $p < 0.05$. (n = 7 per group).



Calcaneal tendon

Time-depedent tendon adapations

Muscle injured

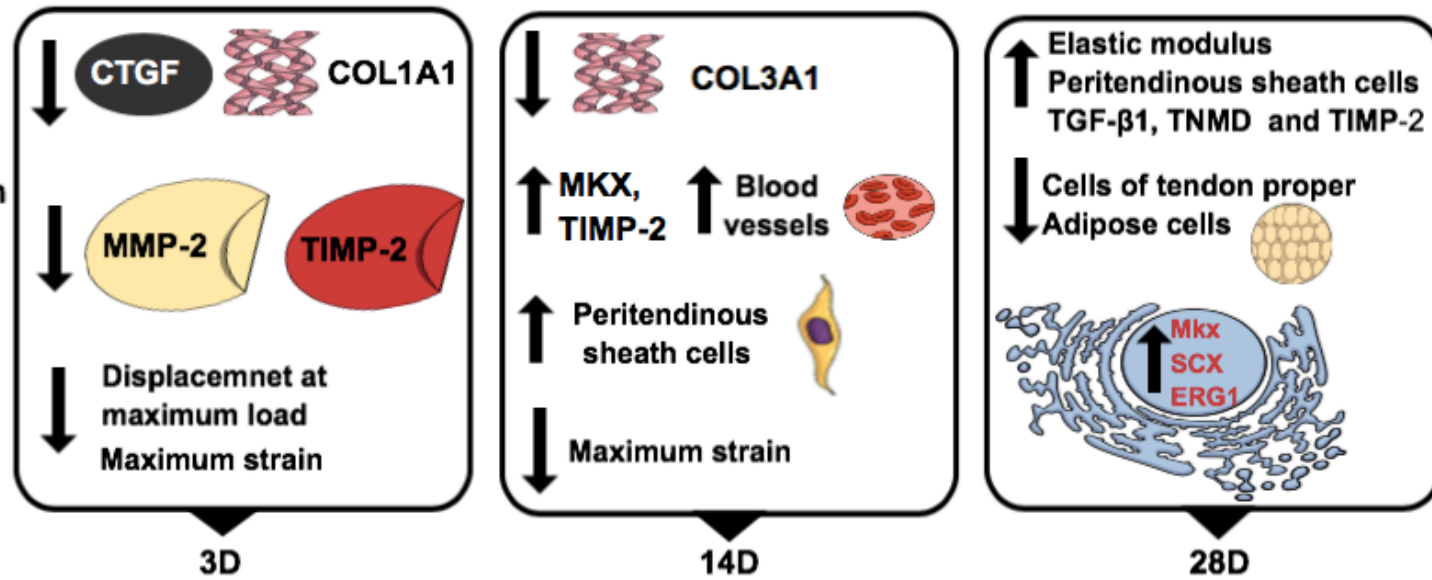
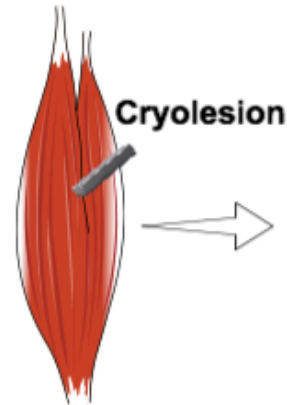


Figure 7. Calcaneal tendon plasticity in response to skeletal muscle injury. Main temporal analyses of the molecular, morphological and biomechanical properties of Calcaneal tendon in relation to the control group. The experimental groups: control (C), 3 days (3D), 14 days (14D) and 28 days (28D) post gastrocnemius muscle injury. Connective tissue growth factor (CTGF), Collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), Collagen, type III, alpha 1 (COL3A1), Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1), Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 (TIMP-2), Tenomodulin (TNMD), Mohawk (MKX), Scleraxis (SCX), ERG1. The tendon calcaneal figure was adapted from Guzonni et al. (24).

4. DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo, tivemos como objetivo central investigar os efeitos temporais da lesão musculoesquelética na expressão de genes chaves, relacionados ao remodelamento tendíneo, assim como às propriedades morfológicas e biomecânicas do TC.

Três dias após, a lesão muscular a nível de GA gerou uma diminuição na expressão dos genes CTGF, COL1A1, MMP-2 e TIMP-2. As propriedades biomecânicas também mostraram mudanças distintas ao longo do tempo, com diminuição da capacidade máxima de sustentação de carga e tensão.

Interessantemente, 14 dias após a lesão muscular, foi verificada uma diminuição do conteúdo de colágeno nas regiões distais e proximais do TC, mas com aumento de células da camada peritendínea, expressão gênica de COL1A1, TIMP-2 E MKX e diminuição de COL3A1, o que pode explicar a recuperação plena do conteúdo de colágeno 28 dias após a lesão, nos mesmos níveis do grupo controle.

Finalmente, 28 dias após a lesão, os genes TGF- β 1, *TNMD*, *TIMP-2*, *SCX*, *MKX*, *ERGI* apresentaram aumento da sua expressão gênica. Neste mesmo *time-point*, também observamos aumento das células da camada peritendínea, com progressão do módulo de elasticidade e diminuição de células adiposas, quando comparado ao grupo controle.

Esse estudo foi pioneiro em avaliar e demonstrar a plasticidade do TC em termos de adaptações a nível molecular, assim como propriedades morfológicas e biomecânicas em resposta a uma lesão musculoesquelética. Tais modificações podem ser explicadas, com base na literatura já existente, pela ausência/decréscimo do estímulo de carga oriundo da contração muscular (3, 5, 11), como também pela própria ação no tecido tendíneo de fatores inflamatórios presentes no músculo, a partir do processo lesivo (71), baseado na comunicação bidirecional e contínua existente entre os dois tecidos.

Como evidenciamos em capítulos anteriores, os tenócitos são mecanossensíveis, pois respondem a eventos de carga mecânica, como a tensão da contração muscular, modulando o ambiente extracelular através da formação e degradação de proteínas da matriz, por meio de um processo denominado mecanotransdução (5). Dessa forma, inúmeros estudos evidenciam que cargas fisiológicas (dentro dos limites de capacidade teciduais) são necessárias para a manutenção da homeostase do tendão, enquanto que cargas anormais, acima da capacidade tecidual ou pela completa falta desse estímulo, inibem a habilidade da população celular de

manter o equilíbrio, sendo fator chave no desenvolvimento de tendinopatias (25, 26, 28, 29, 35, 60, 93). Existe um modelo proposto na literatura que descreve o *continuum* da patologia tendínea e sua relação com a carga. Com base nesse modelo, os autores propõem que um tendão saudável, com níveis ideais de carga, adapte-se e se fortaleça. Por outro lado, um tendão, com uma demanda imposta de forma excessiva e sem descanso adequado ou com a retirada completa da imposição de carga de forma crônica, culmina em degeneração tecidual, podendo, inclusive, por meio da pobre gestão de carga, gerar a ruptura completa (40).

Trabalhos em modelos animais, focados na análise de variáveis morfológicas e mecânicas, fomentam essas afirmações ao evidenciarem que, em virtude da paralisação da atividade muscular, gerada a partir da aplicação de toxina botulínica no músculo ou com a simples imposição de gesso em torno de um dos membros inferiores do animal, produzem uma desorganização das fibras de colágeno, com alinhamento aleatório e um decréscimo em variáveis mecânicas e a perda do padrão de ondulações no tendão (*crimps*), extremamente importantes para a sua plena funcionalidade (94, 95).

Ademais, nessas importantes alterações ligadas principalmente à dependência de estímulos mecânicos das células tendíneas, resultados recentes apontam que as respostas musculares iniciais ao seu processo lesivo, com ênfase ao período inflamatório, podem ocasionar *déficits* morfocelulares também no tendão (71).

Nessa vertente, Connizzo and Grodzinsky (2018) apresentaram pela primeira vez a caracterização biológica de um modelo de cultura *in vitro* do manguito rotador de ratos, que incluía a cabeça umeral, o tendão supraespinhal e o músculo supraespinhal com a complexa estrutura hierárquica de colágeno, junção miotendinosa e entese (conexões nativas) intactas. Os autores evidenciaram que a grande concentração de citocinas pró-inflamatórias em nível muscular (TNF- α , IL-6 e IL-1) promoveram alterações histológicas no tendão, resultando em um padrão mais arredondado de tenócitos, juntamente com uma diminuição na densidade de células, características típicas de tendões em processo de tendinopatia. Além disso, a expressão de proteínas da matriz foi alterada, demonstrando uma regulação negativa de colágeno do tipo 1 e uma regulação positiva do colágeno do tipo 2 e agrecana, com possibilidade de uma renovação da matriz e, potencialmente, uma transição para um tecido mais semelhante à cartilagem. Estudos anteriores já haviam relacionado a regulação positiva de TNF- α , IL-6 e IL-1 à patologia do tendão (tendinopatias) (96-98).

As evidências, focadas no entendimento molecular e fisiológico das relações diretas entre o tecido muscular e tendíneo, devem ser utilizadas na prática clínica durante a montagem de raciocínios que incorporem não somente os trabalhos científicos voltados para técnicas de reabilitação e avaliação, assuntos por vezes mais valorados por profissionais comprometidos com o atendimento direto aos pacientes, mas também o entendimento de variáveis vinculadas à ciência básica, que proporcionam ao profissional maior qualidade e capacidade intelectual na elaboração da tomada de decisão em processos de reparo de lesões musculares e tendíneas.

Segundo as conclusões do presente estudo e a literatura atual sobre o tema, fica claro que o restabelecimento de processos mecanotransdutivos, dentro dos limites fisiológicos individuais, são essenciais para melhorar o resultado do reparo após tendinopatias e a prevenção da geração de processos lesivos (3). Ou seja, se o objetivo for atuar no tecido tendíneo, promovendo alterações na sua MEC, que culminarão no aumento de capacidade tecidual, a variável clínica a ser modulada é a carga. A terapia baseada em exercícios é o fator-chave no tratamento e o meio com maior aporte científico para reabilitação de tendinopatias. É necessário um aumento progressivo da força, resistência e padrões funcionais que incorporem a unidade musculotendínea afetada e toda a cadeia cinética, incluindo o membro não afetado (11, 99, 100).

Portanto, nossos resultados demonstram que a reabilitação de lesões musculares necessita de atenção também ao tecido tendíneo, uma vez que as alterações destacadas no presente estudo sugerem períodos mecanicamente instáveis do tendão durante o processo de reparo muscular. Ainda, é importante salientar que, após um processo inicial de lesão tendínea, o tendão aparentemente "curado" (sem sinais clínicos de tendinopatia, como a dor durante a atividade física) permanece biológica, estrutural e mecanicamente inferior ao tecido nativo e pode exibir fenótipos não semelhantes ao tendão, incluir formação óssea ou ossificação heterotópica, depósitos de cartilagem e um aspecto celular diferente do natural (células mais arredondadas), alterando sua resposta mecanossensitiva natural (37, 40). Tais adaptações podem também estar presentes em tendões após lesão muscular, uma vez que, nas fases iniciais do processo de regeneração muscular, os tendões apresentam aspectos morfológicos e mecânicos semelhantes aos observados em tendinopatias.

No presente trabalho, procuramos esclarecer diversas dúvidas, ainda não elucidadas pela literatura, no que tange aos aspectos moleculares, morfológicos e biomecânicos do tendão frente à lesão muscular. De forma complementar, outras abordagens científicas vêm demonstrando

que a integridade do tendão também tem sua importância para a manutenção e integridade da massa muscular (101-104).

Sabemos que a lesão de tendão provoca alterações biomecânicas com consequente limitação funcional que prejudica o restabelecimento da função. Estudos mostram que rupturas tendíneas são responsáveis por adaptações deletérias na massa muscular, que podem impactar diretamente na sua funcionalidade (101, 104). Nesse sentido, foi evidenciado aumento de tecido conjuntivo intramuscular, redução do número de capilares no músculo, atrofia muscular bem como acúmulo de gordura intramuscular após tenotomia (101-103). Essas adaptações, no interior do músculo, podem causar perda de elasticidade bem como diminuição da circulação (101, 102). Assim, o grau dessas adaptações musculares pode aumentar de acordo com a gravidade da lesão no tendão bem como com o tempo decorrido de ruptura. Além disso, esses sinais parecem ser um fator limitante para o remodelamento tendíneo, uma vez que o acúmulo de gordura intramuscular e perda de massa muscular têm grande impacto na função muscular devido à diminuição da força de contração e, conseqüentemente, podem prejudicar a transmissão de carga mecânica para o tendão (101, 102).

No entanto, ainda há uma escassez de evidências no que diz respeito às adaptações moleculares e morfofuncionais que podem ocorrer no músculo em decorrência de uma lesão no tendão. Dessa forma, uma segunda parte do referido projeto está sendo executada para verificação das respostas musculares frente aos efeitos deletérios de uma lesão direta no tendão, o que permitirá obtenção de respostas complementares a este estudo, para suportarmos a hipótese de que alterações na integridade músculo-tendão podem interferir na mecanotransdução entre ambos os tecidos, que são fundamentais para a manutenção e/ou otimização de suas funções biológicas.

5. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos dados demonstram plasticidade do tendão calcâneo em resposta à lesão do músculo gastrocnêmio em ratos. Os resultados sugerem que essa condição muscular adversa inicia um período complexo de remodelamento tendíneo que dura pelo menos 28 dias. Aos 3 dias após a lesão, observamos desregulação das vias de sinalização associadas ao colágeno I e perturbações nas propriedades mecânicas; aos 14 dias, houve redução do conteúdo de colágeno, mas aumento da invasão dos vasos sanguíneos nas células da bainha adequada e peritendinosa do tendão; e, em 28 dias, houve um aumento dramático no módulo de Young e na expressão gênica dos fatores de transcrição relacionados à síntese, remodelação e reparo da MEC. Neste estudo, destacamos, portanto, a importância das interações músculo-tendão e fornecemos informações sobre seus mecanismos subjacentes. Nossos resultados sugerem que o tendão pode ser suscetível a tendinopatias após lesão muscular esquelética; estudos humanos futuros poderão ser necessários para investigar essa potencial associação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *Journal of biomechanics*. 2006;39(9):1563-82.
2. Reeves ND. Adaptation of the tendon to mechanical usage. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2006;6(2):174-80.
3. Wang JH, Guo Q, Li B. Tendon biomechanics and mechanobiology--a minireview of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther*. 2012;25(2):133-40; quiz 41.
4. Roberts TJ, Azizi E. The series-elastic shock absorber: tendons attenuate muscle power during eccentric actions. *J Appl Physiol* (1985). 1092010. p. 396-404.
5. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological reviews*. 2004;84(2):649-98.
6. Magnusson SP, Langberg H, Kjaer M. The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to loading. *Nat Rev Rheumatol*. 6. United States2010. p. 262-8.
7. Galloway MT, Lalley AL, Shearn JT. The role of mechanical loading in tendon development, maintenance, injury, and repair. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2013;95(17):1620-8.
8. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2005;87(1):187-202.
9. O'Brien M. The anatomy of the Achilles tendon. *Foot and ankle clinics*. 2005;10(2):225-38.
10. Bosia F, Torino Ud, 0000-0002-2886-4519, Merlini M, Technology MIo, Pugno NM, et al. Fatigue of self-healing hierarchical soft nanomaterials: The case study of the tendon in sportsmen. *Journal of Materials Research*. 2017;30(1):2-9.

11. Lavagnino M, Wall ME, Little D, Banes AJ, Guilak F, Arnoczky SP. Tendon mechanobiology: Current knowledge and future research opportunities. *J Orthop Res.* 2015;33(6):813-22.
12. Birch HL. Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. *International journal of experimental pathology.* 2007;88(4):241-8.
13. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Annals of the rheumatic diseases.* 1994;53(6):359-66.
14. Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, Chakravarti S, et al. Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions.* 2005;5(1):5-21.
15. Benjamin M, Kaiser E, Milz S. Structure-function relationships in tendons: a review. *Journal of anatomy.* 2008;212(3):211-28.
16. Thankam FG, Dilisio MF, Gross RM, Agrawal DK. Collagen I: a kingpin for rotator cuff tendon pathology. *Am J Transl Res.* 2018;10(11):3291-309.
17. Pajala A, Melkko J, Leppilahti J, Ohtonen P, Soini Y, Risteli J. Tenascin-C and type I and III collagen expression in total Achilles tendon rupture. An immunohistochemical study. *Histol Histopathol.* 2009;24(10):1207-11.
18. Millar NL, Murrell GA, McInnes IB. Inflammatory mechanisms in tendinopathy - towards translation. *Nature reviews Rheumatology.* 2017;13(2):110-22.
19. Scott A, Huisman E, Khan K. Conservative treatment of chronic Achilles tendinopathy. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne.* 2011;183(10):1159-65.

20. Subramanian A, Schilling TF. Tendon development and musculoskeletal assembly: emerging roles for the extracellular matrix. *Development*. 2015;142(24):4191-204.
21. Murchison ND, Price BA, Conner DA, Keene DR, Olson EN, Tabin CJ, et al. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. 2007.
22. Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, et al. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(23):10538-42.
23. Franchi M, Trire A, Quaranta M, Orsini E, Ottani V. Collagen structure of tendon relates to function. *TheScientificWorldJournal*. 2007;7:404-20.
24. Bittencourt NFN, Meeuwisse WH, Mendonca LD, Nettel-Aguirre A, Ocarino JM, Fonseca ST. Complex systems approach for sports injuries: moving from risk factor identification to injury pattern recognition-narrative review and new concept. *Br J Sports Med*. 2016;50(21):1309-14.
25. Heinemeier KM, Kjaer M. In vivo investigation of tendon responses to mechanical loading. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2011;11(2):115-23.
26. Beckham C, Dimond R, Greenlee TK, Jr. The role of movement in the development of a digital flexor tendon. *The American journal of anatomy*. 1977;150(3):443-59.
27. Miller BF, Olesen JL, Hansen M, Dossing S, Cramer RM, Welling RJ, et al. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *The Journal of physiology*. 2005;567(Pt 3):1021-33.
28. Coupe C, Kongsgaard M, Aagaard P, Hansen P, Bojsen-Moller J, Kjaer M, et al. Habitual loading results in tendon hypertrophy and increased stiffness of the human patellar tendon. *Journal of applied physiology*. 2008;105(3):805-10.

29. Kongsgaard M, Aagaard P, Kjaer M, Magnusson SP. Structural Achilles tendon properties in athletes subjected to different exercise modes and in Achilles tendon rupture patients. *Journal of applied physiology*. 2005;99(5):1965-71.
30. Reeves ND, Maganaris CN, Narici MV. Effect of strength training on human patella tendon mechanical properties of older individuals. *The Journal of physiology*. 2003;548(Pt 3):971-81.
31. Kongsgaard M, Reitelseder S, Pedersen TG, Holm L, Aagaard P, Kjaer M, et al. Region specific patellar tendon hypertrophy in humans following resistance training. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;191(2):111-21.
32. Bohm S, Mersmann F, Marzilger R, Schroll A, Arampatzis A. Asymmetry of Achilles tendon mechanical and morphological properties between both legs. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25(1):e124-32.
33. Zhang J, Wang JH. The effects of mechanical loading on tendons--an in vivo and in vitro model study. *PLoS One*. 2013;8(8):e71740.
34. Heinemeier K, Langberg H, Olesen JL, Kjaer M. Role of TGF-beta1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue. *Journal of applied physiology*. 2003;95(6):2390-7.
35. Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Langberg H, Kjaer M, Baldwin KM, et al. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. *The Journal of physiology*. 2007;582(Pt 3):1303-16.
36. Nielsen RH, Clausen NM, Schjerling P, Larsen JO, Martinussen T, List EO, et al. Chronic alterations in growth hormone/insulin-like growth factor-I signaling lead to changes in mouse tendon structure. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2014;34:96-104.

37. Andarawis-Puri N, Flatow EL, Soslowky LJ. Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *J Orthop Res.* 2015;33(6):780-4.
38. Berthet E, Chen C, Butcher K, Schneider RA, Alliston T, Amirtharajah M. Smad3 binds Scleraxis and Mohawk and regulates tendon matrix organization. *J Orthop Res.* 2013;31(9):1475-83.
39. Malliaras P, Cook J, Purdam C, Rio E. Patellar Tendinopathy: Clinical Diagnosis, Load Management, and Advice for Challenging Case Presentations. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy.* 2015;45(11):887-98.
40. Cook JL, Purdam CR. Is tendon pathology a continuum? A pathology model to explain the clinical presentation of load-induced tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2009;43(6):409-16.
41. Bittencourt NFN, Meeuwisse WH, Mendonça LD, Nettel-Aguirre A, Ocarino JM, Fonseca ST. Complex systems approach for sports injuries: moving from risk factor identification to injury pattern recognition—narrative review and new concept. 2016.
42. Zhang J, Wang JH. Mechanobiological response of tendon stem cells: implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy. *J Orthop Res.* 2010;28(5):639-43.
43. Arnoczky SP, Lavagnino M, Egerbacher M. The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? *International journal of experimental pathology.* 2007;88(4):217-26.
44. Vasta S, Di Martino A, Zampogna B, Torre G, Papalia R, Denaro V. Role of VEGF, Nitric Oxide, and Sympathetic Neurotransmitters in the Pathogenesis of Tendinopathy: A Review of the Current Evidences. *Frontiers in aging neuroscience.* 2016;8:186.
45. J P, U F, K Q, J OL, P S, K H, et al. Local biochemical and morphological differences in human Achilles tendinopathy: a case control study. *BMC musculoskeletal disorders.* 2012;13:53.

46. Rees JD, Stride M, Scott A. Tendons--time to revisit inflammation. *British journal of sports medicine*. 2014;48(21):1553-7.
47. Spang C, Harandi VM, Alfredson H, Forsgren S. Marked innervation but also signs of nerve degeneration in between the Achilles and plantaris tendons and presence of innervation within the plantaris tendon in midportion Achilles tendinopathy. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2015;15(2):197-206.
48. Walden G, Liao X, Donell S, Raxworthy MJ, Riley GP, Saeed A. A Clinical, Biological, and Biomaterials Perspective into Tendon Injuries and Regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2017;23(1):44-58.
49. Morita W, Snelling SJ, Dakin SG, Carr AJ. Profibrotic mediators in tendon disease: a systematic review. *Arthritis research & therapy*. 2016;18(1):269.
50. Cook JL, Rio E, Purdam CR, Docking SI. Revisiting the continuum model of tendon pathology: what is its merit in clinical practice and research? *British journal of sports medicine*. 2016;50(19):1187-91.
51. Bahr R, Holme I. Risk factors for sports injuries — a methodological approach. 2003.
52. Magnan B, Bondi M, Pierantoni S, Samaila E. The pathogenesis of Achilles tendinopathy: a systematic review. *Foot and ankle surgery : official journal of the European Society of Foot and Ankle Surgeons*. 2014;20(3):154-9.
53. Silbernagel KG, Delaware Uo, k.silbernagel@uscience.edu. Nonsurgical Treatment of Achilles Tendinopathy. 2017:1-16.
54. Marqueti RC, Paulino MG, Fernandes MN, de Oliveira EM, Selistre-de-Araujo HS. Tendon structural adaptations to load exercise are inhibited by anabolic androgenic steroids. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2014;24(1):e39-51.

55. Sode J, Obel N, Hallas J, Lassen A. Use of fluroquinolone and risk of Achilles tendon rupture: a population-based cohort study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63(5):499-503.
56. Yu T-Y, Pang J-HS, Wu KP-H, Chen MJ-L, Chen C-H, Tsai W-C. Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in tenocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2013;14(1):2.
57. September AV, Posthumus M, Collins M. Application of genomics in the prevention, treatment and management of Achilles tendinopathy and anterior cruciate ligament ruptures. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2012;6(3):216-23.
58. Birch HL, Peffers MJ, Clegg PD. Influence of Ageing on Tendon Homeostasis. *Adv Exp Med Biol.* 2016;920:247-60.
59. Onambele GN, Burgess K, Pearson SJ. Gender-specific in vivo measurement of the structural and mechanical properties of the human patellar tendon. *J Orthop Res.* 2007;25(12):1635-42.
60. Miller BF, Hansen M, Olesen JL, Schwarz P, Babraj JA, Smith K, et al. Tendon collagen synthesis at rest and after exercise in women. *J Appl Physiol (1985).* 2007;102(2):541-6.
61. Abate M. How obesity modifies tendons (implications for athletic activities). *Muscles Ligaments Tendons J.* 42014. p. 298-302.
62. Cilli F, Khan M, Fu F, Wang JH. Prostaglandin E2 affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. *Clin J Sport Med.* 2004;14(4):232-6.
63. Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):235.

64. Backman LJ, Danielson P. Low range of ankle dorsiflexion predisposes for patellar tendinopathy in junior elite basketball players: a 1-year prospective study. *Am J Sports Med.* 2011;39(12):2626-33.
65. Mendonca LD, Verhagen E, Bittencourt NF, Goncalves GG, Ocarino JM, Fonseca ST. Factors associated with the presence of patellar tendon abnormalities in male athletes. *J Sci Med Sport.* 2016;19(5):389-94.
66. Pekala PA, Henry BM, Ochala A, Kopacz P, Taton G, Mlyniec A, et al. The twisted structure of the Achilles tendon unraveled: A detailed quantitative and qualitative anatomical investigation. *Scand J Med Sci Sports.* 2017.
67. Del Buono A, Chan O, Maffulli N. Achilles tendon: functional anatomy and novel emerging models of imaging classification. *Int Orthop.* 2013;37(4):715-21.
68. Mahieu NN, Witvrouw E, Stevens V, Van Tiggelen D, Roget P. Intrinsic risk factors for the development of achilles tendon overuse injury: a prospective study. *Am J Sports Med.* 2006;34(2):226-35.
69. Jarvinen M, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Kvist M, Leadbetter W. Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7(2):86-95.
70. Schweitzer R, Zelzer E, Volk T. Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development.* 2010;137(17):2807-17.
71. Connizzo BK, Grodzinsky AJ. Release of pro-inflammatory cytokines from muscle and bone causes tenocyte death in a novel rotator cuff in vitro explant culture model. *Connect Tissue Res.* 2018:1-14.
72. Freedman BR, Gordon JA, Soslowsky LJ. The Achilles tendon: fundamental properties and mechanisms governing healing. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(2):245-55.

73. Egger AC, Berkowitz MJ. Achilles tendon injuries. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 102017. p. 72-80.
74. Trofa DP, Miller JC, Jang ES, Woode DR, Greisberg JK, Vosseller JT. Professional Athletes' Return to Play and Performance After Operative Repair of an Achilles Tendon Rupture. <http://dxdoiorg/101177/0363546517713001>. 2017.
75. Edama M, Kubo M, Onishi H, Takabayashi T, Inai T, Yokoyama E, et al. The twisted structure of the human Achilles tendon. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25(5):e497-503.
76. van der Linden PD, Sturkenboom MC, Herings RM, Leufkens HM, Rowlands S, Stricker BH. Increased risk of achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *Arch Intern Med*. 2003;163(15):1801-7.
77. Chen TM, Rozen WM, Pan WR, Ashton MW, Richardson MD, Taylor GI. The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications. *Clin Anat*. 2009;22(3):377-85.
78. Wren TAL, wren@stanford.edu, Veterans Affairs Health Care System RRDC, 3801 Miranda Avenue, Palo Alto, CA, USA, Biomechanical Engineering Division MED, Stanford University, Stanford, CA, USA, Yerby SA, Veterans Affairs Health Care System RRDC, 3801 Miranda Avenue, Palo Alto, CA, USA, et al. Mechanical properties of the human achilles tendon. *Clinical Biomechanics*. 2001;16(3):245-51.
79. Maganaris CN, Narici MV, Maffulli N. Biomechanics of the Achilles tendon. *Disabil Rehabil*. 2008;30(20-22):1542-7.
80. Alt W, Reule C, Hochwald H. Achilles tendon overuse injuries: risk factors and biomechanics. 2011.

81. Fung DT, Wang VM, Andarawis-Puri N, Basta-Pljakic J, Li Y, Laudier DM, et al. Early response to tendon fatigue damage accumulation in a novel in vivo model. *J Biomech.* 2010;43(2):274-9.
82. Fung DT, Wang VM, Laudier DM, Shine JH, Basta-Pljakic J, Jepsen KJ, et al. Subrupture Tendon Fatigue Damage. *J Orthop Res.* 2009;27(2):264-73.
83. Shepherd JH, Screen HRC. Fatigue loading of tendon. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(4):260-70.
84. Freedman BR, Sarver JJ, Buckley MR, Voleti PB, Soslowky LJ. Biomechanical and structural response of healing Achilles tendon to fatigue loading following acute injury. *J Biomech.* 2014;47(9):2028-34.
85. Marqueti RC, Prestes J, Wang CC, Ramos OH, Perez SE, Nakagaki WR, et al. Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. *Scand J Med Sci Sports.* 2011;21(6):e91-9.
86. Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop.* 2016;3(1):15.
87. Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musaro A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):35-42.
88. Rahusen FT, Weinhold PS, Almekinders LC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. *The American journal of sports medicine.* 2004;32(8):1856-9.
89. Prisk V, Huard J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. *Histol Histopathol.* 2003;18(4):1243-56.

90. Lazzaretti TF, Pedrinelli, André., Hernandez, A. J. . Muscle Injury – Physiopathology, diagnosis, treatment and clinical presentation. *Rev Bras Ortop.* 2011;46(3):247-55.
91. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *The Journal of clinical investigation.* 2010;120(1):11-9.
92. Dideriksen K. Muscle and tendon connective tissue adaptation to unloading, exercise and NSAID. *Connective tissue research.* 2014;55(2):61-70.
93. Wang W, Tang X, Zhang J, Yan X, Ma Y. Complete stress shielding of the Achilles tendon: ultrastructure and level of interleukin-1 and TGF-beta. *Orthopedics.* 2010;33(11):810.
94. Ikoma K, Kido M, Nagae M, Ikeda T, Shirai T, Ueshima K, et al. Effects of stress-shielding on the dynamic viscoelasticity and ordering of the collagen fibers in rabbit Achilles tendon. *J Orthop Res.* 2013;31(11):1708-12.
95. Eliasson P, Fahlgren A, Pasternak B, Aspenberg P. Unloaded rat Achilles tendons continue to grow, but lose viscoelasticity. *J Appl Physiol (1985).* 2007;103(2):459-63.
96. Legerlotz K, Jones ER, Screen HR, Riley GP. Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(7):1161-5.
97. Thorpe CT, Chaudhry S, Lei, II, Varone A, Riley GP, Birch HL, et al. Tendon overload results in alterations in cell shape and increased markers of inflammation and matrix degradation. *Scand J Med Sci Sports.* 2015;25(4):e381-91.
98. Qi J, Fox AM, Alexopoulos LG, Chi L, Bynum D, Guilak F, et al. IL-1beta decreases the elastic modulus of human tenocytes. *J Appl Physiol (1985).* 2006;101(1):189-95.

99. Dos Santos Franco YR, Miyamoto GC, Franco KFM, de Oliveira RR, Cabral CMN. Exercise therapy in the treatment of tendinopathies of the lower limbs: a protocol of a systematic review. *Syst Rev*. 2019;8(1):142.
100. Martin RL, Chimenti R, Cuddeford T, Houck J, Matheson JW, McDonough CM, et al. Achilles Pain, Stiffness, and Muscle Power Deficits: Midportion Achilles Tendinopathy Revision 2018. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2018;48(5):A1-a38.
101. Jozsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1990;72(2):293-7.
102. Gerber C, Schneeberger AG, Hoppeler H, Meyer DC. Correlation of atrophy and fatty infiltration on strength and integrity of rotator cuff repairs: a study in thirteen patients. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons [et al]*. 2007;16(6):691-6.
103. Uthoff HK, Coletta E, Trudel G. Effect of timing of surgical SSP tendon repair on muscle alterations. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2014;32(11):1430-5.
104. Peng WC, Chang YP, Chao YH, Fu SN, Rolf C, Shih TT, et al. Morphomechanical alterations in the medial gastrocnemius muscle in patients with a repaired Achilles tendon: Associations with outcome measures. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2017;43:50-7.

7. ANEXOS

Anexo I – Documento de aprovação do projeto por Comitê de Ética em Pesquisa



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Lesões músculo-tendíneas e sua relação com a regeneração tecidual e remodelamento da matriz extracelular”, protocolo nº **028/15** sob a responsabilidade de Rita de Cássia Marqueti Durigan - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UCB) DA Universidade Católica de Brasília, em reunião de 18 / 11 / 2015.

Vigência do projeto	30 de julho de 2019.
Espécie / linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de Animais	140
Peso / Idade	200g / 2 Meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Processos Básicos (UCB)

Brasília, 18 de Novembro de 2015.

Secretaria da Comissão de Ética
Em Uso de Animais (CEUA/UCB)
Universidade Católica de Brasília
(61) 3356-9492

Tania Mariana B. Kiyama

Anexo II – Normas de publicação do periódico ao qual o artigo foi submetido e publicado

Frontiers in Physiology

Impact Factor: 3.201

Qualis: A1

2. Manuscript Guidelines

2.3. Manuscript Requirements and Style Guide

2.3.1.1. Article Type

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript, and to comply with the article-type descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page. Please note that not all articles types are available for all journals/specialties. Please contact us if you have any questions. Please pay close attention to the word count limits.

Focused Reviews, Frontiers Commentaries and Grand Challenge articles are invited by the chief editor and cannot be part of any Frontiers Research Topic. Unless you were contacted by the chief editor or the editorial office regarding the submission of a paper selected for tier 2 promotion, do not submit a Focused Review or a Frontiers Commentary - instead, submit a Review or a General Commentary.

Please see Additional Requirements for specific article types including Focused Reviews, General Commentaries, Protocols and Data Reports.

2.3.1.2. Manuscript Length

Frontiers encourages its authors to closely follow the article word count lengths given in the Summary Table. The manuscript length includes only the main body of the text, footnotes and all citations within it, and excludes abstract, section titles, figure and table captions, funding statements, acknowledgments and references in the bibliography. Please indicate the number of words and the number of figures included in your manuscript on the first page.

2.3.1.3. Language Editing

Frontiers requires manuscripts submitted to meet international standards for English language to be considered for publication.

For authors who would like their manuscript to receive language editing or proofing to improve the clarity of the manuscript and help highlight their research, Frontiers recommends the language-editing services provided by the following external partners:

Editage

Frontiers is pleased to recommend language-editing service provided by our external partner Editage to authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing. These services may be particularly useful for researchers for whom English is not the primary language. They can help to improve the grammar, syntax and flow of your manuscripts prior to submission. Frontiers authors will receive a 10% discount by visiting the following link: <http://editage.com/frontiers/>

The Charlesworth Group

Frontiers recommends the Charlesworth Group Author Services, who has a long standing track record in language editing and proofing. This is a third-party service for which Frontiers authors will receive a discount by visiting the following link: <http://www.charlesworthauthorservices.com/~Frontiers>.

Note that sending your manuscript for language editing does not imply or guarantee that it will be accepted for publication by a Frontiers journal. Editorial decisions on the scientific content of a manuscript are independent of whether it has received language editing or proofing by the partner services, or other services.

2.3.1.4. Language Style

The default language style at Frontiers is American English. If you prefer your article to be formatted in British English, please specify this on your manuscript first page. For any questions regarding style Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

2.3.1.5. Search Engine Optimization (SEO)

There are a few simple ways to maximize your article's discoverability. Follow the steps below to improve search results of your article:

Include a few of your article's keywords in the title of the article;

Do not use long article titles;

Pick 5 to 8 keywords using a mix of generic and more specific terms on the article subject(s);

Use the maximum amount of keywords in the first 2 sentences of the abstract;

Use some of the keywords in level 1 headings.

2.3.1.6. Title

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title.

Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative.

Authors should try to avoid, if possible:

Titles that are a mere question without giving the answer.

Unambitious titles, for example starting with "Towards", "A description of", "A characterization of", "Preliminary study on".

Vague titles, for example starting with "Role of...", "Link between...", "Effect of..." that do not specify the role, link, or effect.

Include terms that are out of place, for example the taxonomic affiliation apart from species name.

For Corrigenda, Book Reviews, General Commentaries and Editorials, the title of your manuscript should have the following format:

"Corrigendum: Title of original article"

"Book Review: Title of book"

General Commentaries

"Commentary: Title of original article" (This does not apply to Frontiers Commentaries)

"Response: Commentary: Title of original article"

"Editorial: Title of Research Topic"

For article types requiring it, the running title should be a maximum of 5 words in length. (see Summary Table)

2.3.1.7. Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

Example: Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA.

The Corresponding Author(s) should be marked with an asterisk. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section.

CORRESPONDENCE:

Dr. Max Maximus

maximus@gmail.com

If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

2.3.1.8. Consortium/Group and Collaborative Authors

Consortium/group authorship should be listed in the manuscript with the other author(s). In cases where authorship is retained by the consortium/group, the consortium/group should be listed as an author separated by “,” or “and”. Consortium/group members can be listed in a separate section at the end of the manuscript.

Example: John Smith, Barbara Smith and The Collaborative Working Group.

In cases where work is presented by the author(s) on behalf of a consortium/group, it should be included in the manuscript author list separated with the wording “for” or “on behalf of”. The consortium/group will not retain authorship.

Example: John Smith and Barbara Smith on behalf of The Collaborative Working Group.

2.3.1.9. Headings and Sub-headings

You may insert up to 5 heading levels into your manuscript (not more than for example: 3.2.2.1.2 Heading title).

2.3.1.10. Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. In the abstract, minimize the use of abbreviations and do not cite references. See Summary Table for abstract requirement and length according to article type.

For Clinical Trial article types, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

2.3.1.11. Keywords

All article types: you may provide up to 8 keywords; at least 5 are mandatory.

2.3.1.12. Text

The entire document should be single-spaced and must contain page and line numbers in order to facilitate the review process. Your manuscript should be written using either LaTeX or MS-Word.

Templates are available (see above)

2.3.1.13. Nomenclature

The use of abbreviations should be kept to a minimum. Non-standard abbreviations should be avoided unless they appear at least four times, and defined upon first use in the main text. Consider also giving a list of non-standard abbreviations at the end, immediately before the Acknowledgments.

Equations should be inserted in editable format from the equation editor.

Italicize Gene symbols and use the approved gene nomenclature where it is available. For human genes, please refer to the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). New gene symbols should be submitted here. Common Alternative gene aliases may also be reported, but should not be used alone in place of the HGNC symbol. Nomenclature committees for other species are listed here. Protein products are not italicized.

We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts.

Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by IUPAC.

Astronomical objects should be referred to using the nomenclature given by the International Astronomical Union provided here.

Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords. An LSID is represented as a uniform resource name (URN) with the following format:

urn:lsid:<Authority>:<Namespace>:<ObjectID>[:<Version>]

For more information on LSIDs please see Inclusion of Zoological Nomenclature section.

2.3.1.14. Sections

Your manuscript is organized by headings and subheadings. The section headings should be those appropriate for your field and the research itself. For Original Research Articles, it is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field:

INTRODUCTION

Succinct, with no subheadings.

MATERIALS AND METHODS

This section may be divided by subheadings. This section should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section (for further information, see section Materials and Data Policies)

RESULTS

This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and have to be transferred into the main text.

DISCUSSION

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential short-comings and limitations on their interpretations; discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future.

For further information, please see Additional Requirements for specific article types including Focused Reviews, General Commentaries, Case Reports and Data Reports amongst others or you can check the descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page.

2.3.1.15. Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors.

2.3.1.16. Author Contributions Statement

The Author Contributions Statement is mandatory and should represent all the authors. It can be up to several sentences long and should briefly describe the tasks of individual authors. Please list only 2 initials for each author, without full stops, but separated by commas (e.g. JC, JS). In the case of two authors with the same initials, please use their middle initial to differentiate between them (e.g. REW, RSW). The Author Contributions Statement should be included at the end of the manuscript before the References.

2.3.1.17. Conflict of Interest Statement

A Conflict of Interest Statement needs to be included at the end of the manuscript before the references. Here, the authors need to declare whether or not the submitted work was carried out in the presence of any personal, professional or financial relationships that could potentially be construed as a conflict of interest. For more information on conflicts of interest, see our Editorial Policies.

2.3.1.18. Contribution to the Field Statement

When you submit your manuscript, you will be required to briefly summarize in 200 words your manuscript's contribution to, and position in, the existing literature of your field. This should be written avoiding any technical language or non-standard acronyms. The aim should be to convey the meaning and importance of this research to a non-expert. While Frontiers evaluates articles using objective criteria, rather than impact or novelty, your statement should frame the question(s) you have addressed in your work in the context of the current body of knowledge, providing evidence that the findings - whether positive or negative - contribute to progress in your research discipline. This will assist the Chief Editors to determine whether your manuscript fits within the scope of a specialty as defined in its mission statement; a detailed statement will also facilitate the identification of the Editors and Reviewers most appropriate to evaluate your work, ultimately expediting your manuscript's initial consideration.

Example Statement on: Markram K and Markram H (2010) The Intense World Theory – a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front. Hum. Neurosci.* 4:224. doi: 10.3389/fnhum.2010.00224

Autism spectrum disorders are a group of neurodevelopmental disorders that affect up to 1 in 100 individuals. People with autism display an array of symptoms encompassing emotional processing, sociability, perception and memory, and present as uniquely as the individual. No theory has suggested a single underlying neuropathology to account for these diverse symptoms. The Intense World Theory, proposed here, describes a unifying pathology producing the wide spectrum of manifestations observed in autists. This theory focuses on the neocortex, fundamental for higher cognitive functions, and the limbic system, key for processing emotions and social signals. Drawing on discoveries in animal models and neuroimaging studies in individuals with autism, we propose how a combination of genetics, toxin exposure and/or environmental stress could produce hyper-reactivity and hyper-plasticity in the microcircuits involved with perception, attention, memory and emotionality. These hyper-functioning circuits will eventually come to dominate their neighbors, leading to hyper-sensitivity to incoming stimuli, over-specialization in tasks and a hyper-preference syndrome. We make the case that this theory of enhanced brain function in autism explains

many of the varied past results and resolves conflicting findings and views and makes some testable experimental predictions.

2.3.2. References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. The references should only include articles that are published or accepted. Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list, include the version and unique identifier when available. For accepted but unpublished works use "in press" instead of page numbers. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only, for the article types that allow such inclusions. Personal communications should be documented by a letter of permission. Website urls should be included as footnotes. Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source. Preprints can be cited as long as a DOI or archive URL is available, and the citation clearly mentions that the contribution is a preprint. If a peer-reviewed journal publication for the same preprint exists, the official journal publication is the preferred source.

The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

SCIENCE, ENGINEERING, and HUMANITIES: For articles submitted in the domains of SCIENCE, ENGINEERING and HUMANITIES please apply Author-Year system for in-text citations.

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available.

In-text citations should be called according to the surname of the first author, followed by the year. For works by 2 authors include both surnames, followed by the year. For works by more than 2 authors include only the surname of the first author, followed by et al., followed by the year. For Humanities and Social Sciences articles please include page numbers in the in-text citations.

ARTICLE IN A PRINT JOURNAL:

Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell.* 5, 163-172.

ARTICLE IN AN ONLINE JOURNAL:

Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

ARTICLE OR CHAPTER IN A BOOK:

Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

BOOK:

Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

ABSTRACT:

Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A world apart? Bridging the gap between theory and applied social gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

PATENT:

Marshall, S. P. (2000). Method and apparatus for eye tracking and monitoring pupil dilation to evaluate cognitive activity. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

DATA:

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of *Ulms minor*'s transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. *Dryad Digital Repository*. (2015)
<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

THESES AND DISSERTATIONS:

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

PREPRINT:

Smith, J. (2008). Title of the document. Preprint repository name [Preprint]. Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to the Chicago Manual of Style.

Frontiers Science Endnote Style

Frontiers Science, Engineering and Humanities Bibstyle

HEALTH, PHYSICS AND MATHEMATICS: For articles submitted in the domain of HEALTH or the journal Frontiers in Physics and Frontiers in Applied Mathematics and Statistics please apply the Vancouver system for in-text citations.

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available.

In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis for Health articles, and in square brackets for Physics and Mathematics articles.

Reference examples

ARTICLE IN A PRINT JOURNAL:

Sondheimer N, Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. Mol Cell (2000) 5:163-72.

ARTICLE IN AN ONLINE JOURNAL:

Tahimic CGT, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol* (2013) 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

ARTICLE OR CHAPTER IN A BOOK:

Sorenson PW, Caprio JC. "Chemoreception,". In: Evans DH, editor. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press (1998). p. 375-405.

BOOK:

Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press (1997). 345 p.

ABSTRACT:

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, editor. *Genetic Programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland*. Berlin: Springer (2002). p. 182–91.

PATENT:

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible Endoscopic Grasping and Cutting Device and Positioning Tool Assembly. United States patent US 20020103498 (2002).

DATA:

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of *Ulms minor*'s transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. *Dryad Digital Repository*. (2015)
<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

THESES AND DISSERTATIONS:

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

PREPRINT:

Smith, J. Title of the document. Preprint repository name [Preprint] (2008). Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to Citing Medicine.

Frontiers Health Endnote Style

Frontiers Health and Physics Bibstyle

2.3.3. Disclaimer

Any necessary disclaimers which must be included in the published article should be clearly indicated in the manuscript.

2.3.4. Supplementary Material

Frontiers journals do not support pushing important results and information into supplementary sections. However, data that are not of primary importance to the text, or which cannot be included in the article because it is too large or the current format does not permit it (such as movies, raw data traces, power point presentations, etc.) can be uploaded during the submission procedure and will be displayed along with the published article. All supplementary files are deposited to FigShare for permanent storage, during the publication stage of the article, and receive a DOI.

The Supplementary Material can be uploaded as Data Sheet (word, excel, csv, cdx, fasta, pdf or zip files), Presentation (power point, pdf or zip files), Supplementary Image (cdx, eps, jpeg, pdf, png or tif), Supplementary Table (word, excel, csv or pdf), Audio (mp3, wav or wma) or Video (avi, divx, flv, mov, mp4, mpeg, mpg or wmv).

Supplementary material is not typeset so please ensure that all information is clearly presented, the appropriate caption is included in the file and not in the manuscript, and that the style conforms to the rest of the article. To avoid discrepancies between the published article and the supplementary material, please do not add the title, author list, affiliations or correspondence in the supplementary files. For Supplementary Material templates (LaTeX and Word) see Supplementary Material for Frontiers.

Suggested Fonts

The title is written in title case, centred, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page.

Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold.

The text of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman.

The body text is in 12 point normal Times New Roman.