



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO

**Perfil proteômico do músculo gastrocnêmio e junção miotendínea após lesão do
tendão Calcâneo**

FILIPPE BALBINO DA COSTA LOHMANN

BRASÍLIA, DF
2024

FILIPE BALBINO DA COSTA LOHMANN

Perfil proteômico do músculo gastrocnêmio e junção miotendínea após lesão do tendão
Calcâneo

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação (PPG-CR) da Universidade de Brasília.

Linha de pesquisa: Aspectos biológicos, biomecânicos e funcionais associados à prevenção e reabilitação.

Tema: Remodelamento e arquitetura músculo tendínea.

Orientador: Prof^a. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan

Co-orientador: Prof. Dr. Ivo Vieira de Sousa Neto;

BRASÍLIA, DF

BB172pp Balbino da Costa Lohmann, Filipe
Perfil Proteômico do Músculo Gastrocnêmio e Junção
Miotendínea após Lesão de Tendão Calcâneo / Filipe Balbino
da Costa Lohmann; orientador Rita de Cássia Marqueti
Durigan; co-orientador Ivo Sousa Neto. -- Brasília, 2024.
61 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. Proteômica. 2. Lesão. 3. Tendão Calcâneo. 4. Matriz
Extra Celular . I. Marqueti Durigan, Rita de Cássia ,
orient. II. Sousa Neto, Ivo, co-orient. III. Título.

FILIPPE BALBINO DA COSTA LOHMANN

Perfil proteômico do músculo gastrocnêmio e junção miotendínea após lesão do tendão
Calcâneo

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Reabilitação (PPG-CR) da Universidade de
Brasília.

Brasília, _____ de _____ de 20 _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Rita de Cassia Marqueti Durigan (Universidade de Brasília – UnB)

Prof. Dr^a. Elaine Cristina Leite Pereira (Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Filipe Moura Ribeiro (Universidade Católica de Brasília – UCB)

RESUMO

Introdução: O sistema músculo esquelético conta com a interação entre diversas estruturas teciduais como músculos e ossos para transmitir eficientemente as forças e manter a estabilidade das articulações. A junção miotendínea (JMT) é um ponto crucial onde músculo e tendão se encontram para essa transmissão de força; porém é uma área vulnerável a lesões também. Lesões no tendão calcâneo podem afetar consideravelmente essas interações complexas e demandar processos de recuperação que envolvem inflamação celular e remodelação dos tecidos. Nesse sentido, o estudo dos padrões de proteínas em tecidos afetados como o músculo gastrocnêmio e a JMT proporcionam uma compreensão das mudanças moleculares durante o processo de recuperação. **Objetivos:** A proposta deste estudo foi investigar o perfil de proteínas no músculo gastrocnêmio e na JMT após uma lesão parcial no tendão calcâneo com o intuito de identificar as proteínas com diferentes expressões e os processos biológicos presentes nas etapas de recuperação. **Métodos:** Trinta ratos Wistar foram divididos em cinco grupos experimentais: grupo controle e quatro grupos submetidos à lesão parcial de tendão, com análise em diferentes tempos pós-lesão 3, 14, 28 e 55 dias. A lesão foi realizada, após coleta dos músculos gastrocnêmios e JMTs para a realização da análise proteômica. As proteínas extraídas dos músculos foram quantificadas e analisadas por espectrometria de massa LC-MS/MS e posterior análise bioinformática para identificação das proteínas reguladas e enriquecimento de vias biológicas. **Resultados:** Os resultados mostraram mudanças importantes no perfil proteômico ao longo do tempo. Três dias após a lesão, observou-se uma forte regulação de proteínas ligadas à inflamação e ao estresse oxidativo, como *Serpina 1 (alfa anti-tripsina)*, *C4b*, *Fga* e *Fgb*, *Aco2*, *Hspa4*, sinalizando uma resposta inicial de defesa. Aos 14 dias, o perfil passou para uma fase de adaptação, focada em metabolismo energético e reorganização estrutural. No período de 28 dias, destacaram-se proteínas associadas à regeneração e controle da inflamação. Finalmente, aos 55 dias, o perfil sugeriu um retorno à homeostase, indicando que o tecido entrava na fase avançada de recuperação. **Conclusão:** O estudo demonstrou a complexidade e a dinâmica temporal das alterações proteômicas no músculo gastrocnêmio e na junção miotendínea (JMT) após a lesão parcial do tendão calcâneo. Observou-se que, aos 3 dias pós-lesão, houve uma predominância de proteínas relacionadas à resposta inflamatória (como *Serpina1* e *Fga/Fgb*) e ao estresse oxidativo (como haptoglobina e peroxirredoxina 4), evidenciando uma resposta inicial de defesa tecidual. Aos 14 dias, proteínas como *Crat* e *Aco2* destacaram-se, indicando uma transição para um metabolismo energético mais eficiente e adaptação estrutural. No período de 28 dias, a presença de colágenos (*Colla1*, *Col3a1*) e superóxido dismutase refletiu uma fase de regeneração e controle da inflamação. Finalmente, aos 55 dias, o perfil proteômico indicou um retorno à homeostase com redução de proteínas relacionadas ao estresse celular (*HSPA4*) e aumento da estabilidade estrutural e metabólica.

Palavras Chaves: Proteômica, Lesão, Tendão Calcâneo, Matriz Extracelular.

ABSTRACT

Introduction: The musculoskeletal system relies on the interaction between various tissue structures, such as muscles and bones, to efficiently transmit forces and maintain joint stability. The myotendinous junction (MTJ) is a critical point where muscle and tendon meet for this force transmission; however, it is also a vulnerable area prone to injuries. Injuries to the calcaneal tendon can significantly disrupt these complex interactions, requiring recovery processes that involve cellular inflammation and tissue remodelling. In this context, studying protein patterns in affected tissues, such as the gastrocnemius muscle and the MTJ, provides insights into molecular changes during the recovery process. **Objectives:** The aim of this study was to investigate the protein profile in the gastrocnemius muscle and the MTJ after a partial lesion of the calcaneal tendon to identify proteins with differential expression and biological processes present during the recovery stages. **Methods:** Thirty Wistar rats were divided into five experimental groups: a control group and four groups subjected to partial tendon lesions, with analyses conducted at different post-injury times: 3, 14, 28, and 55 days. The lesion was performed, followed by the collection of gastrocnemius muscles and MTJs for proteomic analysis. Proteins extracted from the muscles were quantified and analysed using LC-MS/MS mass spectrometry and subsequent bioinformatic analysis to identify regulated proteins and enriched biological pathways. **Results:** The results revealed significant changes in the proteomic profile over time. Three days post-lesion, there was strong regulation of proteins related to inflammation and oxidative stress, indicating an initial defensive response. By 14 days, the profile shifted to an adaptive phase, focusing on energy metabolism and structural reorganisation. At 28 days, proteins associated with regeneration and inflammation control were prominent. Finally, at 55 days, the profile suggested a return to homeostasis, indicating that the tissue had entered the advanced recovery phase. **Conclusion:** This study revealed the complexity and temporal dynamics of molecular responses following a partial Achilles tendon lesion. The specific regulation of proteins associated with inflammatory response, energy metabolism, and cellular structure highlights the adaptive role of the gastrocnemius muscle and the MTJ. These findings provide a foundation for developing therapeutic interventions aimed at accelerating functional recovery and preventing future injuries in musculoskeletal structures.

Keywords: Proteomics, Injury, Achilles Tendon, Extracellular Matrix.

DEDICATÓRIA

À Deus, primeiramente, que tem me sustentado em todos os passos, decisões e ações que tenho tomado em minha vida e, mesmo face as intempéries que a vida nos reserva, Deus mostra-se presente em todos os Pontos. Aos nossos Guias e mentores espirituais, Irmã, Vó, Sr.Zé: agradeço por todos os conselhos, limpezas, cuidados, puxões de orelhas e o amor divinal envolvido no processo.

À minha amada família, que desde o início me deu o suporte necessário para que eu jamais desistisse no meio do caminho. A família é o alicerce mais sagrado que o Divino, em Sua infinita sabedoria, estabeleceu na face da Terra.

À minha mãe, Sionete Balbino, e ao meu pai, João Batista, meus maiores exemplos de amor e dedicação. Vocês, instrumentos divinos, me deram o maior presente de todos: a vida. Tudo o que sou e conquistei começou com o amor, o cuidado e a orientação que recebi de vocês.

Sou eternamente grato por cada gesto, cada palavra de encorajamento e cada sacrifício feito em meu benefício. Sem vocês, nada disso seria possível. Amo vocês mais do que as palavras podem expressar e levo comigo, em cada passo, o amor imenso que nos une.

Às minhas irmãs, Sheilla e Aline, que me acompanharam ao longo de todo o processo e me deram forças nos momentos mais difíceis. Às minhas sobrinhas, que me inspiraram a ser um exemplo digno de ser seguido, tornando essa caminhada ainda mais significativa e fortalecendo minha determinação.

Aos meus irmãos, Daniel e Erasto, que sempre estiveram presentes na minha história, mesmo à distância. Apesar de estarem em outro país, nunca me faltaram apoio e encorajamento, permitindo que eu mantivesse firme o meu propósito. A cada um de vocês, minha gratidão eterna e meu amor incondicional.

Ao meu querido amigo, exemplo de humanidade e dedicação, Dr. Carlos Nogueira Aucélio. Deus, em Sua infinita bondade, envia anjos à Terra para transformar vidas, e você é prova disso. Conheces toda a minha trajetória — meus acertos e erros, minhas vitórias e aprendizados — e esteve presente em cada etapa. Neste momento especial, não poderia deixar de expressar minha imensa gratidão por cada orientação, cada conselho sábio e por sempre fazer a diferença em minha vida. Mais do que amigo, você foi muitas vezes como um pai para mim, guiando-me com carinho, paciência e sabedoria.

À minha amiga e psicóloga, Ketty Ritter, que foi uma peça fundamental nesta caminhada. Você, que não me deixou desistir, me deu forças quando tudo parecia difícil e escutou cada desabafo com atenção e cuidado. Foi mais que psicóloga: foi amiga, orientadora

e, muitas vezes, uma mãe nesse processo. Sou eternamente grato por sua dedicação, sua generosidade e, sobretudo, pela sua existência, Ketty.

Concluir ciclos exige imensa perseverança, especialmente quando a vida nos desafia com momentos difíceis, mudanças significativas e acontecimentos transformadores. No entanto, ao longo dessa jornada, fui abençoado com a presença de uma pessoa incrível: você, Ana Rita.

Com seu amor, respeito e carinho, você se tornou uma parte essencial desta caminhada, oferecendo-me o apoio necessário para superar cada obstáculo e encerrar este capítulo com força e determinação. Meu amor, dedico este trabalho a você, que é meu porto seguro e minha maior inspiração. Você me impulsiona a ser a minha melhor versão todos os dias, amo-te por imenso, e sou eternamente grato por ter você ao meu lado nesta jornada, chamada vida!

Aos meus amigos, que me acompanharam de perto nesse processo, Fred, Rodrigo e Samantha Nardotto. Sozinho podemos chegar ao destino, mas com boas amizades podemos chegar muito mais longe. Por isso, muito mais que amigos, são meus irmãos, pois família nos dá a opção de escolher as melhores pessoas para estarem ao nosso lado. Obrigado por todos os conselhos, orientações, ensinamentos e por todas as risadas que demos juntos ao falarmos do mestrado e da vida.

Indubitavelmente, este trabalho não teria se concretizado sem a valiosa orientação da Professora Doutora Rita Durigan. Expresso aqui minha mais profunda gratidão por tudo o que vivi, aprendi e evoluí sob sua mentoria. Professora, obrigado por sua paciência, dedicação e humanidade, tanto como orientadora quanto como pesquisadora. Suas orientações foram fundamentais, e sou imensamente grato por todas as oportunidades que me foram concedidas durante este ciclo.

Agradeço também a todos os parceiros envolvidos neste projeto. Ao Professor Wagner, por quem nutro grande respeito e admiração, obrigado pelos ensinamentos compartilhados e pela oportunidade de integrar seu laboratório. Sua contribuição foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Encontrei pessoas incríveis ao longo desta jornada, como Isabelle, Daiane e Victória. A colaboração e apoio de vocês foram indispensáveis para que tudo isso fosse possível.

Ao meu coorientador, Ivo Neto, registro minha sincera gratidão. Sua disposição em ajudar e orientar sempre que necessário fez toda a diferença e contribuiu significativamente para a conclusão deste trabalho.

A todos vocês, meu mais sincero obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração resumida do músculo esquelético e suas subdivisões,	27
Figura 2 -Ilustração histológica e funcional da unidade contrátil do músculo,.....	29
Figura 3. Figura representativa do delineamento experimental do estudo.	41
Figura 4 Proteínas reguladas entre as comparações GA.....	43
Figura 5 Clusters e processos biológicos GA.....	45
Figura 6. Redes de proteínas e análise de enriquecimento funcional.	47
Figura 7. Proteínas reguladas entre comparações JMT.	48
Figura 8. Clusters e processos biológicos JMT.	49
Figura 9. Clusters de produtos gênicos e suas relações funcionais..	50

LISTA DE SIGLAS

- **AAT** – Alfa-1 antitripsina
- **ACO2** – Aconitase 2
- **ADP** – Adenosina Difosfato
- **AMP** – Adenosina Monofosfato
- **AMPK** – Proteína quinase ativada por AMP
- **ATP** – Adenosina trifosfato
- **ATP** – Adenosina Trifosfato
- **C** – Grupo controle
- **C3** – Componente complemento 3
- **Col2a1** – Colagénio Alfa-1 tipo II
- **Col3a1** – Colágeno do tipo 3
- **Col1a1** - colagénio alfa-1 tipo I
- **CP** – Ceruloplasmina
- **CPT1** – Carnitina Palmitoiltransferase 1
- **CRAT** – Carnitina O-acetiltransferase
- **CS** – Citrato Sintase
- **CTGF** – Fator de crescimento de tecido conjuntivo
- **FADH2** - Dinucleótido de Flavina e Adenina
- **FDR** – False discovery rate (taxa de descobrimento falso)
- **FGA** – Fibrinogênio Alfa
- **FGB** – Fibrinogênio Beta
- **FT** – Fator de Coagulação Tecidual
- **GSTANT3** – Glutathione S-transferase Alfa-3
- **GA** – Músculo Gastrocnêmio
- **HP** - Haptoglobina
- **HSP2** – Proteína 2 de Choque Térmico
- **Hspa4** – Proteína 4 de Choque Térmico
- **IL-6** – Interleucina 6
- **JMT** – Junção Miotendínea
- **MEC** – Matriz extracelular
- **mRNA** – Ácido Ribonucleico Mensageiro

- **MUG1** – Muramidase
- **NADH** - Nicotinamida Adenina Dinucleótido
- **OXCT1** – Oxaloacetato - COA
- **P70S6K** – Proteína ribossômica s6 quinase beta
- **PCA** – Principal component analysis (análise de componente principal)
- **PRDX4** - peroxirredoxina 4
- **PTP** – Pós transecção parcial
- **PYGL** – Glicogênio Fosforilase Hepática
- **PYGM** – Glicogênio Fosforilase Muscular
- **PZP** - Proteína da Zona de gravidez
- **SOD** - Superóxido Dismutase
- **TC** – Tendão Calcâneo
- **TXn1** - tioredoxina 1
- **VCL** - Vinculina

SUMÁRIO

1. Introdução	24
2. Revisão De Literatura	26
2.1 Músculo Esquelético: Caracterização E Função.	26
2.2 Matriz Extracelular Do Músculo Esquelético.....	30
2.3 Estrutura E Função Da Junção Miotendínea	31
2.4 Adaptações Musculares Mediante A Lesão Do Tendão :	32
2.5 Estratégias Proteômicas No Estudo Das Respostas Moleculares	35
3. Objetivos.....	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
3.3 Hipótese	37
4. Métodos	37
4.1 Grupos Experimentais	38
4.2 Procedimentos Experimentais:.....	38
4.3 Eutanásia	38
4.4 Análises:.....	39
4.4.1 Extração Tecidual:	39
4.4.2 Digestão Proteica	39
4.4.3 Dessalinização	40
4.4.4 Análise Nano-Lc Ms/Ms.....	40
4.4.5 Pesquisa Em Banco De Dados E Bioinformática.....	42
5. Resultados	43
5.1 Análise Proteômica Do Músculo Gastrocnêmio Após Lesão Tecidual	43
5.2 Análise Proteômica Da Junção Miotendínea Após Lesão Tecidual.....	47
6. Discussão	51
6.1 Período De 3 Dias (3d): Ativação Da Resposta Inflamatória E Estresse Oxidativo... 51	
6.1.1 Músculo Gastrocnêmio.....	52
6.1.2 Junção Miotendínea	54
6.2 Período De 14 Dias (14d): Adaptação Metabólica E Oxidação De Ácidos Graxos 55	
6.2.1 Músculo Gastrocnêmio.....	55
6.2.2 Junção Miotendínea	57

6.3 Período De 28 Dias (28d): Fase De Recuperação E Regulação Metabólica	59
6.3.1 Músculo Gastrocnêmio.....	59
6.3.2 Junção Miotendínea	61
6.4 Período De 55 Dias (55d): Adaptação E Remodelamento Metabólica	63
6.4.1 Músculo Gastrocnêmio.....	63
6.4.2 Junção Miotendínea	63
7. Impactos Científicos:.....	64
8. Conclusão	66
8. Referências Bibliográficas	63

1. INTRODUÇÃO

O sistema muscular é de suma importância para a manutenção das atividades de vida diária, deambulação, controle postural, respiração, fala (KOEPPEN; STANTON, 2008) e representa cerca de 40% da massa corporal total (JUNG *et al.*, 2019). Portanto, o músculo constitui-se de elementos contráteis e estabelece estreita comunicação com os tecidos conjuntivos intramusculares, os quais são ricos em colágenos, garantindo não somente a organização do músculo, mas auxiliando no processo de transmissão de força muscular (KJAER, 2004). Além disso, o tecido muscular possui alta capacidade plástica, frente à demanda tensional e metabólica, impostas durante exercício, imobilização ou lesão (ABREU *et al.*, 2017; GOMES DE MELO COELHO *et al.*, 2013; KJAER, 2004).

Não obstante, a força produzida, como produto da contração muscular, é transmitida para os tendões e ossos através da junção miotendínea (JMT) (JAKOBSEN; KROGSGAARD, 2021). A estrutura da JMT é complexa e específica, pois apresenta, em sua constituição, a ancoragem dos filamentos de actina, da última banda A do sarcômero, ao complexo distroglicano, o qual favorecerá a conexão dos miofilamentos de actina com as fibrilas colágenas da matriz extracelular (MEC) do tendão (NARAYANAN; CALVE, 2021); Ainda, a conexão entre os miofilamentos de actina e as fibrilas colágenas, formam invaginações e evaginações, denominada de interdigitações, aumentando a área de contato tecidual e, por consequência, conferindo maior resistência tecidual a tração mecânica (TIDBALL, 2011).

Portanto, a JMT é de relevante para a comunicação cruzada entre músculo-tendão, sendo que uma alteração da homeostasia desses tecidos pode resultar em uma nova organização comunicacional entre células musculares e células tendíneas através da JMT (JAKOBSEN; KROGSGAARD, 2021; NARAYANAN; CALVE, 2021). Indubitavelmente, fatores intrínsecos e extrínsecos, estes associados ou não, poderão favorecer e contribuir para possíveis alterações da homeostasia tecidual, resultando em respostas inflamatórias, desbalanço do equilíbrio de síntese e degradação de proteínas, bem como de alterações do trofismo muscular (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020). Assim sendo, por ser uma estrutura extremamente requisitada pelo sistema musculo esquelético, a JMT está mais suscetível a lesão (CURZI *et al.*, 2013) Por outro lado, a falta de estímulo mecânico, devido a lesão, levou a redução das interdigitações da JMT, tornando o tecido ainda mais suscetível a lesão e com baixa capacidade de resistência a tração mecânica (CURZI *et al.*, 2013).

Tendo em vista que o músculo, JMT e o tendão são estruturas com estreita comunicação celular (JACOBSON *et al.*, 2020), estudos tem apontado para a necessidade de compreender as adaptações celulares individuais dos respectivos tecidos, bem como de forma conjunta, com o intuito de aproximar o conhecimento mecanicista com as práticas terapêuticas durante o período de reabilitação (JAKOBSEN; KROGSGAARD, 2021). Não obstante, Palumbo (2012), investigou alterações histológicas do músculo e tendão infraespinhal, após lesão experimental deste respectivo tendão, e os principais resultados observados foram processo apoptótico instaurado nas fibras musculares e nos tenócitos proximais à lesão, bem como alterações progressivas nos sarcômeros musculares, cujos arranjos estavam desregulados. Concomitantemente, um estudo recente com modelo animal evidenciou que a lesão de tendão calcâneo (TC) acarretou a desorganização das fibras de colágeno do tendão e JMT do músculo gastrocnêmio (GA), declínio da atividade de células satélites do tecido muscular e necrose miofibrilar e, após 14 dias de lesão do TC, observou-se a invasão de adipócitos no tecido muscular (GIL MELGOSA *et al.*, 2022).

Curiosamente, os estudos com humanos e modelos experimentais animais, apontam para modificações estruturais do tendão, JMT e músculo, deixando uma lacuna na literatura ao que tange a atividade e abundância de proteínas do músculo e JMT quando acometido por uma lesão de tendão (FLÜCK; HOPPELER, 2003; HULLFISH; O'CONNOR; BAXTER, 2019; SHARMA; MAFFULLI, 2006). Baseado nessas considerações, com o intuito de investigar a relação músculo-tendão, quando um desses tecidos fosse acometido por lesão, Barin e colaboradores (2019) conduziram um estudo, em nosso grupo de pesquisa, identificando que o tendão calcâneo sofre extenso remodelamento da matriz extracelular (MEC) após 3, 14 e 28 dias de lesão do músculo gastrocnêmio, levando a propriedades funcionais alteradas em ratos. Nesse sentido, Barin (2019) evidenciou redução da sinalização de colágeno tipo I, bem como redução da expressão do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) após o 3 dia da lesão muscular, remodelamento da MEC, alterações nas propriedades mecânicas, expressão gênica e fatores transcricionais para a síntese de MEC do tendão, revelando a suscetibilidade para tendinopatias após lesão muscular.

Nesse contexto, o atual estudo pretendeu dar continuidade ao estudo supracitado, porém investigando como o GA (Músculo Gastrocnêmio) e a JMT se comportam mediante uma lesão parcial do TC em ratos. Para tal, será avaliado o perfil de proteínas do GA e JMT por meio de análise proteômica. Destacamos, a importância do entendimento das interações

músculo-tendíneas sobre os mecanismos moleculares envolvidos na presença de uma lesão tecidual subjacente. Consequentemente este estudo ampliará na visão mecanicista e fisiológica do músculo esquelético ao ser acometido por uma lesão de tendão adjacente, além disso ampliará a visibilidade terapêutica, a qual é de suma importância no processo de reabilitação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO: CARACTERIZAÇÃO E FUNÇÃO.

O músculo esquelético, caracterizado por ser um tecido altamente plástico frente a demanda mecânica diária que sofre e exerce, compõe aproximadamente 40% do peso corporal de um ser humano adulto e, assim como os ossos são depósitos de sais minerais essenciais para o corpo humano, o músculo armazena aproximadamente 50-75% das proteínas totais do corpo humano (FRONTERA; OCHALA, 2015). O músculo apresenta organização hierárquica bem fundamentada e descrita, podendo ser dividido em ventre muscular e, nas extremidades e proximalmente, os tendões. Portanto, o ventre muscular é a forma agregada de vários fascículos, os quais são compostos pelas fibras musculares. As fibras musculares apresentam feixes celulares longos, cilíndricos e multinucleados, sendo unidades que agregam centenas de miofibrilas, como representado na figura 1. (MESCHER, 2019).

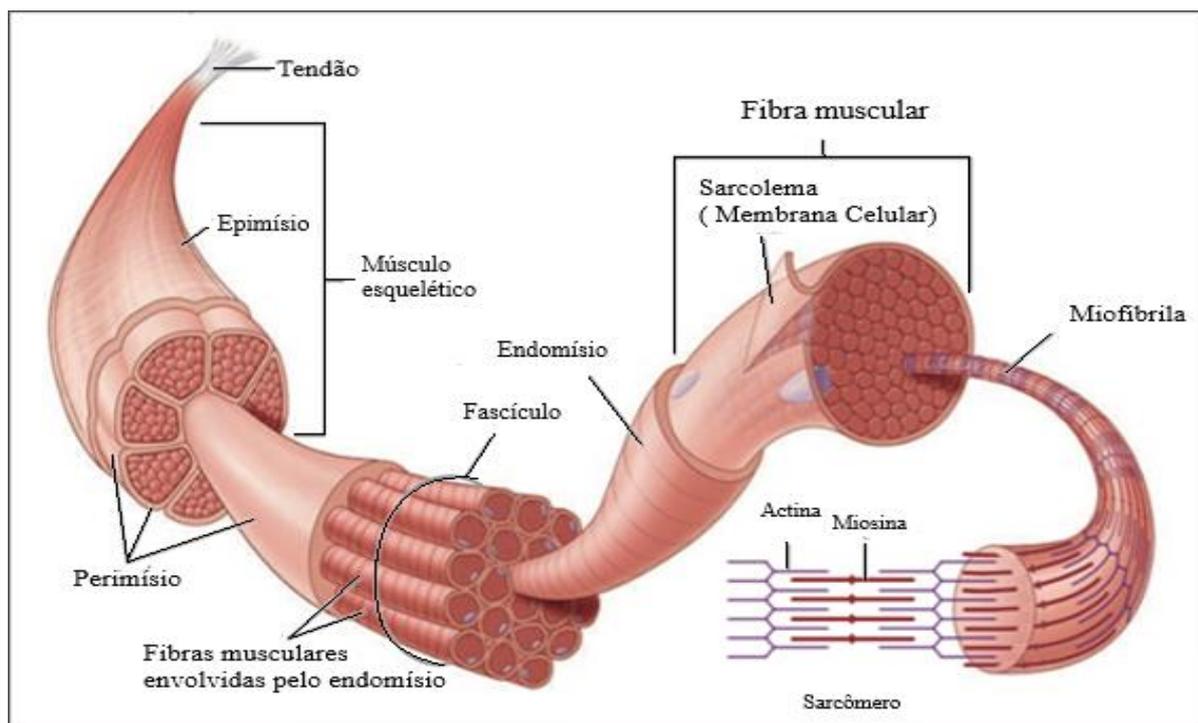


Figura 1 - Ilustração resumida do músculo esquelético e suas subdivisões, as quais são representadas pelos tecidos conjuntivos que revestem o músculo (epimísio, perimísio e endomísio); as unidades que, agregadas conferem a arquitetura muscular (Miofibrilas, fibras musculares e fascículos musculares); O sarcolema (membrana celular que reveste a fibra muscular); A unidade contrátil do Músculo (sarcômero) e suas respectivas proteínas contráteis. Figura adaptada de Subramanian (2015).

Cada unidade apresentada é revestida por finas camadas de tecido conjuntivo (fáscias), com o intuito de unir, separar, transmissão de força e comunicação celular (ADSTRUM *et al.*, 2017), onde o epimísio reveste o músculo, perimísio reveste e separa os fascículos e, o endomísio, reveste as fibras musculares externamente. Ainda de acordo com a figura 1, apresenta-se o sarcolema, que é a membrana celular que circunda a fibra muscular e mantém conexão com as miofibrilas. O sarcolema é fundamental pois apresenta complexo proteico que se conecta fisicamente com a estrutura miofilamentosa de actina, participando intimamente na comunicação e tradução celular, bem como na transmissão de força. (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020; STECCO, 2015; STECCO *et al.*, 2018). O espaço entre o sarcolema e as miofibrilas é preenchido pelo sarcoplasma, sendo o correspondente direto do citoplasma na célula muscular. O sarcoplasma é composto principalmente por água, grânulos de glicogênio e organelas, apresentando proteínas fundamentais para a transmissão de força, excitação e contração muscular (FRONTERA; OCHALA, 2015).

As miofibrilas, são as menores estruturas da organização muscular e se destacam pelas estriações alternadas, refletindo as bandas A, I e a divisão entre as duas bandas, os discos Z. Ainda, as miofibrilas podem ser caracterizadas pela presença do sarcômero: subunidade funcional do aparato contrátil, a qual se estende entre as ocorrências dos discos Z, como o ilustrado pela figura 2. Tais estriações ocorrem pela sobreposição dos miofilamentos contráteis, sendo compostos por 4 tipos de proteínas: os filamentos espessos de miosina, os filamentos finos de actina, troponina e tropomiosina (EXETER; CONNELL, 2010).

As bandas A, também chamadas de bandas anisotrópicas, correspondem às regiões onde os filamentos espessos de miosina se encontram, com ou sem a sobreposição dos filamentos finos de actina, conferindo a aparência mais escura. Já as bandas I, ou isotrópicas, são compostas apenas pelos filamentos finos de actina e apresentam uma coloração mais clara devido à ausência de filamentos espessos. Os discos Z, por sua vez, representam as linhas delimitadoras dos sarcômeros, consistindo em estruturas onde os filamentos finos de actina se ancoram, permitindo a organização e estabilidade do aparato contrátil muscular (EXETER; CONNELL, 2010).

A relação entre essas estruturas e a proteômica é significativa, já que a proteômica, como ciência voltada ao estudo abrangente das proteínas, permite identificar e caracterizar as proteínas presentes nas miofibrilas, incluindo suas modificações pós-traducionais e interações funcionais. A análise proteômica de componentes como a miosina, a actina, a troponina e a tropomiosina, bem como proteínas associadas aos discos Z, contribui para o entendimento detalhado das funções musculares, adaptações a estímulos fisiológicos e condições patológicas que envolvem disfunções no aparato contrátil. Essa abordagem fornece uma visão mais aprofundada da dinâmica molecular e das redes de interação que sustentam a contratilidade e a organização das miofibrilas (OHLENDIECK, 2011).

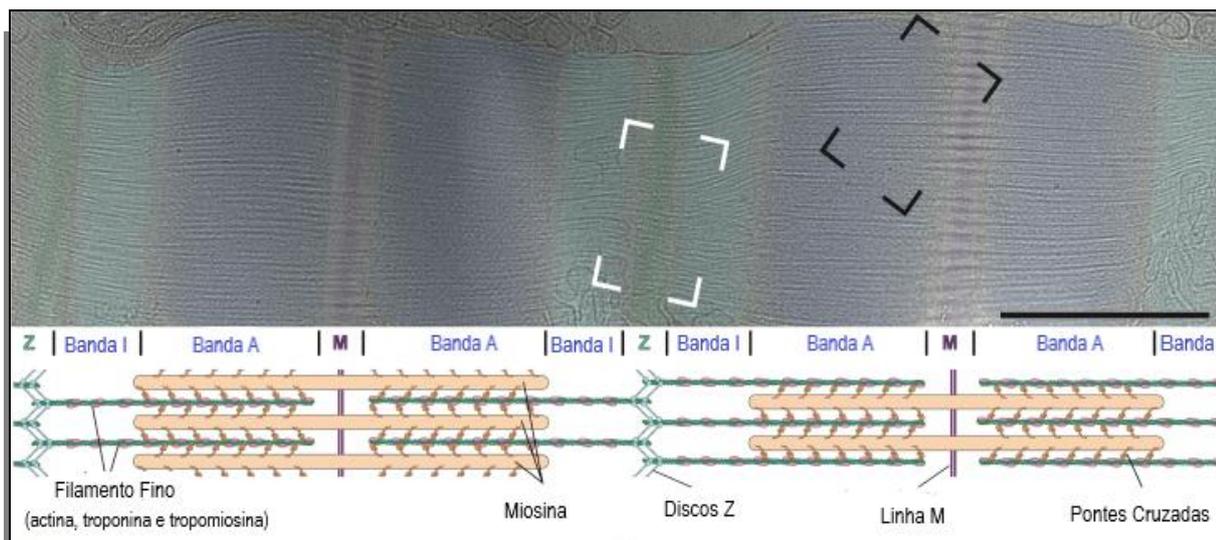


Figura 2 -Ilustração histológica e funcional da unidade contrátil do músculo, sarcômero. A banda A é caracterizada pelo filamento fino de actina; A banda I é a sobreposição dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina; os discos Z representam e delimitam a unidade funcional contrátil do aparato muscular; A linha M é caracterizada apenas pelo filamento de miosina; por fim, a sobreposição dos filamentos de actina e miosina evidenciam a presença das pontes cruzadas. Imagem adaptada de Wang (2021).

De acordo com Irving (2017), durante a contração muscular, o complexo troponina-tropomiosina liga-se aos íons de cálcio, fazendo com que os sítios de ligação da actina estejam aptos para o acoplamento das cabeças de miosina. Uma vez acoplados, ocorrem alterações conformacionais, devido a clivagem de adenosina trifosfato (ATP), que fazem as cabeças das pontes cruzadas puxarem o filamento de actina, ocorrendo o deslizamento dos filamentos helicoidais de actina e miosina. Após estarem inclinadas, as cabeças de miosina ficam suscetíveis a hidrólise de ATP em adenosina difosfato (ADP), liberando a cabeça de miosina para realizar a próxima ligação e iniciar um novo ciclo de contração (IRVING, 2017).

Segundo Qaisar (2016), as fibras musculares podem ser subclassificadas em quatro tipos, de acordo com seu metabolismo e propriedade contráteis, sendo: Tipo I — fibras oxidativas e de contração lenta, Tipo IIA — fibras oxidativas e de rápida contração, Tipo IIB — fibras glicolíticas e de contração rápida; e Tipo Iix — fibras oxidativas-glicolíticas rápidas intermediárias. Adicionalmente, Häggmark (1986) observou que o perfil de fibras podem mudar de acordo com a utilização ou lesão muscular. Em seu estudo, 8 atletas foram avaliados após cirurgia de joelho, evidenciando uma redução de 23% na quantidade de fibras do tipo I na perna operada e uma diferença de 49% de fibras do tipo I quando comparado com a perna não cirurgiada. Dessa forma, compreende-se o músculo esquelético como um sistema complexo, crucial para o metabolismo de proteínas, e que pode apresentar fenótipos

diferentes, ou seja, características fisiológicas e histológicas diferentes quando imposto a uma situação estressante (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020)

2.2 MATRIZ EXTRACELULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

A matriz extracelular (MEC) é uma rede dinâmica e tridimensional, bem organizada, presente em todos os tecidos biológicos do corpo humano, a qual fornece suporte estrutural para células e tecidos, através de macromoléculas extracelulares (TAKALA; VIRTANEN, 2000; THORSTEINSDOTTIR *et al.*, 2011). Além disso, desempenha funções importantes para a homeostase celular, participando nos processos de regulação celular, remodelamento, transmissão de força, cicatrização, regeneração tecidual, bem como na comunicação de tecidos adjacentes (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020). A MEC, composta principalmente por colágeno (proteína), proteoglicanos e glicosaminoglicanos, é uma estrutura especializada para suporte do tecido a qual circunda e, por isso, cada tecido apresentará composições e abundâncias moleculares diferentes (KARAMANOS *et al.*, 2021; THEOCHARIS *et al.*, 2016), sendo a MEC do tecido músculo esquelético de suma importância para compreender o remodelamento, síntese e degradação de proteínas musculares.

A matriz extracelular (MEC) do músculo esquelético é composta por uma rede de componentes bioquímicos, como colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas, além dos tecidos conjuntivos (fáscias) que o revestem. Estes incluem o epimísio, que envolve todo o músculo; o perimísio, que circunda os feixes de fibras musculares; e o endomísio, que envolve individualmente cada fibra muscular (KOVANEN, 2002). Nesse contexto, além dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos, a MEC muscular apresenta predominante abundância de colágeno em sua composição (TAKALA; VIRTANEN, 2000). O colágeno é uma família de proteínas, subclassificadas em 19 tipos (I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII, XIV, XV, XVIII e XIX), as quais apresentam, de forma geral, três cadeias polipeptídicas (glicina, prolina e lisina) organizadas em hélice-tripla, sendo fundamental para a formação e manutenção da MEC, bem como dos tecidos conjuntivos (KJAER, 2004). Assim, o epimísio apresenta predominância de colágeno do tipo I, o perimísio do tipo I e III, e o endomísio do tipo I, III e V; Ressalta-se a importância do colágeno do tipo I, pois confere resistência a tração e rigidez (elastância), enquanto o colágeno do tipo III garante a complacência tecidual, e o colágeno do tipo V desempenha função fundamental durante a fibrilogênese (KJAER, 2004; KOVANEN, 2002).

Ao resgatar o conceito de que a MEC também participa na comunicação entre tecidos adjacentes, Miller (2005) ao estudar o comportamento do colágeno e de síntese de proteína muscular do quadríceps e tendão patelar, após protocolo de exercício aeróbio, observou uma resposta coordenada entre células musculares e tendíneas, evidenciando aumento significativo da síntese de colágeno muscular e tendíneo 6 e 24 horas após a prática do exercício. Por conseguinte, entende-se que a resposta entre músculo e tendão foi semelhante quando analisado a proteína de maior abundância da MEC muscular e tendínea. Portanto, o estudo demonstrou a existência da comunicação cruzada entre os tecidos ou *crossstalking* (comunicação celular de tecidos diferentes frente à alguma demanda externa) entre o músculo e tendão (MACKKEY *et al.*, 2008), deixando uma lacuna importante durante esse processo, no que tange a função da junção miotendínea — estrutura de transição do músculo para o tendão — na resposta do tendão e músculo frente à demanda mecânica ou a lesão (NARAYANAN; CALVE, 2021).

2.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA

O músculo esquelético, junção miotendínea e tendão apresentam continuidade estrutural em aspecto macroscópico e estabelecem estreita comunicação a nível celular (STECCO, 2015). Assim, a força produzida, como produto da contração muscular, é transmitida para os tendões e ossos através da junção miotendínea, cujo tecido apresenta arquitetura complexa e alta especialização em transmitir força (JAKOBSEN; KROGSGAARD, 2021). Concomitantemente, a JMT é formada por uma estrutura complexa que inclui microfilamentos de actina e proteínas associadas, que se estendem da última linha Z do sarcômero até o sarcolema. Além disso, há proteínas transmembrana, integrinas e distroglicanos, que fazem a ligação entre os componentes do citoesqueleto e a membrana basal. Por fim, outras proteínas conectam a membrana basal à matriz extracelular do tendão, garantindo a integração funcional entre músculo e tendão (NARAYANAN; CALVE, 2021). O complexo distroglicano permitirá a ancoragem de actina com proteínas extracelulares da MEC do tendão, como a laminina e fibrilas colágenas (JAKOBSEN; KROGSGAARD, 2021). As ancoragens entre proteínas musculares e tendíneas formam invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, denominadas de *finger-like* (interdigitações), aumentando a área de contato, com o intuito de prevenir possíveis rupturas do arquétipo miotendinoso (TIDBALL, 2011).

Nesse sentido, a literatura aponta para a necessidade em compreender melhor o comportamento desse tecido em diferentes situações (JAKOBSEN; KROGSGAARD, 2021;

NARAYANAN; CALVE, 2021). Um estudo recente avaliou o proteoma da matriz extracelular do músculo, tendão e JMT, de camundongos, através de análise proteômica, e suportou a ideia de continuidade da MEC ao longo dos 3 tecidos (músculo, JMT e tendão) através do *overlapping* (expressão de uma mesma proteína, gene, aminoácido etc... em tecidos diferentes) de colágeno tipo I, III e V, bem como de proteoglicanos ricos em leucina (JACOBSON *et al.*, 2020). Adicionalmente a isto, Curzi (2012) investigou os efeitos do exercício físico sobre a JMT de 12 ratos *Sprague-Dawley*, e observou o aumento de interdigitações, bem como a área de contato da JMT, demonstrando a alta eficiência da JMT em adaptar-se para resistir e facilitar que a força produzida pelo músculo seja transmitida de forma eficiente.

No entanto, as adaptações da JMT também podem refletir processos de degradação do próprio tecido ou dos tecidos adjacentes (MILLER *et al.*, 2005). A sinalização negativa da JMT pode advir da perda ou desorganização da comunicação cruzada entre músculo e tendão, processos degenerativos por falta de estímulo mecânico e ruptura/estiramento devido a estímulos, recorrentes e sucessivos, que possam exceder demasiadamente a capacidade de adaptação tecidual frente à demanda mecânica imposta (NARAYANAN; CALVE, 2021). Assim, Curzi (2013) observou que a falta de estímulos mecânicos em ratos levou a redução das interdigitações da JMT, inferindo que isso é um fator facilitador para a lesão muscular, visto que a área de contato, com as fibrilas tendíneas, e a capacidade de resistir a tensão estão reduzidos. De acordo com recente estudo, Barin (2019) observou que uma lesão no músculo esquelético pode alterar a comunicação entre tenócitos e miócitos, ao ponto de favorecer o tendão adjacente do músculo acometido a possíveis tendinopatias. Não obstante, até o presente momento, pouco sabe-se acerca das possíveis alterações celulares do músculo e JMT após uma lesão no tendão adjacente (DAVIES *et al.*, 2018; GIL-MELGOSA *et al.*, 2021; PALUMBO; ROVESTA; FERRETTI, 2012).

2.4 ADPTAÇÕES MUSCULARES MEDIANTE A LESÃO DO TENDÃO ADJACENTE:

Assim como qualquer outro tecido biológico, o sistema muscular, bem como a JMT e o tendão, são dependentes da equalização dos níveis de síntese e degradação de proteínas, para que sua condição saudável seja estabilizada (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020) e, qualquer alteração no estado de homeostasia desses tecidos, seja por lesão, doença ou fatores intrínsecos, ocasionará alterações morfofuncionais e metabólicas, as quais poderão levar ao

surgimento de respostas inflamatórias, hipertróficas ou atroficas (GOMES DE MELO COELHO *et al.*, 2013). Portanto, a lesão do tendão, podendo ser crônica ou aguda; causada por fatores intrínsecos ou extrínsecos, estes combinados ou não (SHARMA; MAFFULLI, 2006) pode ocasionar efeitos plásticos no tecido muscular, como mudanças estruturais e metabólicas do tecido (FLÜCK; HOPPELER, 2003).

Desse modo, uma das principais características da adaptação muscular frente a lesão de seu respectivo tendão é a atrofia muscular (EKEN *et al.*, 2021)., Em um estudo com 46 pacientes submetidos à cirurgia de reparação do tendão de calcâneo, Eken (2021) avaliou o volume muscular e a área de secção transversa utilizando ressonância magnética e observou que a atrofia do músculo gastrocnêmio foi persistente, mesmo após 2 anos de cirurgia, tendo correlações negativas com testes funcionais realizados para o tratamento clínico. Da mesma forma, os achados de Eken (2021), foram corroborados por Stäudle (2022), que observou atrofia do GA , após dois anos, ao estudar o comportamento da marcha de 9 pacientes que tiveram ruptura de TC e submeteram-se a procedimento cirúrgico.

Por outro lado, Hullfish (2019) sugere a existência da perturbação comunicacional entre TC e GA, uma vez que foram observadas reduções significativas no comprimento do fascículo muscular, ao analisar 9 pacientes que sofreram ruptura de TC. Portanto, ao avaliar o comprimento do fascículo muscular e ângulo de penação, observou-se que ambos estavam comprometidos quando comparados com o membro contralateral, sendo o fascículo muscular 15 % menor, e o ângulo de penação 21% maior, após 4 semanas da lesão aguda de TC. Semelhantemente, Khair (2022) avaliou a área de secção transversa e comprimento do fascículo muscular de 24 pacientes, com ruptura de TC, através de ultrassonografia; Observou-se, portanto, que após 1 ano do procedimento cirúrgico, o comprimento do fascículo representou uma redução de 6 cm quando comparado com o membro contralateral e o angulo de penação 2,5° maior ao comparar com o membro contralateral. Em relação a isso, recentes estudos com humanos apresentaram mudanças significativas ao que tange o aspecto estrutural do GA e TC (EKEN *et al.*, 2021; FLÜCK; HOPPELER, 2003; HULLFISH; O'CONNOR; BAXTER, 2019; KHAIR *et al.*, 2022; STÄUDLE *et al.*, 2022).

Em consonância com as observações em humanos, estudos em modelos animais têm fornecido percepções importantes sobre os mecanismos celulares e moleculares subjacentes às alterações musculares após lesão do TC. Um estudo em modelo animal demonstrou que a lesão de TC levou ao acúmulo de tecido fibrótico, desorganização das fibras de colágeno do

tendão e junção miotendínea, declínio da atividade de células satélites do tecido muscular e necrose miofibrilar, após 14 dias de lesão do TC. Este período, correspondente ao início da fase proliferativa/reparadora da cicatrização, é caracterizado pela ativação de fibroblastos, produção de matriz extracelular e início da angiogênese. As alterações observadas refletem a resposta inicial do tecido à lesão, com inflamação, degradação da matriz original e tentativa de reparo, porém ainda com formação de tecido cicatricial desorganizado. O estudo enfatizou que o 28º dia pós lesão de TC foi o mais evidente para as alterações citadas acima, com o surgimento de adipócitos no tecido muscular (GIL-MELGOSA *et al.*, 2021) Aos 28 dias, a fase proliferativa está em pleno curso, com maior deposição de colágeno e progressiva maturação do tecido cicatricial. O surgimento de adipócitos neste período sugere uma falha na regeneração muscular, com substituição do tecido muscular funcional por tecido adiposo, o que compromete a recuperação da força e função muscular a longo prazo. Este achado é importante pois demonstra a progressão da fibrose e a possível adipogênese na ausência de resolução completa do processo reparativo (GIL-MELGOSA *et al.*, 2021).

Concomitantemente, Ferrié (2019) estudou as alterações do músculo sóleo, após 5 minutos, 4 dias e 14 dias de lesão de TC; Ferrié (2019), portanto, observou que a lesão de TC acometeu negativamente o músculo sóleo, enfatizando o 14º dia após lesão, o qual apresentou aumento de tecido conjuntivo, diminuição da massa muscular, aumento das fibras rápidas, diminuição da área de secção transversa, bem como a redução de proteínas específicas para a sinalização de hipertrofia, como a P70S6K (proteína ribossômica S6 quinase beta-1). Os 5 minutos após a lesão representam a fase aguda inicial, onde ocorrem as primeiras reações inflamatórias e a liberação de mediadores químicos. A avaliação em 4 dias corresponde ao pico da fase inflamatória, com recrutamento máximo de células inflamatórias para o local da lesão. Neste momento, o objetivo principal é a remoção de debris celulares e o início da organização do reparo. Aos 14 dias, como já mencionado, inicia-se a fase proliferativa, com proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e formação de tecido de granulação. As alterações observadas por Ferrié (2019) neste período, como aumento de tecido conjuntivo e diminuição da massa muscular, refletem a progressão da fibrose e o início da atrofia muscular, respectivamente. A redução da P70S6K, uma proteína chave na sinalização da hipertrofia muscular, sugere uma diminuição da capacidade de síntese proteica e, conseqüentemente, da capacidade de regeneração muscular

2.5 ESTRATÉGIAS PROTEÔMICAS NO ESTUDO DAS RESPOSTAS MOLECULARES À LESÃO DO TENDÃO CALCÂNEO:

A proteômica tem revolucionado o estudo das alterações moleculares em lesões musculoesqueléticas, especialmente no contexto do músculo gastrocnêmio e da junção miotendínea (JMT) após lesão do tendão calcâneo (TC). Estudos indicam que tais lesões desencadeiam mudanças complexas no perfil proteico, refletindo processos como inflamação, remodelamento da matriz extracelular (MEC) e regeneração tecidual. Por exemplo, proteínas associadas ao estresse oxidativo, como a superóxido dismutase (SOD), apresentam regulação diferencial nos estágios iniciais do reparo tecidual (FLÜCK; HOPPELER, 2003; GIL-MELGOSA et al., 2021). Adicionalmente, proteínas estruturais, como colágenos do tipo I e III, são reguladas para favorecer a reorganização da MEC e restaurar a funcionalidade do tecido lesado (CURZI et al., 2013; KJAER, 2004). Essas mudanças destacam a importância de compreender a regulação proteica para desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes.

A análise proteômica em larga escala, por meio de técnicas como LC-MS/MS, permite identificar e quantificar proteínas diferencialmente expressas entre condições experimentais. Em modelos animais submetidos à lesão do TC, observou-se que as proteínas relacionadas à via do TGF- β 2 e à sinalização de integrinas desempenham papéis cruciais na reorganização da JMT (DAVIES et al., 2018; SCHWÄMMLE, 2020). Essas vias são essenciais para a reparação tecidual, regulando processos como proliferação celular e remodelamento da MEC. Além disso, fatores de transcrição como NF- κ B e proteínas da família das quinases ativadas por AMP (AMPK) têm sido identificados como moduladores importantes na adaptação metabólica do músculo após lesão (JAKOBSEN; KROGSGAARD, 2021; FIRMINO et al., 2018). Assim, a proteômica oferece uma visão abrangente dos mecanismos moleculares que governam a resposta regenerativa.

A integração dos dados proteômicos em análises temporais tem sido fundamental para entender as diferentes fases do processo de reparação. Nos primeiros dias após a lesão, há uma predominância de proteínas inflamatórias e de degradação proteica, como as ubiquitina-ligases, que facilitam a remoção de componentes celulares danificados (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020; BARIN et al., 2019). Já em estágios intermediários (14 a 28 dias), observa-se a ativação de vias associadas à proliferação celular e ao metabolismo energético, refletindo a transição para a regeneração ativa (CURY, 2019; GIL-MELGOSA et al., 2021). Finalmente, aos 55 dias, o perfil proteico sugere um retorno à homeostase, com regulação de

proteínas estruturais e metabólicas envolvidas na recuperação funcional (HULLFISH; O'CONNOR; BAXTER, 2019).

No contexto terapêutico, a proteômica também auxilia na identificação de biomarcadores que podem guiar intervenções mais precisas. Proteínas como a creatinoquinase (CK) e fatores de crescimento, como VEGF, têm sido associados ao potencial regenerativo do tecido (SHARMA; MAFFULLI, 2006; MILLER et al., 2005). Além disso, a modulação de vias como a PI3K/Akt/mTOR, envolvida na hipertrofia e regeneração muscular, tem demonstrado resultados promissores em estudos pré-clínicos (EKEN et al., 2021; KHAN et al., 2022). Esses avanços sublinham a relevância da proteômica para o desenvolvimento de estratégias baseadas na biologia molecular, capazes de acelerar a recuperação tecidual e prevenir sequelas.

Por fim, embora haja uma extensa literatura sobre as alterações nos músculos que compõem o manguito rotador (CONNIZZO; GRODZINSKY, 2018; DAVIES et al., 2018; GIBBONS et al., 2017) e sobre o metabolismo mitocondrial após lesão de tendões associados (FLÜCK, Martin et al., 2020), ainda faltam estudos que explorem detalhadamente a atividade proteica e as vias moleculares ativadas no músculo gastrocnêmio (GA) e na junção miotendínea (JMT) após lesão do tendão calcâneo (TC). Essa lacuna científica é crucial, pois compreender as alterações moleculares específicas desses tecidos pode aproximar os modelos mecanicistas das práticas clínicas, permitindo o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais eficazes. A proteômica, nesse contexto, oferece uma visão abrangente dos mecanismos moleculares envolvidos na regeneração do GA e da JMT após lesões. Essa abordagem permite identificar alterações no perfil proteico que são essenciais para o reparo tecidual, como proteínas associadas à inflamação, ao metabolismo energético e à reorganização estrutural. Além disso, a análise proteômica possibilita a construção de redes funcionais de interação proteína-proteína, destacando alvos terapêuticos potenciais para intervenções mais eficazes (NARAYANAN; CALVE, 2021; SCHWÄMMLE, 2020). Assim, investigar as respostas proteômicas do GA e da JMT não só contribui para a ciência básica, mas também tem o potencial de reduzir prejuízos funcionais a longo prazo e otimizar processos de reabilitação (JACOBSON et al., 2020; FLÜCK et al., 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar as alterações no perfil proteômico do músculo gastrocnêmio e da JMT após lesão parcial do TC, buscando compreender as respostas moleculares e as adaptações envolvidas na recuperação estrutural e funcional desses tecidos após 3, 14, 28 e 55 dias de transecção parcial do tendão de calcâneo.

3.2 ESPECÍFICOS

→ Identificar as proteínas específicas do músculo gastrocnêmio e junção miotendínea entre os dias 3,14,28 e 55 dias após transecção parcial do TC.

→ Analisar as vias biológicas e moleculares relacionadas às proteínas reguladas em resposta à lesão.

→ Compreender as interações moleculares entre as possíveis respostas inflamatórias, oxidativas e de remodelamento tecidual entre a interface músculo tendão

3.3 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que uma lesão no tendão calcâneo acarreta prejuízo à estrutura e função do músculo gastrocnêmio e junção miotendínea, podendo, assim, ser designada como um novo fator de risco intrínseco para o desenvolvimento de lesão muscular.

Alterações no perfil de proteínas relacionadas à síntese e degradação, bem como proteínas envolvidas na manutenção da matriz extracelular (MEC) do músculo gastrocnêmio e da JMT, são esperadas após 3, 14, 28 e 55 dias de transecção parcial do tendão calcâneo. Essas mudanças podem refletir adaptações teciduais ao processo de reparo e remodelação induzido pela lesão.

4. MÉTODOS

Foram utilizados 30 ratos *norvegicus wistar* de aproximadamente 2 meses com peso médio de 250g. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Católica de Brasília, UCB. Eles permaneceram agrupados em gaiolas plásticas, com livre acesso à água e ração peletizada, com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e temperatura controlada. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e aprovado pelo Comitê de Ética no Estudo com Animais (CEUA) da Universidade Católica de Brasília (UCB) nº 0012/19. Todos os

procedimentos experimentais realizados com os animais anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xilazina 12 mg/Kg/peso corporal e cetamina 95 mg/Kg/peso corporal).

4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram randomizados aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (n= 6 animais por grupo): controle sem transecção parcial de TC (C), grupo 3 dias pós-transecção parcial de TC (PTP-3d), grupo 14 dias pós-transecção parcial de TC (PTP-14d), grupo 28 dias pós-transecção parcial de TC (PTP-28d) e grupo 55 dias pós-transecção parcial de TC (PTP-55d). Após o tempo cronológico proposto, o músculo gastrocnêmio e a junção miotendínea foram extraídos para análises moleculares. Os músculos foram então congelados e armazenados em freezer a -80°C . Em seguida, os animais foram eutanasiados com overdose anestésica.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS:

Protocolo de lesão parcial do tendão do calcâneo : Para induzir a lesão no tendão do calcâneo (TC), os animais foram anestesiados utilizando injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12 mg/Kg/peso corporal) e cetamina (95 mg/Kg/peso corporal), a pata posterior direita foi submetida à assepsia e tricotomia. Uma transecção parcial transversa (aproximadamente 2/3 de profundidade de lesão na extensão do tendão, refletindo a profundidade do fio de corte da lâmina) foi executada na região proximal do tendão a uma distância de 4 mm de sua inserção com o osso calcâneo conforme protocolo já validado(O. BORTOLAZZO *et al.*, 2020). Posteriormente, os animais foram alocados em gaiolas com água e alimentação *ad libitum* sendo assim observados até que no efeito do anestésico tivesse terminado.

Vale salientar que todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais anestesiados, utilizando-se injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12 mg/Kg/peso corporal) e cetamina (95 mg/Kg/peso corporal). Realizou-se a proteômica como técnica principal. Os tecidos reservados às análises moleculares foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C .

4.3 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanaziados com injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12mg / kg de peso corporal) e quetamina (95 mg / kg de peso corporal). O MG foi

imediatamente dissecado da pata posterior direita e congelado em microtubos limpos com nitrogênio líquido e armazenada a -80°C . Todos os músculos foram dissecados por pesquisador experiente para evitar contaminação de outros tecidos. A metodologia de preparação da amostra, incluindo extração de proteínas, digestão de proteínas, cromatografia e análise de nano-LC-MS / MS, pesquisa de banco de dados e quantificação livre de marcadores foi adaptada de CURY, (2019)

4.4 ANÁLISES:

4.4.1 EXTRAÇÃO TECIDUAL:

O GA (200mg) bem como a JMT (100mg) foram dispostos, separadamente, em screw tube para Fast Prep com 3 beads e 4 sílicas. Foi preparada uma solução tampão de extração (Ácido cacodílico 10mM, NaCl 0.15M, ZnCl_2 1mM, CaCl_2 20mM, NaN_3 1,5mM, Triton 0,01%) para ser adicionado as amostras. Adicionalmente, foram colocados 1000 μL de solução tampão para as amostras de gastrocnêmio e 800 μL para as amostras de JMT. As amostras foram alocadas na Fast Prep para serem homogeneizadas em 3 ciclos de 20 segundos, e entre cada ciclo, 2 minutos refrigeração no gelo. Posteriormente as amostras foram alocadas em geladeira *overnight*. Após isso, as amostras foram centrifugadas duas vezes por 20 minutos, 1400 rpm, 4°C e o sobrenadante alíquotados. Os conteúdos totais de proteínas das amostras foram quantificados por meio do Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) para posterior análise por nanocromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa.

4.4.2 DIGESTÃO PROTEICA

As amostras foram sonicadas (pulsos de ultrassom de 15 segundos, com duração total de 1 minuto), com o intuito de lisar possíveis células que não foram lisadas em Fast Prep. As amostras lisadas foram submetidas a centrifugação de 16000 G por 5 minutos a 24°C . Uma alíquota do sobrenadante foi usada para quantificação de proteínas em Qubit (Invitrogen) e em seguida, alíquotas correspondentes a 100 μg de proteínas de cada amostra foram submetidas a desnaturação, redução, alquilação e finalmente digestão trípica em filtro VIVACON 500 com cut-off de 30kDa (Sartorius) por meio do uso de Ureia 8 M, DTT 0,1 M, Iodoacetamida 50 mM e tripsina 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente (FIRMINO et al., 2018; WEIS et al., 2021).

A digestão de proteínas foi realizada por Preparação de Amostras Auxiliada por Filtro (FASP) conforme descrito anteriormente (Wiśniewski et al., 2009). Resumidamente, 100 µg de proteínas foram carregados em uma unidade de filtração Vivacon® de cortes de peso molecular de 30 kDa e solubilizados com 8M Ureia 8M. A redução de proteínas foi realizada com 0,1M Ditioneitol (DTT), que irá reduzir as pontes dissulfeto as quais estabilizam a estrutura proteica, e alquilação com 20mM iodoacetamida. As amostras foram lavadas com 20mM TEAB e a digestão de proteínas foi realizada em um filtro usando a enzima tripsina (1:100) por 16 horas a 37 °C.

4.4.3 DESSALINIZAÇÃO

A etapa de digestão foi seguida pela etapa de purificação de peptídeos, também chamada de dessalinização. Para isso, uma coluna constituída por discos de matriz C18 e C8 foi montado em uma ponteira P200 e condicionada com metanol para cada amostra. Após o condicionamento, o extrato de peptídeos proveniente da digestão foi aplicado na coluna e lavados com TFA 0,1% por três vezes. Para eluição dos peptídeos purificados, foram utilizadas três soluções com níveis crescentes de acetonitrila (20 %, 50 % e 90 %). As suspensões foram secadas em speed-vac e os peptídeos foram novamente quantificados em Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e ressuspensos em TFA 0,1 % em concentração 0,3 µg/µL e armazenados a -80 °C até análise por LC-MS/MS.

4.4.4 ANÁLISE NANO-LC MS/MS

As análises de cromatografia e espectrometria de massa foram realizadas de acordo com (CURY *et al.*, 2019) e podem ser observadas, resumidamente, como ilustra a figura 3. Os peptídeos trípticos foram aplicados a um cromatógrafo líquido Dionex Ultimate 3000 (Sunnyvale, EUA) para nanocromatografia de fase reversa da seguinte forma: de 1 µg de cada réplica biológica foram injetadas em uma coluna de armadilha (2 cm x 100 µm), contendo partículas C8 e C18 de 5 µm. As amostras foram eluídas para uma coluna analítica (32 cm x 75 µm, C18 3 µm) e, em seguida, para a fonte de ionização do espectrômetro. O gradiente de eluição foi composto por 0,1% (v / v) de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% (v / v) de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B), em um gradiente de 2% a 35% do solvente B por 180 min. As frações eluídas foram pulverizadas diretamente na fonte de ionização de um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) e foram

analisadas no modo DDA (aquisição dependente de dados). Os espectros de MS1 foram obtidos no analisador Orbitrap (resolução de 120.000 FWHM a 400 m / z) na faixa de 300-1650 m / z. Para cada espectro MS1, foram escolhidos, automaticamente, os 15 íons mais intensos e direcionados para a fragmentação de dissociação induzida por colisão (HCD) de alta energia. A fragmentação repetida do mesmo precursor foi evitada por exclusão dinâmica por 90 s. A configuração para HCD ocorre do seguinte modo: janela de isolamento 2,0 m / z, controle automático de ganho (AGC) de 5×10^6 , energia de colisão normalizada para 35% e o limite para a seleção de 3000.

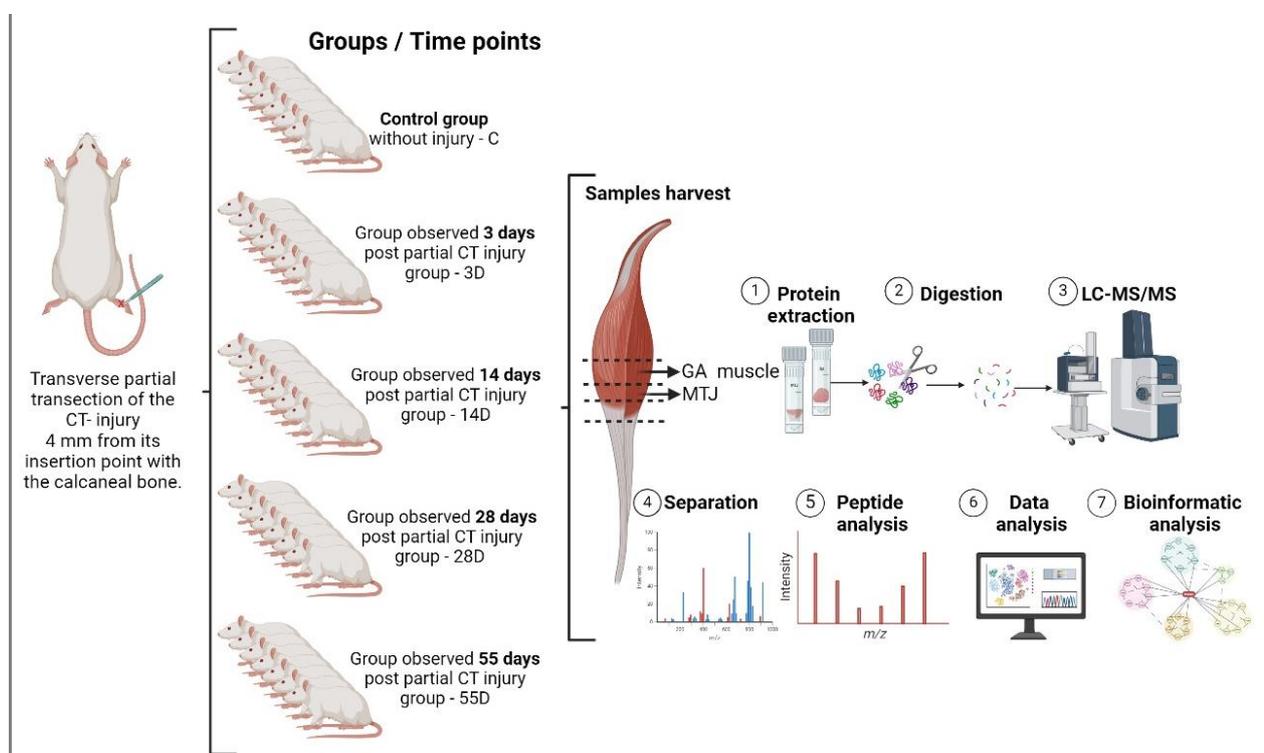


Figura 3. Figura representativa do delineamento experimental do estudo: Trinta ratos Wistar, com aproximadamente 2 meses de idade, com peso médio de 261 ± 15 g, foram utilizados. Eles foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: um grupo controle (3D) e 4 grupos representando diferentes dias após lesão parcial do tendão de Aquiles, a saber: grupo de 3 dias (3D), grupo de 14 dias (14D), grupo de 28 dias (28D) e grupo de 55 dias (55D). O delineamento experimental envolveu a coleta do GA e da JMT após os períodos designados. O GA e a JMT foram usados para análise proteômica. Identificação de peptídeos em uma abordagem shotgun de espectrometria de massa: (1) O extrato de proteína foi (2) digerido com tripsina ou outras proteases em peptídeos, que foram separados por (3) cromatografia líquida seguida por análise de espectrometria de massa em tandem. (4) Os peptídeos clivados e fracionados foram separados por cromatografia líquida de fase reversa e eletropulverizados como peptídeos ionizados no espectrômetro de massa em tandem. (5) As proteínas foram

então identificadas e quantificadas com base em peptídeos com sequências únicas usando (6) análise de dados e (7) software bioinformático.

4.4.5 PESQUISA EM BANCO DE DADOS E BIOINFORMÁTICA

A análise proteômica realizada utilizou metodologias complementares para quantificação e identificação de proteínas, aproveitando os avanços em espectrometria de massa e ferramentas bioinformáticas especializadas. Os espectros foram alinhados e os peptídeos quantificados no software Progenesis® QI para Proteômica v.1.0 (Nonlinear Dynamics), garantindo a confiabilidade nos dados por meio do alinhamento dos picos MS1 identificados nos cromatogramas, normalização e quantificação baseada no cromatograma de íons extraídos (XIC).

Posteriormente, a identificação das proteínas foi conduzida no software Peaks® 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc.), com sequências deduzidas a partir de informações de fragmentação. Os dados foram pesquisados em bases de dados renomadas, incluindo UniProt e SwissProt, com foco na taxonomia **Rattus spp.**. Esse diferencial trouxe maior robustez à análise, pois expandiu a abrangência da busca para além do banco restrito a **Rattus norvegicus**. Os parâmetros da pesquisa incluíram tolerância ao erro de massa precursora de 10 ppm, tolerância de fragmentos MS/MS de 0,05 Da e a inclusão de carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa, além de oxidação e desamidação de metionina como modificações variáveis.

A análise considerou clivagens trípticas com até dois locais perdidos por peptídeo e incluiu, como critério de validação, uma taxa de descoberta falsa (FDR) inferior a 1%. Além disso, foi exigida a presença de no mínimo dois peptídeos únicos por proteína para assegurar a qualidade da identificação. Os valores de área extraída dos picos de íons MS1 foram utilizados para calcular as intensidades proteicas, servindo de base para comparações quantitativas entre os grupos experimentais.

A integração dos dados qualitativos e quantitativos foi realizada no Progenesis® QI, permitindo uma análise abrangente e detalhada. Complementarmente, uma abordagem qualitativa foi conduzida no Peaks® 7.0, utilizando os mesmos parâmetros de busca, mas sem a restrição a eventos regulados, proporcionando uma visão mais ampla do perfil proteico.

Estatisticamente, as proteínas identificadas foram agrupadas pelo método **Fuzzy-c-mean**, conforme descrito por Schwämmle (2010). As diferenças significativas na abundância entre os grupos foram avaliadas por ANOVA ($p \leq 0,05$) no Progenesis, com um teste post-hoc

de Tukey realizado no RStudio para refinar os resultados. Além disso, a análise funcional foi aprofundada por meio de Gene Ontology, utilizando o ShinyGO (Ge et al., 2020), e as redes de interação foram visualizadas e analisadas no Cytoscape (Reimand et al., 2019).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE PROTEÔMICA DO MÚSCULO GASTROCÊMIO APÓS LESÃO TECIDUAL

A análise proteômica revelou 336 proteínas com abundância significativamente diferente entre as cinco condições. Posteriormente, um teste estatístico de Tukey foi conduzido para identificar os pares que diferem entre si. Uma análise comparativa foi realizada entre o CTRL e cada uma das outras condições (Figura 4). A comparação entre D55 e CTRL mostrou o maior número de proteínas reguladas (241 proteínas) seguida pela comparação entre D28 vs CTRL (226 proteínas). A comparação entre D14 vs CTRL mostrou o menor número de proteínas reguladas (116 proteínas) seguida por D3 vs CTRL (125 proteínas).

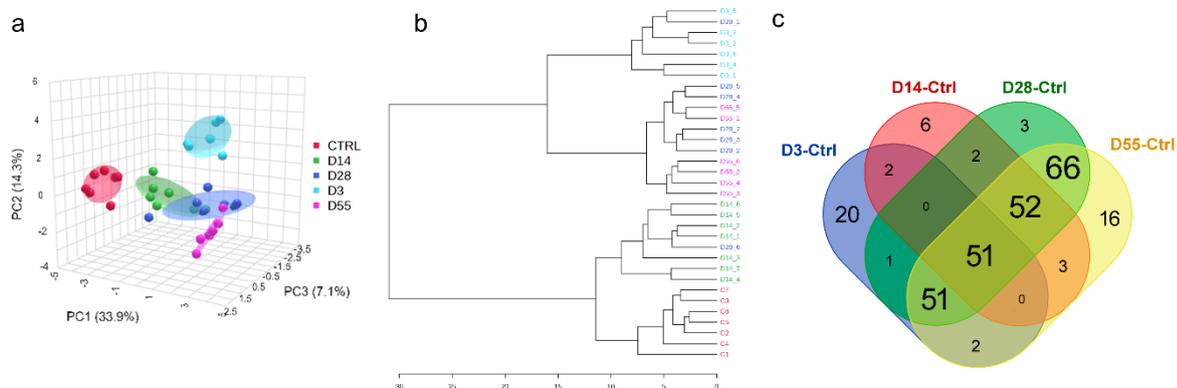


Figura 4. (a) Gráfico de análise de componentes principais (PCA) demonstrando a separação entre os grupos experimentais: controle (CTRL, vermelho) e os grupos pós-transecção aos 3 dias (D3, azul), 14 dias (D14, verde), 28 dias (D28, ciano) e 55 dias (D55, rosa). A análise foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar a similaridade entre os perfis proteômicos, evidenciando alterações temporais no processo de remodelação tecidual. (b) Dendrograma gerado por análise hierárquica de agrupamento (HCA) baseado na similaridade dos perfis proteômicos. A separação entre os grupos reflete mudanças progressivas e específicas associadas às fases do reparo tecidual. (c) Diagrama de Venn exibindo proteínas diferencialmente expressas em comparação ao grupo controle. O número de proteínas únicas e compartilhadas entre os grupos pós-transecção revela sobreposições e alterações específicas em diferentes estágios do processo de reparação.

As proteínas diferencialmente abundantes foram agrupadas em clusters e quatro clusters distintos foram gerados. O enriquecimento dos processos biológicos onde essas proteínas estão envolvidas foi apresentado em cada cluster (Figura 5). Em geral, é possível observar que no cluster 1, as proteínas nos grupos D3, D28 e D55 foram reguladas negativamente quando comparadas ao CTRL, enquanto D14 é semelhante ao CTRL. Além disso, os processos biológicos enriquecidos mais representados incluem o processo metabólico do ácido orgânico e o processo metabólico do ácido carboxílico. Todas as proteínas representadas no cluster 2 foram diminuídas quando comparadas ao controle, com os grupos D28 e D55 apresentando perfil semelhante. A análise de enriquecimento destacou processos biológicos como resposta a substâncias inorgânicas e estresse oxidativo (Figura 5).

No cluster 3, as proteínas dos grupos D3 foram aumentadas quando comparadas às outras condições (D14, D28 e D55). Além disso, D14, D28 e D55 apresentam um perfil proteico semelhante. Os processos biológicos mais representativos em termos de enriquecimento foram fibrinólise e resposta imune humoral. Finalmente, no cluster 4, as proteínas dos grupos D28 e D55 foram reguladas positivamente quando comparadas aos grupos CTRL, D3 e D14. Os processos biológicos mais enriquecidos foram associados à vasodilatação e à regulação do estresse oxidativo. A maioria das proteínas representadas em cada cluster apresenta uma diferença significativa entre duas ou mais condições, revelada pelo teste de Tukey.

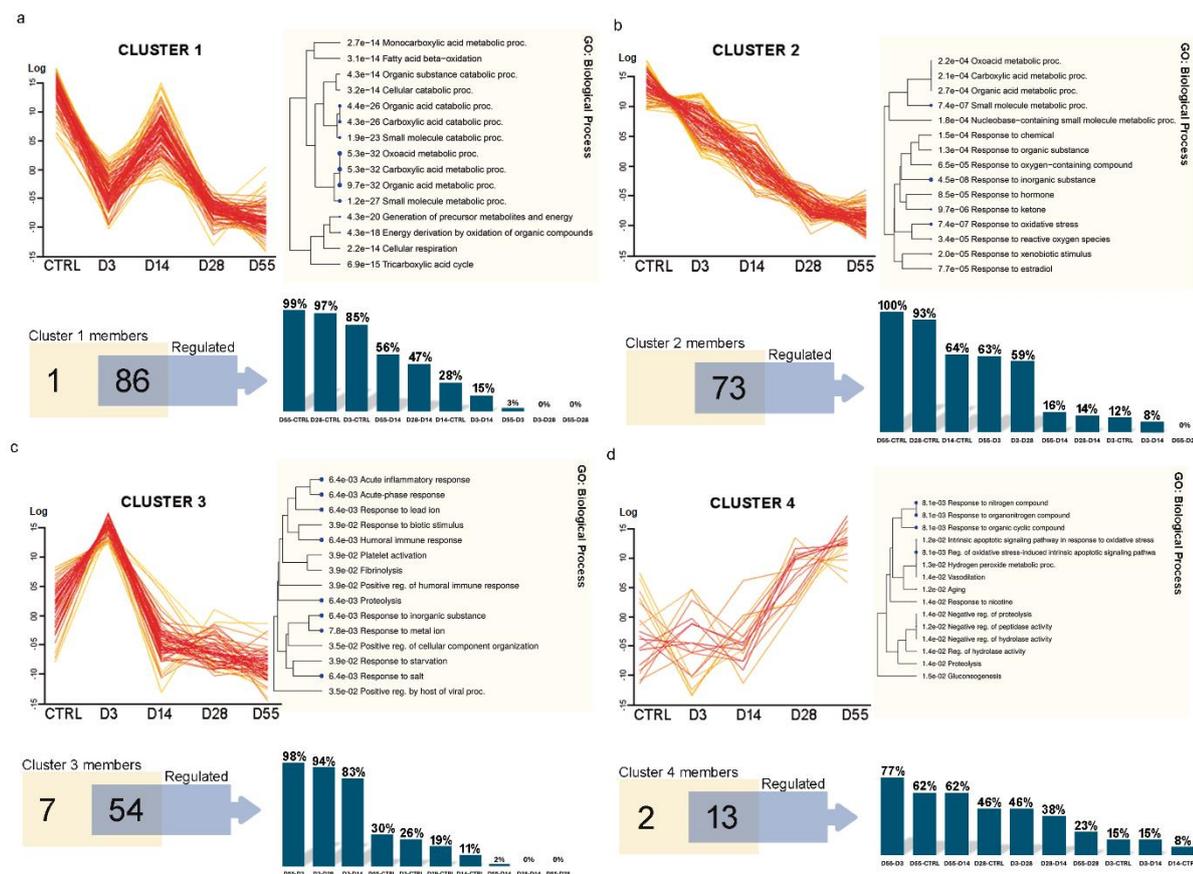


Figura 5 (a) Cluster 1: Representa proteínas diferencialmente expressas cuja regulação está associada a processos metabólicos, incluindo metabolismo de ácidos carboxílicos, beta-oxidação de ácidos graxos e ciclo do ácido tricarboxílico. As proteínas deste cluster apresentaram maior regulação nos primeiros estágios da recuperação (D3 e D14) com declínio gradual ao longo do tempo. (b) Cluster 2: Inclui proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo e resposta ao estresse oxidativo. Este cluster apresentou uma diminuição progressiva na expressão das proteínas ao longo do tempo pós-lesão, indicando uma resposta inicial robusta que reduz com a aproximação da homeostase. (c) Cluster 3: Representa proteínas envolvidas em respostas inflamatórias agudas, respostas imunes humorais e processos relacionados à ativação plaquetária e fibrose. O pico de regulação foi observado no período inicial (D3), com redução gradual da expressão nos estágios posteriores. (d) Cluster 4: Inclui proteínas associadas a processos adaptativos, como resposta a compostos orgânicos e metabólitos de nitrogênio. A regulação deste cluster foi mais evidente nas fases intermediárias (D14 e D28), sugerindo um papel central na reorganização e adaptação tecidual. O gráfico de barras mostra a porcentagem de proteínas reguladas em cada cluster e em cada comparação.

Os resultados dos três clusters são descritos na Figura 6, com o Cluster 1 mostrado na Figura 6a e o Cluster 2 nas Figuras 6b e 6c. As proteínas reguladas desses clusters foram analisadas posteriormente em redes usando o Cytoscape. No Cluster 1, a análise de enriquecimento funcional de cada subgrupo revelou que o maior grupo consistia em proteínas relacionadas ao processo metabólico oxoácido, com uma presença significativa de proteínas

associadas à atividade mitocondrial e oxidoredutase. Outros grupos relevantes incluíam aqueles envolvidos na diferenciação celular, disco Z, ligação de actina, processos de carboidratos celulares e atividade do glicogênio fosforilase. Clusters menores foram formados por proteínas que participam da beta-oxidação de ácidos graxos e da atividade do fator de alongamento da tradução. As proteínas reguladas do Cluster 1 indicam uma regulação negativa da atividade mitocondrial/oxidoredutase em 3, 28 e 55 dias após a lesão do tecido (Figura 6a). A análise de enriquecimento de proteínas do Cluster 2 mostrou grupos contendo proteínas envolvidas principalmente no processo metabólico do piruvato, regulação negativa da apoptose, homeostase redox e alongamento da tradução (Figura 6b). Redes menores apresentam proteínas relacionadas à atividade da desidrogenase, organização do citoesqueleto e inibidor da dissociação de GPD. Além disso, algumas proteínas estão localizadas no complexo do proteassoma e no complexo mitocondrial, conforme representado na Figura 4. Todos esses processos biológicos são reprimidos nos dias 3, 14, 28 e 55 quando comparados ao controle. Curiosamente, a análise das interações da rede de proteínas no Cluster 3 revelou um grupo maior com proteínas envolvidas na resposta inflamatória com função inibidora da endopeptidase, todas localizadas no espaço extracelular (Figura 6c). Outros grupos mostram proteínas relacionadas à ligação da actinina muscular e proteínas localizadas no retículo endoplasmático, complexo do proteassoma, complexo da troponina e fibra supramolecular. Vale mencionar que essas proteínas são reguladas positivamente no dia 3 e reguladas negativamente em outros estágios de lesão tecidual quando comparadas ao controle (Figura 6). A análise de enriquecimento das proteínas do Cluster 4 não foi possível devido ao número limitado de proteínas incluídas neste cluster.

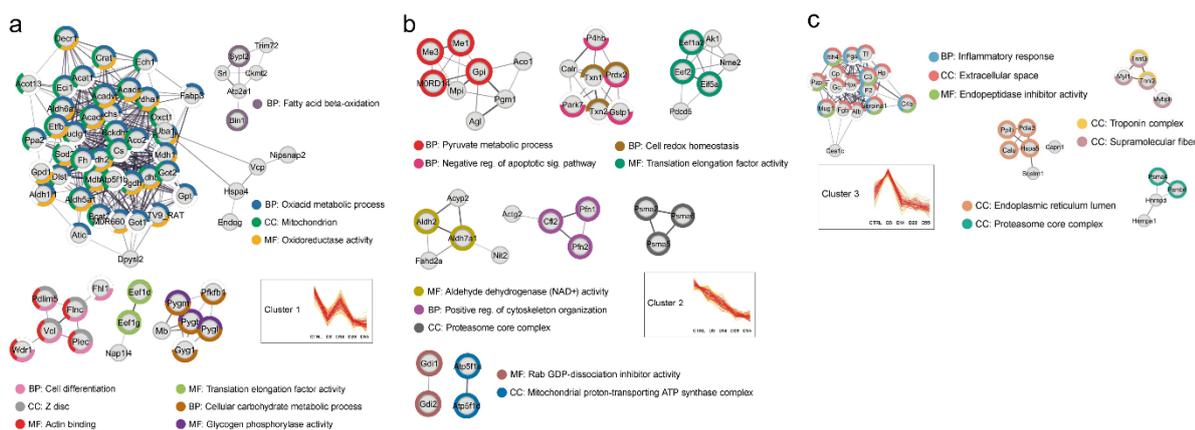


Figura 6. Redes de proteínas e análise de enriquecimento funcional de proteínas reguladas após lesão tecidual realizada no Cytoscape **(a) Cluster 1:** Processos biológicos (BP) e funções moleculares (MF) nos quais as proteínas estão envolvidas e componentes celulares (CC) nos quais as proteínas estão localizadas. Os principais grupos incluem processo metabólico oxoácido, atividade mitocondrial e oxidorreductase e diferenciação celular. **(b) Cluster 2:** Processos biológicos (BP) e funções moleculares (MF) nos quais as proteínas estão envolvidas e componentes celulares (CC) nos quais as proteínas estão localizadas. Os principais grupos incluem processo metabólico de piruvato, negativa da apoptose e homeostase redox. **(c) Cluster 3:** Processos biológicos (BP) e funções moleculares (MF) nos quais as proteínas estão envolvidas e componentes celulares (CC) nos quais as proteínas estão localizadas. Os principais grupos incluem resposta inflamatória, função inibidora da endopeptidase e espaço extracelular.

5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA DA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA APÓS LESÃO TECIDUAL

A análise estatística ANOVA aplicada aos resultados proteômicos revelou 242 proteínas diferencialmente abundantes nas cinco condições avaliadas. Posteriormente, o teste de Tukey foi conduzido para identificar os pares que diferem entre si. Uma análise comparativa foi realizada entre o controle e cada uma das outras condições (Figura 6). Semelhante à análise proteômica do gastrocnêmio, no tecido da junção miotendínea a maioria das proteínas está incluída na comparação D55 vs ctrl (113) seguido por D28 vs ctrl (85). Na comparação D14 vs ctrl mostrou o menor número de proteínas reguladas (18 proteínas) seguido por D3 vs ctrl (28 proteínas).

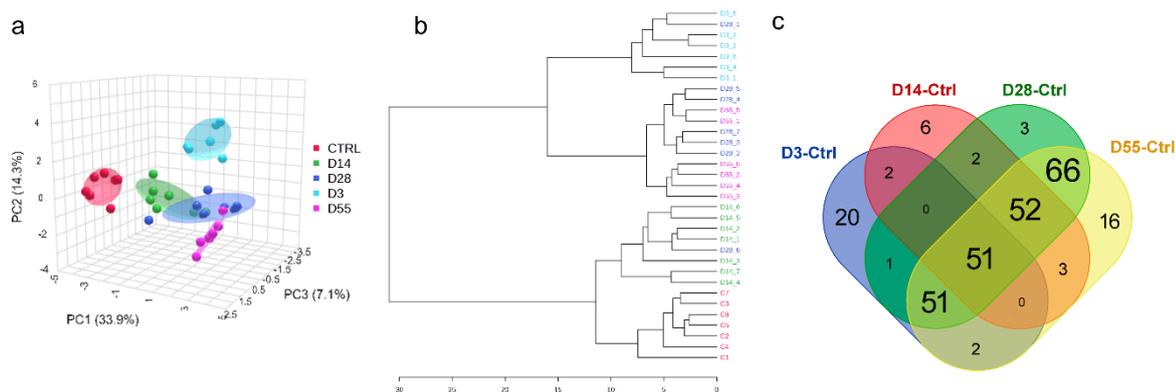


Figura 7. (a) Gráfico de análise de componentes principais (PCA) demonstrando a separação entre os grupos experimentais da JMT: controle (CTRL, vermelho) e os grupos pós-lesão aos 3 dias (D3, azul), 14 dias (D14, verde), 28 dias (D28, ciano) e 55 dias (D55, rosa). A análise foi realizada utilizando os componentes principais para avaliar a similaridade entre os perfis proteômicos, evidenciando alterações temporais associadas às diferentes fases do processo de reparação tecidual. A análise foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar a similaridade entre os perfis proteômicos, evidenciando alterações temporais no processo de remodelação tecidual. (b) Dendrograma gerado por análise hierárquica de agrupamento (HCA) baseado na similaridade dos perfis proteômicos. Os grupos foram agrupados de acordo com suas assinaturas moleculares, refletindo mudanças progressivas e específicas durante as fases do reparo tecidual. (c) Diagrama de Venn exibindo proteínas diferencialmente expressas em comparação ao grupo controle. O número de proteínas únicas e compartilhadas entre os grupos experimentais (D3, D14, D28, D55) destaca sobreposições e alterações moleculares específicas ao longo do processo de recuperação e remodelação dos tecidos afetados..

Visão geral dos clusters gerados, proteínas dos clusters 1 mostraram-se reguladas positivamente no D55 quando comparadas ao controle e as outras condições e proteínas dos clusters 2 e 3 mostraram-se reguladas positivamente no D28 quando comparadas ao controle, D3 e D14 (Figura 7). Curiosamente, os processos biológicos mais representativos enriquecidos no cluster 2 foram a organização das fibrilas de colágeno e o desenvolvimento do tecido. No cluster 4 é possível observar que as proteínas foram reguladas negativamente no D3, D14, D28 e D55 (todos os dias após a lesão do tecido) quando comparadas ao controle. Os processos biológicos mais representativos foram o ciclo do citrato e o metabolismo do carbono (Figura 9). No cluster 5 (semelhante ao cluster 3 das análises do tecido gastrocnêmio), as proteínas são aumentadas no D3 quando comparadas ao controle e às outras condições.

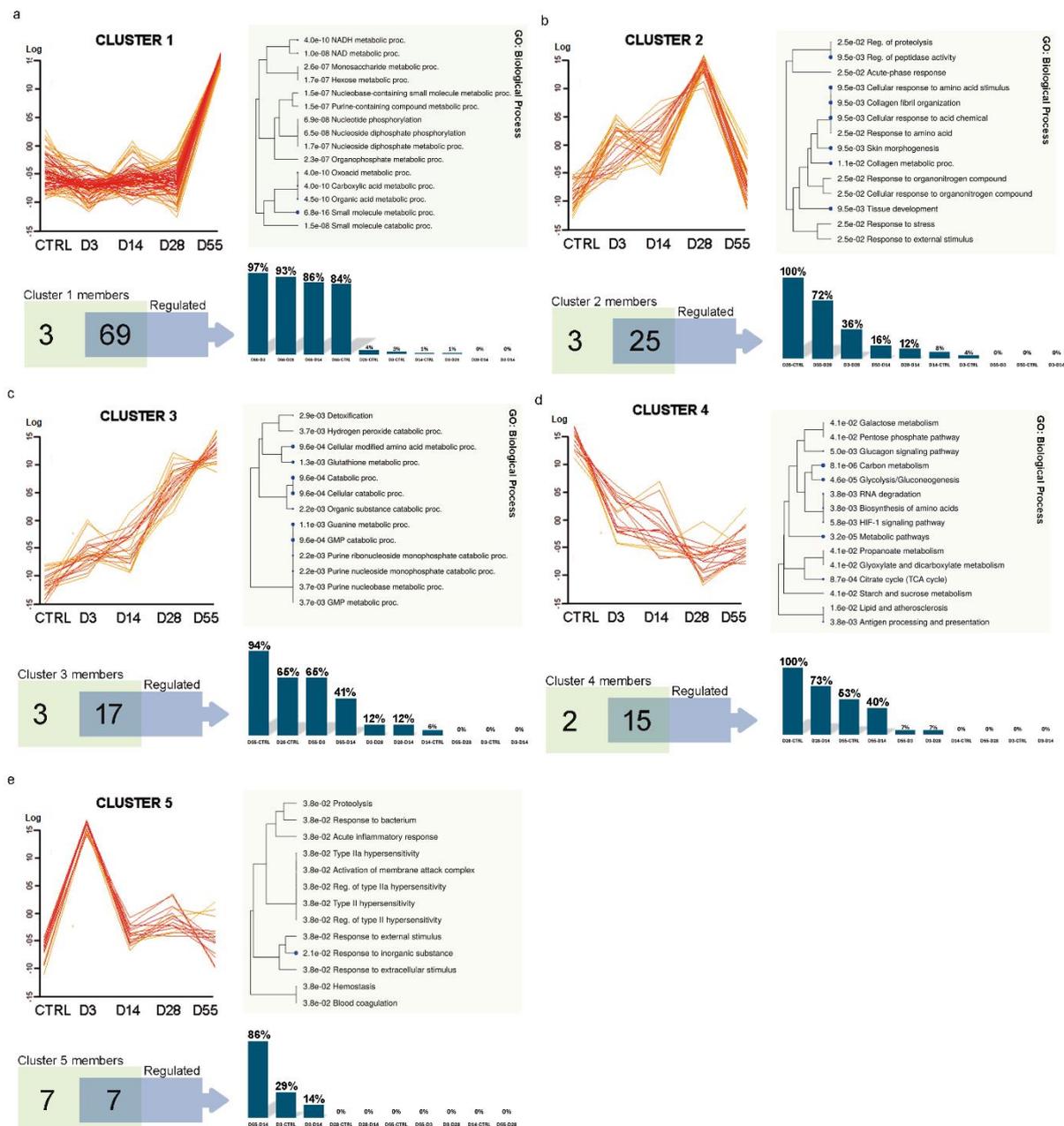


Figura 8. a) Cluster 1: Representa proteínas diferencialmente expressas associadas a processos metabólicos nucleotídicos, incluindo metabolismo de NAD, metabolismo mitocondrial e respiração celular. A regulação das proteínas nesse cluster aumenta progressivamente ao longo do tempo, alcançando o pico na fase final (D55), indicando sua relevância em processos energéticos e biossintéticos durante a regeneração tecidual. (b) Cluster 2: Inclui proteínas relacionadas à regulação da proteólise, organização da matriz extracelular e estímulos externos. Este cluster exibe um pico de regulação na fase intermediária (D14), sugerindo sua associação com a remodelação e reorganização estrutural durante a recuperação. (c) Cluster 3: Agrupa proteínas envolvidas em detoxificação, metabolismo de nucleotídeos de purina e processos relacionados ao estresse oxidativo. As

proteínas deste cluster apresentam aumento gradual de regulação, com destaque para os períodos intermediários e finais (D28 e D55), refletindo sua contribuição no reparo e proteção contra danos celulares. (d) Cluster 4: Inclui proteínas ligadas ao metabolismo de galactose, ciclo do ácido tricarboxílico e vias imunológicas, como apresentação de antígenos. Este cluster é caracterizado por uma diminuição na regulação ao longo do tempo, indicando uma resposta inicial que se atenua com a progressão para a homeostase. (e) Cluster 5: Abrange proteínas relacionadas à resposta inflamatória aguda, resposta a estímulos bacterianos e coagulação sanguínea. O pico de regulação foi observado em D3, refletindo a ativação imediata de processos imunológicos e hemostáticos após a lesão, com redução progressiva nos períodos subsequentes. O gráfico de barras mostra a porcentagem de proteínas reguladas em cada comparação

As proteínas reguladas dos clusters foram analisadas posteriormente em redes usando Cytoscape. De acordo com a análise de enriquecimento, as proteínas reguladas no cluster 1 estão envolvidas principalmente com os processos biológicos de fosforilação de difosfato de nucleosídeo e o processo metabólico do ácido carboxílico (Figura 9a). As proteínas do cluster 2 estão envolvidas na resposta de fase aguda, organização de fibrilas de colágeno e algumas dessas proteínas estão localizadas no espaço extracelular (Figura 9b). As redes de interação no cluster 3 apresentam um pequeno grupo de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e ao processo metabólico da glutatona, além de um grupo menor com proteínas relacionadas ao processo catabólico do GMP (Figura 9c). No cluster 4, as proteínas estão envolvidas na resposta ao calor e à succinilação de histonas (Figura 9d). Curiosamente, a rede de interação do cluster 5 revela proteínas relacionadas à resposta imune (Figura 9e).

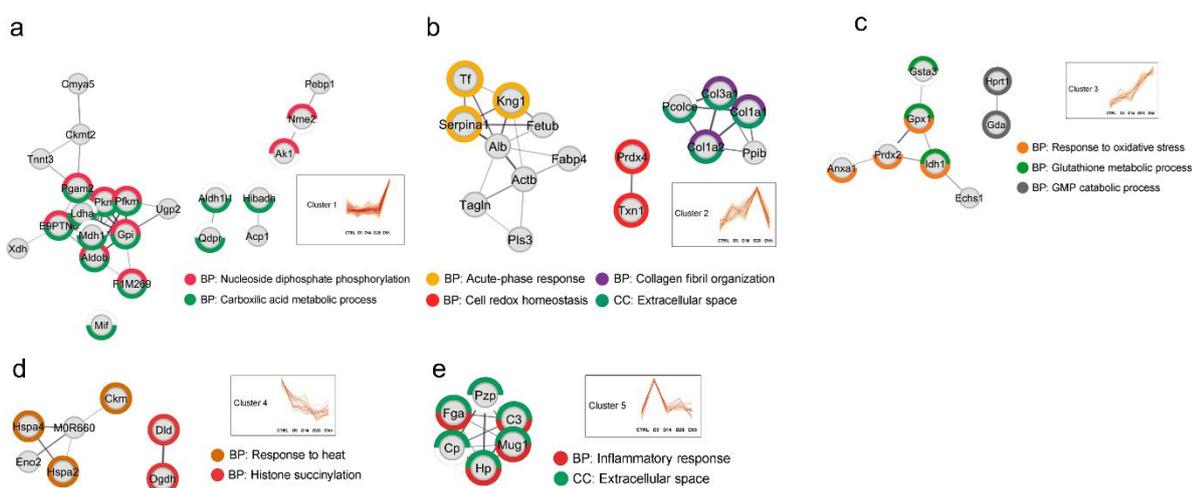


Figura 9. **Clusters de produtos gênicos e suas relações funcionais em vias biológicas.** (a) **Cluster 1:** envolve produtos gênicos principalmente em processos metabólicos, com papéis significativos no metabolismo do ácido carboxílico e na fosforilação do difosfato de nucleosídeo. (b) **Cluster 2:** inclui produtos gênicos associados à homeostase redox celular, resposta de fase aguda e organização de fibrilas de colágeno. (c) **Cluster 3:** concentra-

se em respostas ao estresse e processos metabólicos, incluindo metabolismo da glutatona e resposta ao estresse oxidativo. **(d) Cluster 4:** contém produtos gênicos relacionados à resposta ao calor e à succinilação da histona. **(e) Cluster 5:** envolve produtos gênicos na resposta inflamatória e no espaço extracelular. Cada cluster apresenta um gráfico de linhas mostrando a expressão/atividade gênica ao longo do tempo (CTRL, Dia 1, Dia 3, Dia 28, Dia 55).

Uma análise de rede de interação foi realizada com todas as proteínas de todos os clusters das análises de tecido da junção miotendínea (Figura 13). Três grupos foram gerados, um grupo maior com proteínas dos 5 clusters, algumas dessas proteínas relacionadas à geração de metabólitos precursores e energia. Um pequeno grupo com proteínas dos clusters 1, 2 e 5, com proteínas relacionadas à resposta inflamatória; e um grupo menor com proteínas dos clusters 1, 3 e 4 com proteínas envolvidas na contração do músculo esquelético localizadas na miofibrila.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a dinâmica temporal do comportamento do músculo e da JMT após lesão parcial do tendão calcâneo. Por meio de uma análise proteômica direcionada, foram identificados grupos de proteínas reguladas diferencialmente, cada um associado a diferentes fases da adaptação das estruturas musculares à lesão do tendão adjacente. Uma análise realizada na região miotendinosa do GA e JMT revelou compreensões significativas sobre a dinâmica temporal dos processos biológicos envolvidos na recuperação muscular e tecidual. Com 336 proteínas identificadas no GA e 242 no JMT, variações na abundância de proteínas foram observadas em diferentes períodos pós-lesão (dias 3, 14, 28 e 55). Essas descobertas revelaram a complexidade da resposta coordenada das estruturas adjacentes à lesão, mas também a extraordinária capacidade adaptativa dos tecidos, destacando o papel central das vias metabólicas, inflamatórias e estruturais. Nesse contexto, o presente estudo se mostra essencial para entender como essas estruturas podem coordenar uma resposta multifacetada à instrução, reforçando a importância de mecanismos de reparo integrados para garantir a recuperação funcional.

6.1 PERÍODO DE 3 DIAS (3D): ATIVAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO

No terceiro dia após a lesão, tanto no músculo gastrocnêmio quanto na JMT, proteínas associadas à resposta imune, estresse oxidativo e tensão celular foram significativamente

reguladas. A maioria dessas proteínas pertence ao Cluster 3 e Cluster 5, caracterizados pela predominância de proteínas localizadas no espaço extracelular, associadas a processos inflamatórios, como a resposta imune humoral e a atividade de inibidores de endopeptidase. Isso sugere que as vias moleculares envolvidas na defesa tecidual estão ativas, em sincronia com o início do reparo muscular.

6.1.1 MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Foi observado um aumento significativo de proteínas associadas à resposta inflamatória e ao estresse oxidativo no GA. Dentre as diversas proteínas que apresentaram alterações neste momento, observou-se um enriquecimento significativo de *Serpina1* e *C4b*. *Serpina1*, que codifica alfa-1 antitripsina (AAT), é reconhecida como uma proteína de fase aguda, cuja síntese aumentada precede processos inflamatórios (Brantly et al., 1991; Kokturk et al., 2023). Este aumento é crucial para a inibição de proteases, como a elastase, que, se não forem adequadamente reguladas, podem gerar danos significativos ao tecido alvo (Thun et al., 2013; L. Y. Zhang et al., 2022). Simultaneamente, foi observado um aumento da expressão de *C4b*, um componente do sistema complemento, indicando a possível ativação do sistema imune, que em outros contextos se torna fundamental na defesa contra patógenos e na modulação da resposta inflamatória (Lujan et al., 2024; Markiewski & Lambris, 2007).

Embora haja um estudo recente que demonstrou que o complemento *C4b* desempenha um papel crucial na regeneração do músculo esquelético, especialmente em contextos de envelhecimento (Wang et al., 2023). Ao olhar para o objetivo deste estudo, há uma enorme escassez de estudos que correlacionem esses dois genes (*Serpentina-1* e *C4b*) na homeostase muscular. O aumento de *Serpina1* provavelmente está relacionado ao seu papel primário como inibidor de protease. (Wang et al., 2023). Portanto, levanta a hipótese de que ele poderia desempenhar um papel crucial na resposta inflamatória nos primeiros dias após lesão parcial de TC, para limitar a degradação excessiva do tecido muscular. Portanto, a proteção da elastase é particularmente relevante para a preservação da MEC, uma vez que a redução dessa atividade proteolítica poderia contribuir para a manutenção da elastina, estabilizando a estrutura do tecido durante o processo de recuperação (Wågsäter et al., 2012). Essa relação ainda é pouco explorada no contexto do músculo esquelético e pode fornecer percepções importantes sobre os mecanismos de recuperação muscular e potencialmente informar estratégias terapêuticas em condições inflamatórias crônicas.

Outra proteína que foi regulada positivamente nessa fase é a haptoglobina (Hp), cuja principal função é se ligar à hemoglobina livre, dada essa ligação, ela pode desempenhar o papel de limitar a liberação de ferro e, conseqüentemente, a formação de radicais livres, o que poderia agravar o dano oxidativo em ambientes inflamatórios (Murphy et al., 2017). No contexto do presente estudo, onde a lesão do tendão possivelmente altera a homeostase do GA, o ajuste positivo da Hp pode indicar um esforço do músculo para proteger suas fibras contra o estresse oxidativo e preservar a integridade do tecido (Fortunato & Ferlini, 2023). Estudos de Bertaggia et al. (2014) mostram que sem a haptoglobina, os camundongos são mais propensos à perda muscular e fraqueza sob estresse oxidativo. Em camundongos deficientes em haptoglobina, os músculos sofrem aumento da degradação e atrofia de proteínas devido à ativação excessiva de vias catabólicas como os sistemas ubiquitina-proteassoma e autofagia-lisossoma (Bertaggia et al., 2014).

Esses camundongos também demonstraram redução da força muscular e maior perda de massa muscular quando expostos a estressores, como exercícios físicos ou dieta rica em gordura, que intensificam o estresse oxidativo. Portanto, ele não apenas atua para neutralizar a hemoglobina livre e proteger contra danos oxidativos, mas também parece desempenhar um papel preventivo na ativação de vias de atrofia muscular (Bertaggia et al., 2014).

Outro enriquecimento importante a ser destacado é o dos genes *Fga* (Fibrinogênio alfa) e *Fgb* (Fibrinogênio beta), que desempenham papéis cruciais na cicatrização muscular. O fibrinogênio é uma proteína multifuncional que não só atua na coagulação sanguínea formando uma rede de fibrina, mas também atua como mediador na modulação da resposta inflamatória e na organização da matriz extracelular, o que é essencial para a remoção da fibrina acumulada e a criação de um ambiente adequado para o crescimento (Fuoco et al., 2012; Mancilla et al., 2023). Esse enriquecimento está em linha com os resultados de um estudo posterior realizado por Assis et al. (2024), que destacou, por meio da análise da expressão gênica, o aumento do mRNA de genes como o colágeno tipo III (*Col3a1*), fator de crescimento conectivo (*Ctgf*) e fator de crescimento endotelial vascular (*Vegf*) neste mesmo modelo experimental e momentos (Assis, 2024). O aumento da expressão desses genes e o enriquecimento de *Fga* e *Fgb* são significativos, pois contribuem para a formação de uma rede de fibrina essencial para a cicatrização precoce. (Brisson et al., 2022; Kjær, 2004). Além disso, eles poderiam facilitar a deposição de colágeno e a organização da matriz extracelular (Fuoco et al., 2012; Mancilla et al., 2023), enquanto *Ctgf*, *Vegf* e *Col3a1* desempenham papéis

fundamentais no suporte mecânico da contração muscular e na regulação da diferenciação celular em resposta à lesão. Essas proteínas não apenas contribuem para a integridade estrutural do tecido, mas também promovem a angiogênese e a proliferação celular, processos essenciais para a regeneração tecidual eficaz. Assim, a sinergia entre esses componentes revela uma rede complexa de interações para a recuperação tecidual, apontando para novas estratégias terapêuticas que poderiam ser desenvolvidas para otimizar a cicatrização em contextos musculares (Arsic et al., 2004; Haase et al., 2024; Kjær, 2004).

6.1.2 JUNÇÃO MIOTENDÍNEA

Em relação à JMT três dias após a lesão (representada principalmente pelo Cluster 5), sugere um estresse oxidativo ainda mais pronunciado, o que poderia ser explicado pela proximidade da lesão ao tendão calcâneo (Kjaer, 2004). Essa resposta biológica multifacetada busca não apenas reparar o tecido danificado, mas provavelmente teve como objetivo proteger contra danos adicionais, conforme corroborado por estudos recentes sobre lesões musculoesqueléticas (Álvarez Hernández & de la Mata Llord, 2022; Brzoska et al., 2011; Hart & Nakamura, 2022; Kjær, 2004; Motejunas et al., 2021; X. Zhang et al., 2021). O aumento de Fga, bem como o enriquecimento em GA, está diretamente relacionado à formação de fibrina, essencial para estabilizar o microambiente da lesão e fornecer uma matriz provisória que facilita a infiltração de células de reparo, como fibroblastos e macrófagos (Cole et al., 2021; Li et al., 2022).

Esses processos são necessários nos estágios iniciais de reparo e remodelação tecidual, especialmente em interfaces sujeitas a tensão mecânica contínua, como a JMT (Gaffney et al., 2023; Sensini et al., 2021). A ativação do C3 (Complement Component 3), parte do sistema complemento, demonstra uma forte resposta inflamatória. O sistema C3 é essencial para o recrutamento de células imunes, como neutrófilos e macrófagos, que fagocitam restos celulares e preparam o tecido para regeneração (Geisbrecht et al., 2022; Zarantonello et al., 2023). Além disso, o C3 também pode interagir com o Fga em outros contextos (Pechlivani et al., 2021), uma vez que a ligação do C3 à fibrina não apenas estabiliza um coágulo e promove a ativação de células imunes e a liberação de mediadores inflamatórios, cruciais para o reparo do tecido (Howes et al., 2012). Essa interação hipotética entre FGA e C3 poderia modular a resposta inflamatória, promovendo um microambiente que melhora a regeneração do tecido. Essa modulação provavelmente facilita a sinalização celular e o recrutamento de células-tronco mesenquimais, otimizando o reparo e a resiliência estrutural do local lesionado.

Assim, o perfil proteômico observado na JMT três dias após a lesão parcial do TC sugere uma resposta coordenada entre diferentes vias moleculares, com o objetivo de amenizar os efeitos do estresse oxidativo exacerbado e facilitar a regeneração tecidual. O enriquecimento de proteínas como Fga e C3 destaca não apenas a importância da estabilização do ambiente lesionado por meio da formação de fibrina e ativação do sistema complemento, mas também sugere um potencial interação entre esses mecanismos (Pechlivani et al., 2021), para otimizar a cicatrização e minimizar a disseminação da inflamação. A coordenação dessas vias moleculares, evidenciada pela presença de outros genes como CP (Ceruloplasmina), Mug1 (Muramidase), PZP (Pregnancy Zone Protein) e Hp, pode refletir uma resposta regenerativa robusta que busca equilibrar os processos de inflamação e proteção antioxidante, criando um ambiente favorável à infiltração de células-tronco e remodelação da matriz extracelular (Bertaglia et al., 2014; Calve et al., 2020; Chalise et al., 2022; Murphy et al., 2017; Sánchez et al., 2001). Essa complexa sinergia molecular parece ser essencial para garantir a integridade da JMT e restaurar a função musculoesquelética. Essa resposta adaptativa visa proteger contra danos futuros, ao mesmo tempo em que permite a regeneração estrutural e funcional da interface músculo-tendão.

6.2 PERÍODO DE 14 DIAS (14D): ADAPTAÇÃO METABÓLICA E OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Nos 14 dias após a lesão do TC, o perfil proteômico do GA e JMT revela uma importante fase de transição, caracterizada principalmente por alterações no metabolismo energético e possível reorganização e estabilização estrutural. Esta fase é marcada pela diminuição da intensidade dos processos inflamatórios iniciais e pelo aumento das vias relacionadas à recuperação metabólica e remodelação tecidual. Os clusters mais representativos neste período são Cluster 1 e Cluster 2 no GA, e Cluster 2 e Cluster 4 no JMT. Esses clusters incluem proteínas que desempenham papéis cruciais no metabolismo energético, organização citoesquelética e remodelação da MEC evidenciando a adaptação do músculo e tendão em resposta à lesão.

6.2.1 MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Neste ponto de tempo, o principal enriquecimento envolveu proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos, metabolismo de glicogênio, função mitocondrial e adesão celular,

indicando que o GA está mobilizando recursos para regeneração, produção de energia e reorganização estrutural para restaurar a função contrátil. O enriquecimento do gene Crat (Carnitina O-acetiltransferase), que desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico, sugere uma demanda aumentada por oxidação de ácidos graxos no músculo afetado por lesão de tendão. Esta enzima facilita a transferência de grupos acila para as mitocôndrias, apoiando a beta-oxidação, uma via vital de produção de energia no músculo esquelético (Laera et al., 2020; Mancilla et al., 2023). Embora não existam estudos específicos que correlacionem diretamente esta alteração, esta pode ser uma estratégia bioenergética eficiente, uma vez que os ácidos graxos fornecem mais ATP por molécula oxidada em comparação aos carboidratos em geral (Muio et al., 2012; Noland et al., 2009). Além disso, é essencial para o transporte de grupos acila para as mitocôndrias, facilitando a beta-oxidação e, conseqüentemente, fornecendo ao músculo energia suficiente para sustentar o processo de restauração de sua funcionalidade (Kuang et al., 2021; Suarez-Berumen et al., 2021).

Outra proteína-chave observada no enriquecimento é a Aco2 (Aconitase 2), uma enzima do ciclo do ácido cítrico que converte citrato em isocitrato (Yan Chen, 2020). A Aco2 é essencial para a continuidade do ciclo de Krebs, o que permite a produção de NADH e FADH₂, necessários para a geração de ATP por meio da fosforilação oxidativa. Além disso, um aumento na abundância de Aco2 pode indicar uma intensificação da respiração mitocondrial no músculo após um possível período de inflamação e instabilidade, sugerindo que a regeneração muscular é fortemente dependente da capacidade oxidativa mitocondrial para atender às necessidades energéticas aumentadas durante esse processo (Ehrlich et al., 2021; H. Zhang et al., 2022). Citrato sintase (CS), como enzima inicial do ciclo do ácido cítrico, também desempenha um papel crucial na manutenção da eficiência do metabolismo aeróbico, ajudando a gerar intermediários necessários para a biossíntese e regeneração dos tecidos (Edwards et al., 2021).

A elevação da Oxaloacetato-CoA transferase1 (Oxct1), envolvida no metabolismo de corpos cetônicos, sugere que o músculo usa corpos cetônicos como uma fonte de energia alternativa durante a regeneração. (Cui et al., 2024) após uma lesão, a disponibilidade reduzida de glicose pode mudar o metabolismo para a mobilização de ácidos graxos e utilização de cetonas, estratégias bioenergéticas eficientes apoiadas pela literatura (Al Batran et al., 2020; Puchalska & Crawford, 2017).

Nesta fase de recuperação, as proteínas relacionadas ao metabolismo do glicogênio, como a glicogênio fosforilase muscular (Pygm) e a glicogênio fosforilase hepática (Pygl), destacam a necessidade de glicose rápida a partir do glicogênio. (Arends et al., 2022; Migocka-Patrzałek & Elias, 2021).. Enquanto a glicogenólise pode diminuir após 14 dias, à medida que o músculo muda para a beta-oxidação e o uso de cetona, Pygl sugere uma adaptação em que as enzimas hepáticas auxiliam o metabolismo muscular durante a lesão (Arends et al., 2022).

No contexto da recuperação estrutural, o enriquecimento de Vinculina (Vcl) é uma chave para a estabilização das aderências célula-matriz, essencial para a recuperação muscular após lesão (H. Zhang et al., 2022). Após 14 dias de lesão do tendão de Aquiles, a Vcl suporta a reorganização das fibras musculares e a integridade mecânica à medida que o músculo recupera a função (H. Zhang et al., 2022). No entanto, apesar de sua relevância, os estudos sobre Vcl no músculo esquelético ainda são limitados, uma vez que a maioria dos estudos existentes se concentra no tecido muscular liso, tecido muscular cardíaco ou aspectos embrionários do tecido muscular (Shen et al., 2019; Tangney et al., 2013), e há uma falta de pesquisas investigando o papel desta proteína especificamente em contextos de lesão e regeneração no músculo esquelético. Portanto, mais estudos são necessários para compreender completamente a importância da Vcl na recuperação muscular pós-lesão e seu impacto na remodelação da matriz extracelular durante o processo de remodelação. Nessa perspectiva, o perfil proteômico do GA revelou uma resposta coordenada entre metabolismo energético, estrutura e funcionalidade (Shen et al., 2019; Tangney et al., 2013). Em resumo, após 14 dias de lesão, o músculo não apenas regenerou suas fibras, mas também se preparou para retomar sua função contrátil e motora de forma eficiente, garantindo que o movimento e a força sejam restabelecidos de forma coordenada e integrada.

6.2.2 JUNÇÃO MIOTENDÍNEA

A análise proteômica da junção do tendão subjacente ao tendão lesionado 14 dias após a lesão revelou um enriquecimento significativo de várias proteínas, refletindo a complexa resposta regenerativa e adaptativa desse tecido. Entre as proteínas destacadas, Serpina1, Colla1, Col2a1, Hspa4, Hsp2, Prdx4 e Txn1 apresentaram expressões alteradas que merecem uma discussão aprofundada.

O aumento de Serpina1 nos três primeiros dias após a lesão foi observado no GA, enquanto sua elevação na JMT ocorreu somente após 14 dias, o que pode ser justificado pela possível necessidade de adaptação contínua e proteção tecidual. A resposta inflamatória inicial parece ser crucial para a cicatrização, e a presença elevada de Serpina-1 no músculo sugere um papel significativo na regulação da inflamação e na proteção contra a degradação proteica (Thun et al., 2013; L. Y. Zhang et al., 2022). No entanto, a persistência de Serpina1 na junção do tendão mesmo após esse período indica que a proteína continua a desempenhar funções essenciais além da fase aguda da resposta inflamatória. Considerando que a JMT tem um microambiente distinto em comparação ao músculo, a proteção contínua para manter sua integridade estrutural e funcional deve ser considerada (Jacobson et al., 2020). Essa singularidade torna a JMT especialmente vulnerável a danos e compromete sua funcionalidade (Jacobson et al., 2020), e o aumento de Serpina1 11 dias após o momento de maior enriquecimento no GA sugere que ela desempenha um papel vital na modulação da resposta inflamatória, ajudando a prevenir maiores danos, apoiando ainda mais a remodelação dessa estrutura. No entanto, há uma lacuna significativa na literatura quanto à avaliação específica de Serpina1 nesse contexto. Uma vez que a maioria dos estudos se concentra no papel dessa proteína em outros tecidos, como pulmões, ossos e vasos sanguíneos, e não investiga profundamente sua função na junção do tendão (Dai et al., 2003; Ishida et al., 2021; Torriglia et al., 2017).

O enriquecimento de colágenos, especificamente colágeno tipo I (Col1a1), colágeno tipo II (Col2a1) e colágeno tipo III (Col3a1) são componentes estruturais essenciais da matriz extracelular (Jakobsen et al., 2017; Kjær, 2004; Nikolov & Popovski, 2022). Col1a1 fornece força e suporte estrutural e serve como um marcador potencial para a interface músculo-tendão, crucial para a cura e restauração das propriedades mecânicas da JMT (Calve et al., 2020). Col3a1 é mais expresso durante as fases iniciais da cura e em processos inflamatórios, desempenhando um papel fundamental na formação do tecido cicatricial ao fornecer flexibilidade e suporte temporário (Kjær, 2004).

Além do enriquecimento de colágenos e Serpina1, outras proteínas significativas na análise proteômica da JMT incluem Prdx4 e Txn1, ambas relacionadas ao equilíbrio redox. Embora nenhum estudo relacione diretamente o aumento da expressão de peroxirredoxina 4 (Prdx4) na JMT após lesão, essa proteína antioxidante é crucial para proteger contra o estresse oxidativo, que aumenta em tecidos lesionados devido à inflamação (Rhee, 2016). O

enriquecimento após 14 dias, em vez da fase aguda, sugere que, à medida que o processo de cicatrização avança, a demanda por proteção contra o estresse oxidativo aumenta, estimulando maior expressão de Prdx4 para neutralizar os radicais livres gerados durante a regeneração do tecido. O Rhee & Woo, 2011; Veal et al., 2018) enriquecimento da tioredoxina 1 (Txn1) apoia ainda mais a ideia de que as células na JMT respondem ativamente ao estresse oxidativo, trabalhando para restaurar o equilíbrio redox e facilitar a remodelação do tecido para melhorar o processo de cicatrização. A Txn1 também desempenha um papel na manutenção da homeostase do estresse oxidativo.

6.3 PERÍODO DE 28 DIAS (28D): FASE DE RECUPERAÇÃO E REGULAÇÃO METABÓLICA

Nos 28 dias após a lesão de TC, o perfil proteômico da JMT revela uma importante fase de recuperação, caracterizada principalmente por alterações na regulação da resposta inflamatória e uma possível reorganização e estabilização estrutural. Os clusters mais representativos neste período são o Cluster 2 e o Cluster 3 para GA, que incluem proteínas que desempenham papéis cruciais na regulação da resposta inflamatória, síntese de colágeno e remodelação da ECM, evidenciando a adaptação do tendão em resposta à lesão.

6.3.1 MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Ao observar os resultados obtidos para os 28 dias após a lesão parcial do tendão, nota-se uma redução na expressão de proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos e à resposta inflamatória. Isso sugere que o músculo gastrocnêmio está retornando a um estado de homeostase e que a lesão está sendo reparada. Durante esse intervalo, nota-se uma diminuição acentuada de proteínas associadas à oxidação de ácidos graxos, metabolismo do glicogênio e função mitocondrial. Essa regulação negativa de proteínas envolvidas na mobilização de recursos energéticos indica que o GA passa a priorizar a homeostase energética, em vez da intensa regeneração observada nos primeiros 14 dias após a lesão. Nesse período inicial, observou-se um aumento na expressão de proteínas ligadas à oxidação de ácidos graxos, como a Crat, indicando que o músculo estava utilizando fontes alternativas de energia para manter a homeostase celular (Laera et al., 2020; Mancilla et al., 2023). Além disso, a expressão de Aco2 foi aumentada, essencial para a produção de NADH e FADH₂ durante a oxidação de ácidos graxos (Y. Chen et al., 2020). Entretanto, 28 dias após uma lesão parcial do tendão, a expressão de Crat e Aco2 foi reduzida, sugerindo que o músculo não mais

necessitava de fontes alternativas de energia para manter a homeostase celular. Além disso, a expressão de Pygm e Pygl foi reduzida, o que é essencial para a manutenção da homeostase celular (Arends et al., 2022; Migocka-Patrzalek & Elias, 2021).

Uma possível explicação para a diminuição do enriquecimento de proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos é a necessidade reduzida de energia para manter a homeostase celular. Durante a lesão parcial do tendão, o músculo pode ter exigido fontes alternativas de energia para manter a homeostase celular, mas após 28 dias, a lesão pode ter sido reparada e a necessidade de energia pode ter diminuído (Liyang Zhao, 2019; Yong-Soo Lee, 2019). Outra possível explicação é a redução da inflamação no músculo. A inflamação é um processo natural que ocorre após a lesão, mas pode ser prejudicial se persistir por muito tempo. E, essa redução na expressão de proteínas relacionadas à resposta inflamatória, como Serpin1, pode ser um indicador de que a inflamação está sendo reduzida e que o músculo está retornando a um estado de homeostase (serpin 1; il-6).

Além disso, a diminuição da expressão de proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos pode ocorrer devido à diminuição da atividade da enzima (CPT1) carnitina palmitoiltransferase 1. Esta enzima, entre suas muitas funções, é capaz de desempenhar um papel fundamental, sendo responsável pelo transporte de ácidos graxos para dentro da mitocôndria, onde são oxidados e transformados em energia. Ou seja, quando sua atividade diminui, o processo de utilização destes ácidos graxos para geração de energia também é afetado (Bruce et al., 2007; Schlaepfer & Joshi, 2020). A redução da atividade da CPT1 pode ser resultado de uma menor necessidade de energia para manter a homeostase celular (Schlaepfer & Joshi, 2020). Outra teoria sugere que a redução da expressão de proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos pode ser atribuída à redução da atividade da via de sinalização da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Esta proteína desempenha um papel crucial na regulação da oxidação de ácidos graxos e síntese de glicogênio (Hingst et al., 2020). Portanto, quando a atividade da AMPK é comprometida, isso pode afetar não apenas a oxidação ácida, mas também a capacidade do corpo de mobilizar e utilizar os recursos energéticos de forma eficiente (Hingst et al., 2020). Em outras palavras, a redução na atividade da AMPK pode ser resultado de uma menor necessidade de energia para manter a homeostase celular.

Em resumo, esses resultados demonstram que a expressão de proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos e à resposta inflamatória no GA mudou ao longo do tempo após

lesão parcial do TC. A redução na expressão dessas proteínas durante esse período sugere que o músculo está retornando a um possível estado de homeostase e que a lesão está sendo reparada. Além disso, a redução na expressão de proteínas relacionadas à oxidação de ácidos graxos pode ser resultado de uma necessidade reduzida de energia para manter tal homeostase celular, inflamação reduzida e atividade reduzida de enzimas-chave envolvidas na oxidação de ácidos graxos. Sob esse aspecto, esses resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na recuperação muscular após lesão e podem ter implicações para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a recuperação de lesões musculares.

6.3.2 JUNÇÃO MIOTENDÍNEA

Os resultados obtidos para os 28 dias após a lesão parcial do TC revelaram alterações significativas na expressão proteica na JMT, refletindo a complexidade dos processos regenerativos e adaptativos que podem ocorrer neste tecido, em especial, os clusters 2 e 3 com grande enriquecimento de proteínas, enquanto o cluster 4 apresentou redução na expressão. Ao observar o Cluster 2, é possível perceber o enriquecimento de proteínas relacionadas à resposta inflamatória e síntese de colágeno (principalmente *Co1a1*, *Col2a1* e *Col3a1*), porém, o maior destaque fica por conta do enriquecimento do Fator de Coagulação Tecidual (FT). Portanto, o aumento da expressão deste fator neste momento sugere que, embora a resposta inflamatória esteja atenuada em comparação a 14 dias, ele ainda desempenha um papel fundamental no processo de retorno à homeostase tecidual (Zelaya, 2018). Nesse sentido, o FT não só contribui para a coagulação, mas também atua na sinalização celular que promove a infiltração de células inflamatórias e a liberação de citocinas, essenciais para os acessórios técnicos (Zelaya, 2018).

Além disso, foi observado enriquecimento de *Serpina 1* (como nos 14 dias) no cluster 2, indicando um mecanismo de controle da resposta inflamatória, ou seja, o organismo pode estar tentando limitar danos adicionais ao tecido (Latourte et al., 2020; Tjondrokoesoemo et al., 2015). Esse controle é crucial, pois o estresse excessivo pode levar à fibrose e ao comprometimento funcional. Além disso, o cluster 3 destacou um enriquecimento de proteínas envolvidas na regulação do estresse oxidativo e na síntese de nucleotídeos, como a *Glutathione S-Transferase Alfa-3* (*Gstast3*). Sua expressão aumentada sugere que, após a lesão, o músculo sofre um aumento do estresse oxidativo, possivelmente resultante da intensidade e do metabolismo acelerado durante o processo de cicatrização (Aloke et al., 2024; Mazari et

al., 2023). Essa adaptação é essencial para neutralizar espécies reativas de oxigênio e proteger as células musculares de danos oxidativos (Mazari et al., 2023). A observação de que a expressão de TF diminui ao longo do tempo, enquanto as proteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo aumentam, sugere uma tentativa de contrabalancear a resposta do tecido. Pois, nos primeiros 14 dias, o tecido está focado em reações inflamatórias intensas e rápida substituição, enquanto, após 28 dias, o foco parece mudar para a restauração da homeostase e proteção contra potenciais danos.

Em contraste, a expressão diminuída de proteínas no cluster 4, que inclui a célula da creatinina kinase m(CKM), indica uma possível adaptação metabólica na JMT. Como a CKM é essencial para a regeneração do ATP durante a atividade contrátil do músculo, sua redução sugere que a demanda de energia para contração está levando à estabilização e recuperação do tecido (Borchel et al., 2019; B. Chen et al., 2023; Önay Uçar et al., 2023). Isso pode refletir um ajuste fisiológico onde a JMT não requer mais alta produção de energia devido à redução da carga mecânica imposta na fase aguda da cicatrização. Além disso, a diminuição da proteína heat shock protein 70kDa 4 (HSPA4) aponta para uma necessidade reduzida de proteção contra estresse à medida que a JMT começa a retornar a um estado de homeostase (Dubrez et al., 2020; Shang et al., 2021). A HSPA4 está envolvida na promoção da sobrevivência celular e na prevenção de danos sob condições de estresse, sendo um marcador de resposta a condições adversas (Dubrez et al., 2020). Sua redução sugere que a JMT está superando os efeitos da lesão e que a pressão metabólica está fluindo.

Em resumo, os resultados obtidos para o período de 28 dias após a lesão indicam um cenário complexo de adaptação no tecido miotendíneo. A regulação da expressão de proteínas envolvidas no enriquecimento, oxidação e síntese de colágeno ilustra bem os mecanismos celulares que o organismo desencadeia em resposta ao dano. Esses mecanismos são cruciais para restaurar a função e a integridade do tecido, enfatizando a importância da resposta inflamatória controlada e da proteção contra o estresse oxidativo durante o processo de recuperação.

6.4 PERÍODO DE 55 DIAS (55D): ADAPTAÇÃO E REMODELAMENTO METABÓLICA

6.4.1 MÚSCULO GASTROCNÊMIO

No gastrocnêmio, 55 dias após a lesão do TC, sugere que esteja ocorrendo uma adaptação metabólica significativa, possivelmente refletida pela regulação de proteínas musculares associadas ao metabolismo oxidativo e remodelação estrutural em uma fase tardia. Nesse período, a redução observada na abundância proteica, em comparação ao grupo controle e aos grupos de 3 e 14 dias, pode indicar a hipótese de adaptação metabólica e estrutural, característica da fase avançada de recuperação, sinalizando um possível retorno à homeostase tecidual. Além disso, a análise proteômica revelou que proteínas associadas ao metabolismo oxidativo, como aquelas envolvidas na atividade da oxidoredutase mitocondrial, foram menos expressas. Em outras palavras, é possível que tenha ocorrido uma regulação complexa do metabolismo energético, possivelmente em resposta à diminuição da demanda energética após a fase inicial de reparo tecidual. Nesse contexto, a diminuição do enriquecimento de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como a superóxido dismutase (SOD), indica uma redução na resposta ao estresse oxidativo, o que pode refletir uma estabilização do ambiente celular (P. Li et al., 2021). Além disso, a redução de proteínas envolvidas na resposta inflamatória, como a interleucina-6 (IL-6), corrobora a hipótese de que o processo inflamatório agudo foi resolvido, permitindo que o tecido muscular iniciasse a fase de remodelação e regeneração (P. Li et al., 2021; Plomgaard et al. 2020). Além disso, a estabilização observada aos 28 dias, seguida de nova redução aos 55 dias, pode ser interpretada como um sinal de que o músculo gastrocnêmio está entrando em uma fase de homeostase, onde as vias catabólicas e anabólicas estão equilibradas (Kim et al., 2008; Preobrazenski et al., 2023). Tal equilíbrio pode ser crucial para manter a integridade muscular e prevenir maiores danos por meio da restauração da função contrátil muscular (Q. Li et al., 2022; P. Zhang et al., 2007).

6.4.2 JUNÇÃO MIOTENDÍNEA

A análise proteômica revelou alterações significativas na expressão de proteínas associadas ao estresse oxidativo, apoptose e homeostase celular, proporcionando uma adaptação prolongada da JMT aos efeitos da lesão. Os clusters identificados refletem alterações temporais específicas na expressão de proteínas, mas de maneiras diferentes

dependendo do cluster que está sendo analisado. Por exemplo, no Cluster 1, foi observado um enriquecimento de proteínas envolvidas na atividade metabólica e processos catabólicos aos 28 e 55 dias, em comparação ao controle. Esse aumento sugere que o tecido ainda apresenta um alto metabolismo e um equilíbrio predominantemente catabólico, o que pode estar associado a um esforço contínuo do tecido para remover componentes danificados e renovar suas estruturas (Curzi et al., 2015; Eming et al., 2017; Liu & Pedrosa Domellöf, 2021). Outra informação importante seria o enriquecimento de proteínas relacionadas à resposta inflamatória e imune presentes no Cluster 3, uma vez que o aumento desses clusters sugere que a JMT mantém alta atividade metabólica para suportar a remodelação contínua do tecido, uma vez que, embora a resposta inflamatória e imune tenha sido menor do que nos primeiros dias, ainda poderia ser suficiente para sustentar os mecanismos de renovação celular (Megha et al., 2021). Complementando esse contexto de enriquecimento, o aumento da expressão de proteínas antioxidantes no Cluster 2, como a Serpina, indica proteção contínua contra o estresse oxidativo residual, limitando os danos celulares durante o processo de recuperação.

Em contraste, os Clusters 4 e 5, relacionados aos processos de sinalização apoptótica e controle do estresse oxidativo, apresentaram expressão reduzida neste momento. Essa redução pode indicar que, embora esses processos tenham sido críticos nos estágios iniciais, a JMT parece estar em uma fase mais estabilizada. No entanto, aos 55 dias, o fato de a expressão dessas proteínas estar ainda mais reduzida do que no grupo controle (como no Cluster 4), demonstra que a JMT poderia estar realizando atividade apoptótica e de estresse oxidativo como uma estratégia de conservação celular (Armand et al., 2011). Essa redução poderia ser interpretada como adaptação do tecido para evitar apoptose excessiva ou estresse capaz de prejudicar a recuperação e manutenção celular. No Cluster 5, a expressão da proteína parece ter retornado a níveis próximos ao normal (como o controle), indicando que as atividades de remodelação e anabólicas estão sendo estabilizadas, refletindo uma transição do tecido para um estado de equilíbrio (Iismaa et al., 2018; Rajasekaran et al., 2021).

7. IMPACTOS CIENTÍFICOS:

O presente estudo representou uma contribuição científica significativa ao ampliar o entendimento das respostas moleculares e metabólicas associadas às lesões musculoesqueléticas. O estudo revelou a dinâmica temporal de proteínas associadas à

inflamação, ao estresse oxidativo e ao metabolismo energético, fornecendo bases para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes.

Esses achados foram integrados ao curso ministrado "*Impacto das Lesões Tendíneas no Músculo Esquelético: Estratégias de Prevenção e Abordagens Avançadas de Tratamento*", realizado em Albufeira, Portugal. Durante o curso, foram apresentados conhecimentos atualizados sobre os mecanismos de regeneração tecidual e estratégias de prevenção baseadas na ciência, destacando a importância de monitorar e modular proteínas-chave no processo de recuperação funcional.

O impacto do curso foi ampliado por sua aplicação prática, permitindo que profissionais e pesquisadores na área de reabilitação e esportes pudessem incorporar abordagens avançadas ao manejo de lesões tendíneas. Além disso, o evento solidificou a conexão entre a pesquisa acadêmica de ponta e a prática clínica, promovendo a transferência de conhecimento e fomentando a discussão sobre soluções inovadoras para desafios no campo da reabilitação musculoesquelética.

Por meio dessa integração entre pesquisa e ensino, o trabalho consolidou-se como uma referência para o avanço das práticas terapêuticas, contribuindo para a formação de profissionais mais qualificados e para a melhoria dos desfechos clínicos em pacientes com lesões tendíneas.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo fornece uma análise abrangente dos processos moleculares e temporais envolvidos na recuperação do músculo e da junção músculo-tendão (JMT) após uma lesão parcial do tendão calcâneo, expandindo as respostas adaptativas dos tecidos ao redor da lesão. A análise proteômica direcionada revelou mudanças significativas na abundância de proteínas durante diferentes pontos de tempo de recuperação, enfatizando a capacidade dos tecidos de montar uma resposta complexa necessária para a recuperação funcional em tecidos adjacentes.

Nos três dias iniciais após a lesão, houve uma forte ativação de vias relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo, sugerindo uma resposta defensiva e de reparo tecidual precoce. A regulação positiva de proteínas como Serpina1 e C4b sugere um papel fundamental no controle da inflamação e na prevenção da degradação excessiva do tecido muscular, "preparando" assim para a próxima fase, que envolve adaptação metabólica e remodelação do tecido. Esta fase é marcada por mudanças em proteínas envolvidas no metabolismo energético e na organização do citoesqueleto, que são essenciais para a restauração da função contrátil.

Entre 28 e 55 dias após a lesão, há estabilização, regulação e normalização dos processos inflamatórios e oxidativos, indicando um retorno à homeostase do tecido. Essa redução no enriquecimento de proteínas inflamatórias e relacionadas ao estresse demonstra que o tecido está em um estágio que pode ser descrito como equilíbrio metabólico e estrutural, o que é importante para preservar a saúde do tecido e prevenir lesões. Essas descobertas contribuem para a compreensão atual dos mecanismos moleculares envolvidos na recuperação muscular e oferecem potenciais modalidades terapêuticas que podem ser usadas para melhorar o processo de recuperação da interface músculo-tendão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Phablo; LEAL-CARDOSO, José Henrique; CECCATTO, Vânia Marilande; HIRABARA, Sandro Massao. Regulation of muscle plasticity and trophism by fatty acids: A short review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 2, p. 148–155, 2017. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.02.148>.

ADSTRUM, Sue; HEDLEY, Gil; SCHLEIP, Robert; STECCO, Carla; YUCESAY, Can A. Defining the fascial system. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 21, n. 1, p. 173–177, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2016.11.003>.

BARIN, Fabrício Reichert; DE SOUSA NETO, Ivo Vieira; VIEIRA RAMOS, Graciele; SZOJKA, Alexander; RUIVO, Amanda Lima; ANFLOR, Carla Tatiana Mota; AGUALIMPIA, José David Hurtado; DOMINGUES, Allan Corrêa; FRANCO, Octávio Luiz; ADESIDA, Adetola B.; DURIGAN, João Luiz Quaglioti; MARQUETI, Rita de Cassia. Calcaneal Tendon Plasticity Following Gastrocnemius Muscle Injury in Rat. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. September, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01098>.

CURY, Natalia F.; SILVA, Renata C.C.; MELO, Jessica R.; ANDRE, Michelle S.F.; FONTES, Wagner; RICART, Carlos A.O.; CASTRO, Mariana S.; SILVEIRA, Conceição E.S.; DE SOUSA, Marcelo V.; PEREIRA, Luiz A.R. Label free quantitative proteomics of *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) roots indicates an aluminium requirement for growth and development. **bioRxiv**, 2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/396093>.

CURZI, D.; LATTANZI, D.; CIUFFOLI, S.; BURATTINI, S.; GRINDELAND, R.E.; EDGERTON, V.R.; ROY, R.R.; TIDBALL, J.G.; FALCIERI, E. Growth hormone plus resistance exercise attenuate structural changes in rat myotendinous junctions resulting from chronic unloading. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 4, p. 37, 13 nov. 2013. <https://doi.org/10.4081/ejh.2013.e37>.

CURZI, D.; SALUCCI, S.; MARINI, M.; ESPOSITO, F.; AGNELLO, L.; VEICSTEINAS, A.; BURATTINI, S.; FALCIERI, E. How physical exercise changes rat myotendinous junctions: an ultrastructural study. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, n. 2, p. 19, 16 abr. 2012. <https://doi.org/10.4081/ejh.2012.19>.

DAVIES, Michael R.; GARCIA, Steven; TAMAKI, Stanley; LIU, Xuhui; LEE, Solomon; JOSE, Anthony; POMERANTZ, Jason H.; FEELEY, Brian T. Muscle stem cell activation in a mouse model of rotator cuff injury. **Journal of Orthopaedic Research®**, v. 36, n. 5, p. 1370–1376, maio 2018. <https://doi.org/10.1002/jor.23679>.

EKEN, Gökay; MISIR, Abdulhamit; TANGAY, Cem; ATICI, Teoman; DEMIRHAN, Nevzat; SENER, Nadir. Effect of muscle atrophy and fatty infiltration on mid-term clinical, and functional outcomes after Achilles tendon repair. **Foot and Ankle Surgery**, v. 27, n. 7, p. 730–735, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fas.2020.09.007>.

EXETER, Dan; CONNELL, David. Skeletal Muscle: Functional Anatomy and Pathophysiology. **Seminars in Musculoskeletal Radiology**, v. 14, n. 02, p. 097–105, 18 jun. 2010. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253154>.

FERRIÉ, Céline; KASPER, Stephanie; WANIVENHAUS, Florian; FLÜCK, Martin. Time course of costamere-related alterations in focal adhesion signaling and composition of rat soleus muscle after achilles tenotomy. **Data in Brief**, v. 25, p. 103999, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103999>.

FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**. [S. l.: s. n.], 2003. v. 146, p. 159–216. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0004-7>.

FRONTERA, Walter R; OCHALA, Julien. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 8 mar. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>.

GIL-MELGOSA, Lara; GRASA, Jorge; URBIOLA, Ainhoa; LLOMBART, Rafael; RUIZ, Miguel Susaeta; MONTIEL, Verónica; EDERRA, Cristina; CALVO, Begoña; ARIZ, Mikel; RIPALDA-CEMBORAIN, Purificación; PROSPER, Felipe; ORTIZ-DESOLÓRZANO, Carlos; PONS-VILLANUEVA, Juan; RUIZ, Ana Pérez. Muscular and tendon degeneration after achilles rupture: New insights into future repair strategies. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010019>.

GIL-MELGOSA, Lara; GRASA, Jorge; URBIOLA, Ainhoa; LLOMBART, Rafael; SUSAETA RUIZ, Miguel; MONTIEL, Verónica; EDERRA, Cristina; CALVO, Begoña; ARIZ, Mikel; RIPALDA-CEMBORAIN, Purificación; PROSPER, Felipe; ORTIZ-DESOLÓRZANO, Carlos; PONS-VILLANUEVA, Juan; PÉREZ RUIZ, Ana. Muscular and Tendon Degeneration after Achilles Rupture: New Insights into Future Repair Strategies. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, p. 19, 23 dez. 2021. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010019>.

GOMES DE MELO COELHO, Flávia; GOBBI, Sebastião; LUIZ RIANI COSTA, José; TERESA BUCKEN GOBBI, Lilian. **EXERCÍCIO FÍSICO NO ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL E PATOLÓGICO: da teoria à prática**. 1. ed. Curitiba: EDITORA CRV, 2013. <https://doi.org/10.24824/978858042579.6>.

HÄGGMARK, Tom; ERIKSSON, Ejnar; JANSSON, Eva. Muscle Fiber Type Changes in Human Skeletal Muscle After Injuries and Immobilization. **Orthopedics**, v. 9, n. 2, p. 181–185, fev. 1986. <https://doi.org/10.3928/0147-7447-19860201-08>.

HULLFISH, Todd J.; O'CONNOR, Kathryn M.; BAXTER, Josh R. Gastrocnemius fascicles are shorter and more pennate throughout the first month following acute achilles tendon rupture. **PeerJ**, v. 2019, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.6788>.

IRVING, Malcolm. Regulation of Contraction by the Thick Filaments in Skeletal Muscle. **Biophysical Journal**, v. 113, n. 12, p. 2579–2594, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.037>.

JACOBSON, Kathryn R; LIPP, Sarah; ACUNA, Andrea; LENG, Yue; BU, Ye; CALVE, Sarah. Comparative Analysis of the Extracellular Matrix Proteome across the Myotendinous Junction. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 10, p. 3955–3967, 2 out. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00248>.

JAKOBSEN, Jens Rithamer; KROGSGAARD, Michael Rindom. The Myotendinous Junction—A Vulnerable Companion in Sports. A Narrative Review. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. March, p. 1–13, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.635561>.

JUNG, Hwa Jin; LEE, Kwang Pyo; KWON, Ki Sun; SUH, Yousin. MicroRNAs in Skeletal Muscle Aging: Current Issues and Perspectives. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 74, n. 7, p. 1008–1014, 2019. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly207>.

KARAMANOS, Nikos K.; THEOCHARIS, Achilleas D.; PIPERIGKOU, Zoi; MANOU, Dimitra; PASSI, Alberto; SKANDALIS, Spyros S.; VYNIOS, Demitrios H.; ORIAN-ROUSSEAU, Véronique; RICARD-BLUM, Sylvie; SCHMELZER, Christian E.H.; DUCA, Laurent; DURBEEJ, Madeleine; AFRATIS, Nikolaos A.; TROEBERG, Linda; FRANCHI, Marco; MASOLA, Valentina; ONISTO, Maurizio. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **FEBS Journal**, v. 288, n. 24, p. 6850–6912, 2021. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>.

KHAIR, Ra'ad M.; STENROTH, Lauri; CRONIN, Neil J.; REITO, Aleks; PALONEVA, Juha; FINNI, Taija. Muscle-tendon morphomechanical properties of non-surgically treated Achilles tendon 1-year post-rupture. **Clinical Biomechanics**, v. 92, n. December 2021, p. 105568, fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2021.105568>.

KJAER, MICHAEL. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 649–698, abr. 2004. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2003>.

KOEPPEN, Bruce M.; STANTON, Bruce A. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2008. v. 6, .

KOVANEN, Vuokko. Intramuscular extracellular matrix: Complex environment of muscle cells. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 30, n. 1, p. 20–25, 2002. <https://doi.org/10.1097/00003677-200201000-00005>.

MACKEY, Abigail Louise; HEINEMEIER, Katja Maria; KOSKINEN, Satu Osmi Anneli; KJAER, Michael. Dynamic adaptation of tendon and muscle connective tissue to mechanical loading. **Connective Tissue Research**, v. 49, n. 3–4, p. 165–168, 2008. <https://doi.org/10.1080/03008200802151672>.

MESCHER, Anthony L. (Professor of Anatomy and Cell Biology Indiana University School of Medicine). **Junqueira's Basic Histology : Text & Atlas (15th ed.)**, 2018. 15. ed. New York: McGraw- Hill Education, 2019. v. 13, . <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.101-104>.

MILLER, Benjamin F.; OLESEN, Jens L.; HANSEN, Mette; DØSSING, Simon; CRAMERI, Regina M.; WELLING, Rasmus J.; LANGBERG, Henning; FLYVBJERG, Allan; KJAER, Michael; BABRAJ, John A.; SMITH, Kenneth; RENNIE, Michael J. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. **Journal of Physiology**, v. 567, n. 3, p. 1021–1033, 2005. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.093690>.

MUKUND, Kavitha; SUBRAMANIAM, Shankar. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. **WIREs Systems Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–46, 13 jan. 2020. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>.

NARAYANAN, Naagarajan; CALVE, Sarah. Extracellular matrix at the muscle–tendon interface: functional roles, techniques to explore and implications for regenerative medicine. **Connective Tissue Research**, v. 62, n. 1, p. 53–71, 2021. <https://doi.org/10.1080/03008207.2020.1814263>.

O. BORTOLAZZO, Fernanda; D. LUCKE, Letícia; DE OLIVEIRA FUJII, Lucas; MARQUETI, Rita de Cassia; VIEIRA RAMOS, Gracielle; THEODORO, Viviane; BOMBEIRO, André L.; FELONATO, Maíra; A. DALIA, Rodrigo; D. CARNEIRO, Giane; PONTES VICENTE, Cristina; A.M. ESQUISATTO, Marcelo; A.S. MENDONÇA, Fernanda; T. DOS SANTOS, Gláucia Maria; R. PIMENTEL, Edson; DE ARO, Andrea A. Microcurrent and adipose-derived stem cells modulate genes expression involved in the structural recovery of transected tendon of rats. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 8, p. 10011–10026, 19 ago. 2020. <https://doi.org/10.1096/fj.201902942RR>.

OHLENDIECK, Kay. Skeletal muscle proteomics: current approaches, technical challenges and emerging techniques. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 6, 2011. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-6>.

PALUMBO, Carla; ROVESTA, Claudio; FERRETTI, Marzia. Striated muscle fiber apoptosis after experimental tendon lesion in a rat model. **Journal of Anatomy**, v. 221, n. 4, p. 358–363, out. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01554.x>.

QAISAR, Rizwan; BHASKARAN, Shylesh; VAN REMMEN, Holly. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 56–67, set. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>.

SHARMA, P; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 6, n. 2, p. 181–90, jun. 2006. .

STÄUDLE, Benjamin; SEYNNES, Olivier; LAPS, Guido; BRÜGGEMANN, Gert Peter; ALBRACHT, Kirsten. Altered Gastrocnemius Contractile Behavior in Former Achilles Tendon Rupture Patients During Walking. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. March, p. 1–12, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.792576>.

STECCO, Carla. **Functional Atlas of the Human Fascial System**. 1. ed. New york: Churchill Livingstone Elsevier, 2015. v. 1, .

STECCO, Carla; ADSTRUM, Sue; HEDLEY, Gil; SCHLEIP, Robert; YUCESOY, Can A. Update on fascial nomenclature. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 22, n. 2, p. 354, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2017.12.015>.

SUBRAMANIAN, Arul; SCHILLING, Thomas F. Tendon development and musculoskeletal assembly: emerging roles for the extracellular matrix. **Development**, v. 142, n. 24, p. 4191–4204, 15 dez. 2015. <https://doi.org/10.1242/dev.114777>.

TAKALA, Timo E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: The effect of loading. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 10, n. 6, p. 321–325, 2000. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0838.2000.010006321.x>.

THEOCHARIS, Achilleas D.; SKANDALIS, Spyros S.; GIALELI, Chrysostomi; KARAMANOS, Nikos K. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.

THORSTEINSDOTTIR, Solveig; DERIES, Marianne; CACHAÇO, Ana Sofia; BAJANCA, Fernanda. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. **Developmental Biology**, v. 354, n. 2, p. 191–207, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.015>.

TIDBALL, James G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 2029–2062, out. 2011. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100092>.

WANG, Zhexin; GRANGE, Michael; WAGNER, Thorsten; KHO, Ay Lin; GAUTEL, Mathias; RAUNSER, Stefan. The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. **Cell**, v. 184, n. 8, p. 2135-2150.e13, abr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.047>.