



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA - FCE
CURSO DE FISIOTERAPIA

GEOVANNA NASCIMENTO MONTANINI
JULIANA OLIVEIRA DE ARAÚJO

EXPRESSÃO DE GENES RELEVANTES PARA A
ESTRUTURA DA MATRIZ EXTRACELULAR DO
MÚSCULO GASTROCNÊMIO EM RESPOSTA A
TRANSECÇÃO PARCIAL DO TENDÃO
CALCÂNEO

GEOVANNA NASCIMENTO MONTANINI
JULIANA OLIVEIRA DE ARAÚJO

EXPRESSÃO DE GENES RELEVANTES
PARA A ESTRUTURA DA MATRIZ
EXTRACELULAR DO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO EM RESPOSTA A
TRANSECÇÃO PARCIAL DO TENDÃO
CALCÂNEO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade de
Brasília – UnB – Faculdade de
Ceilândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em
Fisioterapia.

Orientador (a): Profa. Dra. Rita de
Cássia Marqueti Durigan

BRASÍLIA
2022

GEOVANNA NASCIMENTO MONTANINI
JULIANA OLIVEIRA DE ARAÚJO

EXPRESSÃO DE GENES RELEVANTES
PARA A ESTRUTURA DA MATRIZ
EXTRACELULAR DO MÚSCULO
GASTROCNÊMIO EM RESPOSTA A
TRANSECÇÃO PARCIAL DO TENDÃO
CALCÂNEO

Brasília, 03/05/2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Rita de Cássia Marqueti Durigan
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB
Orientadora

Prof.^a Dr.^a. Patrícia Azevedo Garcia
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB

Prof.^a Dr.^a. Milla Pompílio da Silva
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília-UnB

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à minha Avó Clarice Maria Montanini, que sempre sonhou que um filho ou neto fizesse faculdade e à minha irmã de coração, Jéssika Figueira, que fez todo esse sonho se tornar possível.

Geovanna Nascimento Montanini

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus avós Amélia Barros e Carlos José Barros, a todos os jovens que infelizmente não tiveram as mesmas oportunidades que eu e a todas as meninas e mulheres que estão na ciência.

Juliana Oliveira de Araújo

AGRADECIMENTOS

À Deus, que em inúmeros momentos eu não via saída ou solução, mas Ele me amparou, me cuidou, enxugou minhas lágrimas e me mostrou o caminho a seguir. Dedico à Ele, que se tornou minha base, e mesmo em meio a dificuldade, nunca me deixou faltar o pão para comer e o teto para dormir. Dedico à Ele, que sempre soube da batalha que travava sozinha, e que foi através dessa batalha que Ele pôde me moldar, me mostrar o meu propósito, me ajudando a vencer e me mostrar que eu sou capaz. Que eu possa ser veículo para os propósitos de Deus, e que com esta profissão, eu possa transformar vidas, promovendo saúde e cuidado ao meu próximo.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan, a pessoa que me ensinou como professora, corrigiu como mãe e me apoiou como fã. Que foi muito além das funções de orientadora de IC e TCC, entregou seu máximo, mesmo quando sabíamos que o que ela mais precisava era de descanso, que me proporcionou um aprendizado que eu jamais teria em qualquer outro lugar. Obrigada por todas as oportunidades na pesquisa e ensinamentos dentro e fora da instituição.

Agradeço ao CNPq, pelo apoio financeiro de pesquisa de iniciação científica e as bolsas de auxílio alimentação cedida pela UnB durante os últimos anos de faculdade, me proporcionando oportunidade de melhor dedicação e permanência na instituição.

Agradeço a Universidade de Brasília por ter proporcionado tamanho aprendizado em todos os pilares importantes na formação. Foram anos de muita dedicação, de momentos compartilhados com colegas, amigos e professores, de muitas vitórias e também de muitos desafios.

Obrigada a todos, que, direta ou indiretamente, contribuíram para este momento.

E por fim, um agradecimento especial à Jéssika Figueira, minha melhor amiga, companheira de vida e irmã de coração, que foi graças à ela que criei coragem para dar tudo de mim no vestibular, que acreditou em mim antes mesmo de verificar o resultado, que sempre me apoiou em todas as etapas da vida.

Geovanna Nascimento Montanini

AGRADECIMENTOS

Mais difícil que escrever esse trabalho, é a missão de agradecer a todos os envolvidos nesses 22 anos de vida e 5 anos de Universidade de Brasília.

Irei iniciar agradecendo a Deus, meu fiel companheiro. Agradeço aos meus avós Amélia Barros e Carlos José Barros que mesmo em meio a todas as dificuldades sempre me apoiaram, vocês dois são as maiores alegrias da minha vida e sou muito grata pela vida de vocês. Agradeço grandemente a minha mãe Sra. Odete Barros e meu padrasto Sr. Simael Paiva e a todos os meus amados Tios e Tias, em especial ao Junior Barros, Ademir Barros, Lilian Barros e Leila Barros, por terem lutado tanto pela minha educação e por sempre me apoiarem, ao meu irmão Davi que deixou esses 5 anos de faculdade muito mais leves. Tudo o que eu faço é por nós e por amor!

Agradeço a todos os meus amigos que me incentivaram tanto a não desistir, em especial a Brenda Martins, David Uchoa, Elson Calazans, Sabrina Loren, Sarah Assunção e agradeço ao meu companheiro Marcos Paulo Diniz por todo o apoio.

Preciso agradecer grandemente a minha maior inspiração e incentivadora, Profa. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan, minha querida professora, orientadora de IC e TCC, obrigada por todas as oportunidades e conhecimentos que a senhora me ofereceu.

Agradeço ao meu amado grupo de pesquisa GPLAST por esses 4 anos de grandes projetos, aos meus companheiros de laboratório, em especial ao meu grande mestre e amigo Dr. Ivo Neto.

Sou grata a todos os meus professores da UnB, preceptores de estágio e colegas fisioterapeutas por todo o conhecimento compartilhado, sempre carregados de grande empatia, didática e amor. Em especial, meus mais sinceros agradecimentos a Dr^a. Marinete, Dr^a. Claudia Escarabel, Dr^a Giselly Carvalho, Prof. Dr. Leonardo Petruz, Prof.^a Dr^a. Aline do Carmo, Prof.^a Dr^a. Patrícia Azevedo e Prof.^a Dr^a. Luisiane de Ávila.

Agradecimento especial ao CNPq, pelo apoio financeiro de pesquisa durante três anos de iniciação científica e as bolsas de auxílio alimentação cedida pela UNB durante os 5 anos de faculdade, me proporcionando oportunidade de melhor dedicação.

E por fim, mas não menos importante, sou muito grata pela Universidade de Brasília por todos esses anos repletos de desafios, mas de muitas vitórias e alegrias e agradeço a todos os profissionais terceirizados (Seguranças, cozinheiras, funcionários dos serviços gerais) por todo cuidado, segurança, acolhimento e alimento oferecidos a mim durante a minha graduação.

Juliana Oliveira de Araújo

Epígrafe – Geovanna Montanini

“O corpo não é uma máquina como nos diz a ciência. Nem culpa, como nos fez crer a religião. O corpo é uma festa (Eduardo Galeano)”

Epígrafe – Juliana Oliveira de Araújo

“ O que fazer quando a fortaleza tremeu e quase tudo ao seu redor se corrompeu? Epa, pera lá! Muita calma. Cadê o espírito imortal do Capão? Lave o rosto nas águas sagradas da pia, nada como um dia após o outro dia” (Racionais Mc’s).

RESUMO

Resumo: O comportamento dos genes chaves relacionadas à síntese de colágeno (*Ctgf*, *Tgf-β*, *Vgf*, *Timp2*, *Mmp2*, decorina, biglicana e fibromodulina) bem como dos colágenos (*Col1a1* e *Col3a1*) do músculo gastrocnêmio (GA) podem ser regulados após uma transecção parcial do tendão calcâneo (TC). Estudos mostram que rupturas tendíneas são responsáveis por adaptações deletérias na massa muscular, que podem impactar diretamente na sua funcionalidade, como o aumento de tecido conjuntivo intramuscular, redução do número de capilares no músculo, atrofia muscular bem como acúmulo de gordura intramuscular. Essas adaptações do músculo, podem sugerir possível perda funcional. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da transecção parcial no terço médio do TC sobre as propriedades moleculares que implicam o remodelamento do músculo GA de ratos após 3, 14, 28 e 55 dias da lesão (*time points* que caracterizam as fases de regeneração tendínea). **Materiais e métodos:** Foram utilizados 35 animais para as análises de expressão gênica do músculo gastrocnêmio no qual o tendão do calcâneo foi submetido à transecção parcial. Esses animais foram randomizados aleatoriamente em cinco grupos, com 07 animais em cada grupo: Grupo controle sem transecção parcial do TC (C), grupo 3 dias após transecção parcial do TC (3D), grupo 14 dias após transecção parcial do TC (14D), grupo 28 dias após transecção parcial do TC (28D) e grupo 55 dias após transecção parcial do TC 55D. Esses intervalos de tempo foram escolhidos com a finalidade de analisar as possíveis alterações no músculo em diferentes fases de cicatrização tendínea, após isso, foram extraídos o músculo gastrocnêmio dos animais e realizado a extração de RNA, cDNA e qPCR para análise da expressão dos seguintes genes: *Ctgf*, *Tgf-β*, *Vgf*, *Timp2*, *Mmp2*, decorina, biglicana e fibromodulina bem como dos colágenos (*Col1a1* e *Col3a1*). **Resultados:** Observamos que três dias após a transecção parcial do TC ocorreu aumento nos níveis de RNAm de *Col1a1* na MEC do músculo GA, quando comparado ao grupo 55D. No grupo 3D, ocorreu maior expressão gênica do *Tgf-β* e *Ctgf* quando comparado ao grupo 28D. Três dias após a transecção parcial do TC, observamos maior expressão gênica de *Mmp2* quando comparado ao grupo C. Observamos também que três dias após a transecção parcial do TC, ocorreu maior expressão gênica de *Timp1* quando

comparado ao grupo C e quando comparado ao grupo 14D. Verificamos que no grupo 3D após a transecção parcial do TC, ocorreu maior expressão gênica de *Timp2* quando comparado ao grupo C e ao grupo 55D. Ainda observamos que três dias após a transecção parcial do TC, ocorreu maior expressão gênica de *biglicana* quando comparado ao grupo C, ao grupo 14D e ao grupo 28D.

Conclusão: O presente estudo fornece informações importantes sobre os mecanismos relacionados à homeostasia da MEC do músculo mediante uma lesão tendínea. Bem como, traz evidências da importância da área básica e do vínculo entre músculo e tendão para desenvolver estratégias mais apropriadas na reabilitação em condições clínicas relacionadas à lesão tendínea.

Palavras-chave: interação músculo-tendão, expressão gênica, lesão tendínea, tendão calcâneo, transecção parcial tendínea.

ABSTRACT

Abstract: The behavior of key genes related to collagen synthesis (*Ctgf*, *Tgf- β* , *Vgf*, *Timp2*, *Mmp2*, *decorin*, *biglycan*, and *fibromodulin*) as well as collagen (*Col1a1* and *Col3a1*) from the gastrocnemius muscle (GA) can be regulated after a transection partial calcaneal tendon (CT). Studies show that tendon ruptures are responsible for deleterious adaptations in muscle mass, which can directly impact its functionality, such as increased intramuscular connective tissue, reduced number of capillaries in the muscle, muscle atrophy as well as intramuscular fat accumulation. These muscle adaptations may suggest possible functional loss. The aim of the present study was to evaluate the effect of partial transection in the middle third of the CT on the molecular properties that imply the remodeling of the GA muscle of rats after 3, 14, 28 and 55 days of injury (time points that characterize the phases of tendon regeneration). **Materials and methods:** 35 animals were used to analyze gene expression of the gastrocnemius muscle in which the Achilles tendon was submitted to partial transection. These animals were randomized into five groups, with 07 animals in each group: Control group without partial CT transection (C), group 3 days after the partial transection of the AT (3D), group 14 days after the partial transection of the AT (14D), group 28 days after the partial transection of the AT (28D) and group 55 days after the partial transection of the AT (55D). These time intervals were chosen to analyze the possible changes in the muscle in different phases of tendon healing, after which the gastrocnemius muscle of the animals was extracted and RNA, cDNA, and qPCR extraction performed for analysis of the expression of the following genes: *Ctgf*, *Tgf- β* , *Vgf*, *Timp2*, *Mmp2*, *decorin*, *biglycan*, and *fibromodulin*) as well as collagen (*Col1a1* and *Col3a1*). **Results:** We observed that three days after partial transection of the Achilles tendon, there was an increase in *Col1a1* mRNA levels in the ECM of the GA muscle, when compared to the 55D group. In the 3D group, there was greater gene expression of *Tgf- β* and *Ctgf*, when compared to the 28D group. Three days after the partial transection of the AT, we observed greater gene expression of *Mmp2* when compared to group C. We also observed that three days after partial transection of the AT, there was greater gene expression of *Timp1* when compared to group C and when compared to the 14D group. We found that in the 3D group after partial transection of the AT presented a higher gene expression of *Timp2*, when compared to the C group and the 55D group. We also observed that three days after the partial transection of the AT, there was greater gene expression of *biglycan* when compared to group C, group 14D, and group 28D. **Conclusion:** the present study provides important information about the mechanisms related to the homeostasis of the muscle ECM through a tendon injury. In addition, it brings evidence of the importance of the basic area and the link between muscle and tendon to develop more appropriate strategies in rehabilitation in clinical conditions related to tendon injury.

Key words: muscle-tendon interaction, gene expression, tendon injury, Achilles tendon, partial tendon transection.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão do fator de crescimento durante as fases de cicatrização do tendão.	24
Tabela 2. Lista de genes testados.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do tecido conjuntivo intramuscular.....	26
Figura 2. Desenho experimental	31
Figura 3. Realização da transecção parcial.....	32
Figura 4. Análise da expressão gênica.....	34
Figura 5. Análise da expressão gênica.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Bfgf: Fator de crescimento de fibroblastos básico

Bgn: Biglicana

Bmp: Proteína morfogenética óssea

Col1a1: Cadeia alfa 1 de colágeno tipo I

Col3a1: Cadeia alfa 1 de colágeno tipo III

Ctgf: Fator de crescimento do tecido conjuntivo

Dcn: Decorina

Erg1: Proteína de resposta de crescimento precoce 1

Fmod: Fibromodulina

Igf-1a: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

Lox: Lipoxigenase

MEC: Matriz extracelular

Mkx: Mohawk Homeobox

Mmp-2: Metaloproteinase de matriz do tipo 2

Pdgf: Fator de crescimento derivado de plaquetas

Scx: Escleraxia

TC: Tendão Calcâneo

Tgf-β1: Fator de crescimento transformador beta 1

Timp-1: Inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz do tipo 1

Timp-2: Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz do tipo 2

Vegf: Fator de crescimento do endotelial vascular

SLRps: Pequenos proteoglicanos ricos em leucina

Gags: Glicosaminoglicanos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. INTERAÇÃO MÚSCULO-TENDÍNEA	17
1.2. TENDÃO	18
1.3. MÚSCULO ESQUELÉTICO	24
1.4. RESPOSTA DA MEC MUSCULAR A ESTÍMULOS MECÂNICOS TENDÃO DEPENDENTE.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. ANIMAIS	30
3.2. DESIGN EXPERIMENTAL.....	30
3.3. PROTOCOLO DE TRANSECÇÃO PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO	32
3.4. EUTANÁSIA E COLETA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO (GA)	33
3.5. ANÁLISES.....	33
3.6. ANÁLISE DE DADOS	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	40

7. REFERÊNCIAS	41
8. ANEXOS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. INTERAÇÃO MÚSCULO-TENDÍNEA

Estudos da década de 70 já demonstravam essa relação ao mostrar que embriões de galinha expostos ao D-tubocurarine (inibidor de acetilcolina e, conseqüentemente da contração muscular), não apresentavam o desenvolvimento completo do tendão durante a embriogênese (Beckham et al.). Foram demonstradas alterações morfológicas e mecânicas em relação a diminuição do comprimento e espessura muscular após lesão tendínea seguida de reparo cirúrgico e também alterações de vias de sinalização do colágeno I e III e nos componentes mecânicos da MEC do tendão em resposta a lesão do músculo gastrocnêmio em ratos, mostrando que essa interação é importante tanto para a cinética, quanto para a formação e manutenção do tendão (Beckham et al.; Peng et al., 2017; Barin et al., 2019). Para compreender a interação entre músculo e tendão, é importante relembrar o conceito da junção miotendínea (JMT).

A junção miotendínea é uma região de conexão entre o músculo esquelético e o tendão (Valdivia et al., 2017). Nessa região, toda força produzida pela contração muscular é conduzida através das proteínas contráteis musculares para o tendão, possibilitando a transmissão de grandes forças entre essas duas estruturas^{4,5}. Essa conexão é formada por fibrilas de colágeno localizadas no tendão que invadem regiões de “dobras” localizadas na superfície celular do músculo. A MEC da JMT é rica em componentes que favorecem uma forte conexão entre os filamentos de actina e as fibrilas de colágeno, sendo as mais comuns a laminina, as integrinas, vinculina e fibronectina. Essa região é altamente plástica, porém fraca, quando comparado a outras regiões do complexo musculo-tendíneo, sendo assim mais suscetível a lesões. Estudos recentes mostram que o treino excêntrico de alta intensidade é capaz de prevenir o aparecimento de lesões nessa região (Jakobsen e Krogsgaard, 2021).

A mecanotransdução é um processo essencial para a manutenção saudável do tecido, onde um estímulo mecânico externo é percebido e transmitido para dentro da célula, sendo esse mecanismo o responsável pela resposta celular aos

estímulos mecânicos externos, é responsável pelo início de diversas cascatas de sinalização intracelular que podem levar a produção de constituintes da matriz extracelular (MEC) (Sk et al., 2020). Os sinais mecânicos são transmitidos de forma bidirecional ao tecido via receptores de superfície celular de adesão (integrinas), que conectam o citoesqueleto intracelular à matriz extracelular (MEC) e permite essa troca de sinais entre os dois meios (Franchi et al., 2007).

Há relatos em estudos em que o estímulo mecânico provocado pela contração muscular voluntária é capaz de aumentar força, rigidez e quantidade de colágeno no tendão (Heinemeier et al., 2013). A resposta tendínea à carga muscular a nível morfológico e molecular também foi demonstrada com o aumento em espessura do tendão, aumento da expressão de proteínas estruturais como os colágenos (*Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1*), fatores de crescimento (*Ctgf*, *Tgf-β* e sua via de sinalização via SMAD2/3, *Igf-1*, *Vegf*) e fatores de transcrição (Scleraxis, Mohawk e EGR1) que são essenciais na regulação do remodelamento da MEC tendínea (Egger and Berkowitz, 2017).

1.2. TENDÃO

1.2.1. Estrutura e função

O tendão é uma estrutura que liga o tecido ósseo (periósteo) ao tecido muscular), com uma função mecânica importante de propagação de força entre essas duas estruturas, absorção de cargas impostas sobre o segmento, ampliação de potência e geração de energia mecânica a partir de energia elástica, entre outras (Wang, 2006; Nourissat et al., 2015).

A complexidade de funções do tecido tendíneo depende de sua constituição e organização estrutural (Andarawis-Puri et al., 2015). Os tendões são organizados de forma hierárquica: O tropocolágeno é formado por um conjunto de cadeias peptídicas, dando origem às microfibrilas de colágeno, que juntas formam as fibrilas de colágeno e assim, formando as fibras, fascículos e unidade tendínea (Peng et al., 2017). O paratendão é a primeira camada de tecido conjuntivo que reveste o tendão permitindo uma maior movimentação do tecido, seguindo, temos o epitendão que está localizada externamente ao paratendão e

reúne o endotendão que reveste cada fibrila de colágeno e acomoda a passagem de nervos e vasos (Galloway et al., 2013).

O tendão é um tecido especializado, que suporta forças compressivas, de cisalhamento e tensão, isso se dá principalmente pela constituição e organização dos seus componentes estruturais que são em sua maioria formados pela matriz extracelular (MEC) e células especializadas (fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, adipócitos e células-tronco do tendão (TSCs) (Wang, 2006). O meio celular do tendão é composto principalmente por fibroblastos, essa célula tem função principal de divisão celular, produção de constituintes da MEC e quando maduros perdem essa capacidade sintetizadora e passam a ser chamados de fibrócitos (Galloway et al., 2013). Os fibrócitos ou tenócitos estão posicionados ao longo das fibras de colágeno, apresentam um mecanismo de comunicação célula com célula extremamente especializado, permitindo a interação em diversos planos do tecido favorecendo o remodelamento tecidual (Wang, 2006).

A matriz extracelular do tendão é constituída por proteínas fibrosas, que oferecem ao tecido a característica de resistência às cargas impostas (colágeno, fibronectinas, mucopolisacáridos), proteínas elásticas que conferem elasticidade ao tecido (elastina, fibrilina, oxitalânicas, elaunínicas) e substância fundamental, que compreende um conjunto de moléculas hidratadas (proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAG) e glicoproteínas) que oferecem lubrificação, barreira imunológica ao tendão, auxiliam na aderência célula-substrato e facilitam a migração celular (Wang, 2006; Mukund e Subramaniam, 2020) .

Em relação aos proteoglicanos (PGs), podemos dar destaque aos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) como a decorina, biglicana e a fibromodulina, pois pela sua localização entre as fibras de colágeno, oferecem a MEC organização, auxiliam na fibrilogênese e coordenam a espessura das fibrilas de colágeno (Galloway et al., 2013; Nourissat et al., 2015; Peng et al., 2017), já foi demonstrado que na ausência da decorina, houve formação inadequada de componentes da MEC tendínea como, por exemplo, das fibrilas de colágeno (Zhang et al., 2005).

Dentre a proteína mais abundante da MEC do tendão está o colágeno, que compreende 86% a 95% do tendão, ele se apresenta em forma de fibrilas alongadas e alinhadas paralelamente ao sentido da força aplicada do músculo

que favorece a resistência do tendão diante das forças impostas(Lavagnino et al., 2015). Dentre os colágenos, o colágeno I é o mais presente na MEC, correspondendo a quase 90%, sendo o tipo mais rígido e resistente de colágeno, seguido do tipo III (10%) que está presente em maior quantidade no epitendão e endotendão, suas fibras têm uma maior capacidade de extensibilidade e sua síntese e degradação é maior principalmente em lesão tendínea recente (Mukund e Subramaniam, 2020).

Em relação aos componentes moleculares do tendão, alguns fatores de transcrição ganham destaque, dentre eles, o fator de transcrição scleraxis, por ser essencial no processo de proliferação e diferenciação dos tenócitos, tendo em vista que na sua ausência há alterações deletérias na MEC tendínea como atrofia, desarranjo e atenuação da expressão do colágeno do tipo I (Galloway et al., 2013). Já o fator de transcrição Mohawk (Mkx) atua durante o processo de formação e maturação do tendão e junto ao Smad2/3 (transdutores de sinal para o fator de crescimento transformador beta (*Tgf-β*) vai atuar na regulação da síntese de componentes da MEC (Egger e Berkowitz, 2017).

1.2.2. Resposta tendínea a estímulos mecânicos músculo-dependente

A carga mecânica gerada a partir da contração muscular ou a ausência dessas cargas (como no caso de tendinopatias e rupturas tendínea) são capazes de modular a MEC tendínea (Docheva et al., 2015; Thomopoulos et al., 2015). A partir dessa premissa, diversos pesquisadores se dedicam a mostrar essa relação. Já foi demonstrado que embriões de galinha expostos ao D-tubocurarine (inibidor de acetilcolina e, conseqüentemente da contração muscular), não apresentaram o desenvolvimento completo do tendão durante a embriogênese(Beckham et al.). Um estudo com camundongos demonstrou que a corrida em esteira foi capaz de regular positivamente a expressão de fatores de crescimento mecânico (MGF), melhorou o potencial proliferativo das células-tronco do tendão (TSCs) e aumentou a expressão de *Col3a1* e tenomodulina (Zhang et al., 2005).

Em humanos, a contração muscular de alta intensidade foi capaz de elevar o conteúdo de colágeno do tipo I, enquanto a prática de esportes de alta requisição muscular foi capaz de aumentar a área de secção transversal do tendão. Além

do colágeno, o *Ctgf*, *Mmp-2*, *Timp-1*, *Timp-2*, *Vegf* e *lipoxigenase (Lox)* parecem ser regulados em resposta à contração muscular (Andarawis-Puri et al., 2015).

Em resumo, a contração muscular controlada é capaz de regular o remodelamento tendíneo. Esse processo tem seu início a partir da expressão de fatores de crescimento pelos tenócitos em resposta a contração muscular, esses fatores de crescimentos mandam sinais via SMAD 2/3 para expressão dos fatores Mohawk Homeobox (*Mkx*), Escleraxia (*Scx*) e *Erg1* e, conseqüentemente, resultando em resposta celulares e modificações na MEC tendínea (Docheva et al., 2015; Mukund e Subramaniam, 2020).

Diante disso, é possível inferir que condições que comprometam a completude do músculo podem acarretar negativamente essas vias coordenadas, influenciando a formação e desenvolvimento saudável do tendão (Barin et al., 2019).

1.2.3. Lesão Tendínea

O tendão calcâneo (TC), popularmente conhecido como tendão de Aquiles se origina ao final do tríceps sural (músculos gastrocnêmio e sóleo) e se insere posteriormente ao osso calcâneo através de uma fibrocartilagem. O TC realiza a absorção de energias no plano sagital e frontal, permitindo os movimentos de dorsiflexão, flexão plantar, inversão e eversão. O TC é o mais suscetível à ruptura, devido a sua função em unir os músculos sóleo e gastrocnêmio ao osso calcâneo, com fibras em várias direções afim de suportar a tensão exercida por esses músculos, sendo recorrentes as disfunções de tendinopatias ou lesão por sobrecarga (Egger e Berkowitz, 2017a; Dederer e Tennant, 2019) o que, por consequência, prejudica a biomecânica ao gerar limitação funcional (Nourissat et al., 2015).

Estudos prévios mostram que anatomicamente o TC apresenta uma zona em que o suprimento sanguíneo é reduzido em uma região onde ele se estreita, localizada entre 2 a 6 cm acima da inserção distal deste tendão junto ao osso calcâneo (Jozsa et al., 1990; Barin et al., 2019). Segundo Egger e Berkowitz, 2017, existem fatores que podem predispor lesões neste tecido, fatores intrínsecos como gota, distúrbios metabólicos, distúrbios do colágeno, doenças infecciosas, artrite reumatoide, insuficiência renal e psoríase, e fatores

extrínsecos, como a sobrecarga do tendão e atividades desportivas também podem afetar o tendão de Aquiles. Além disso, Egger (Egger e Berkowitz, 2017) e Dederer (Dederer e Tennant, 2019) ainda complementam que medicamentos como fluoroquinolonas podem elevar os riscos de rompimento deste tecido, como apresentado em estudos realizados em animais (Corrao et al., 2006). Outros fatores que aumentam as chances de rompimento do TC são suas fibras mais curtas e com orientação anormal, bem como sua composição (Jozsa et al., 1990), além do fato de sua vascularização ter duas origens: pela artéria tibial posterior, vindo através da parte medial da perna e irrigando as partes proximais e distais do paratenônio (uma membrana constituída de duas camadas que envolve o TC auxiliando no deslizamento), e pela artéria fibular, que vem da região lateral para vascularizar uma pequena área na parte medial do TC, existindo uma área de 2 a 6 cm da inserção deste tendão com má perfusão, e por este motivo se torna um tecido sujeito a condições degenerativas e rupturas (Dederer e Tennant, 2019).

A ruptura do tendão calcâneo (parcial ou total) é uma condição comum, que atinge tanto atletas preparados, quanto indivíduos que praticam esportes ou são sedentários. Nos esportes de alto impacto, as lesões normalmente ocorrem por sobrecarga, quando o TC é exposto a um stress muito grande relacionado a contração excêntrica do músculo gastrocnêmio e soleo. Além da sobrecarga, condições como microtraumas repetitivos e redução de constituintes colagenosos com o avanço da idade podem levar a condições degenerativas no tecido (Thomopoulos et al., 2015; Egger e Berkowitz, 2017). Ainda não é bem compreendida na literatura a ligação direta entre tendinopatia e ruptura tendínea, no entanto, mostra-se que tendinopatias podem ocasionar rupturas no tendão. Estudos recentes vêm teorizando possíveis explicações para a etiologia do rompimento do tendão de Aquiles, teorias estas ainda em andamento (Millar et al., 2017). Independente do fator etiológico da lesão do TC, todas as lesões são capazes de ativar diversas vias com o objetivo de reparo e retorno a homeostase tecidual (Sharma et al., 2006).

Existem poucos estudos na literatura sobre o tecido tendíneo quando comparado a outros tecidos que têm origem do mesoderma. Contudo, as etapas de cicatrização desses tecidos são bem conhecidas e divididas em: Fase inflamatória que ocorre imediatamente após a lesão, fase proliferativa que dura

em média algumas semanas e por fim, a fase de remodelamento que perdura de meses a anos. Essa divisão é teórica, pois na prática apesar dessas fases apresentarem distinções a nível celular e molecular, como por exemplo citocinas inflamatórias são mais expressas em fases iniciais, enquanto citocinas antiinflamatórias são expressas em fases mais tardias de cicatrização, todas essas fases se sobrepõem, se interrelacionam e são dependentes até o momento de completa cura do tecido (Sharma et al., 2006; Ho et al., 2014).

A fase inflamatória é caracterizada inicialmente pelo aumento da permeabilidade dos vasos da região e presença de coágulo, que será uma região de suporte para a atividade de células inflamatórias e plaquetas que vão levar a síntese de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento como TGF β , IGF-I e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), levando ao aumento da proliferação de neutrófilos, macrófagos, sendo o último responsável pela degradação de componentes necróticos na região de cicatrização (Docheva et al., 2015; Egger e Berkowitz, 2017).

Em seguida, temos a fase proliferativa que é caracterizada por uma ampliação da MEC tendínea, a partir de um aumento da expressão de fatores de crescimento que irão aumentar a quantidade de produção e recrutamento de fibroblastos (Thomopoulos et al., 2015). Nessa fase ocorre um aumento da quantidade de células intrínsecas tendíneas advindas do endotendão e epitendão (Ho et al., 2014). A neoangiogênese nesse período de reparo é essencial para trazer nutrientes, citocinas e oxigênio para a manutenção da vitalidade de todas as células envolvidas e oferecer condições favoráveis para que a síntese de colágeno ocorra de forma saudável (Millar et al., 2017). A remodelação é a última fase de cicatrização, nela, o colágeno da cicatriz passa por um processo de reorganização, onde ocorre diminuição das células responsáveis pela síntese do colágeno e diminuição da vascularização (Sharma et al., 2006; Ho et al., 2014). As fibras de colágeno passam a ser alinhadas, o colágeno do tipo 3 é substituído de forma gradual por colágeno do tipo 1 que por dispor de um número maior de ligações cruzadas é mais resistente (Ho et al., 2014; Leong et al., 2020). Nesse período, ocorre aumento da atividade das MMPs que degradam componentes proteicos da MEC e favorecem o remodelamento do tecido e evita a formação de cicatrizes hipertróficas, fibrose tecidual e deposição exagerada de colágeno (Minkwitz et al., 2017). Dessa forma, foram

estabelecidos os *time points* deste estudo, a fim de analisar os genes expressos de acordo com as fases de cicatrização tendínea.

INFLAMAÇÃO	PROLIFERAÇÃO	REMODELAMENTO
Fibroblastos e células inflamatórias: <i>Igf-1, Tgf-β</i>	Proliferação celular: <i>Igf-1, Pdgf, Tgf-β, bfgf, Bmp-12, -13, -14</i>	Remodelamento da MEC: <i>Igf-1</i>
Estimula e regula a expressão de outros fatores de crescimento: <i>Pdgf</i>	Síntese de colágeno e componentes da MEC: <i>Igf-1, Pdgf, bfgf, Tgf-β</i>	Término da proliferação celular: <i>Tgf-β</i>
Promove a angiogênese: <i>Vegf, bfgf</i>	Interção Célula-Matriz: <i>Tgf-β, bFGF</i>	Síntese de colágeno do tipo 1: <i>Tgf-β, Bmp-12, -13, -14</i>

Tabela 1. Expressão do fator de crescimento durante as fases de cicatrização do tendão.

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1; Tgf- β : fator transformador de crescimento β ; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; bFGF: fator de crescimento de fibroblastos básico; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; BMP: proteína morfogenética óssea; MEC: matriz extracelular. Adaptado de Ho et al., 2014).

Apesar de ser em maioria decorrido da prática de esportes, é importante salientar que muitos fatores podem elevar as chances de rotura deste tendão, como a composição deste tecido e estrutura, sua vascularização, sexo, idade, biomecânica, força e flexibilidade muscular, pré disposição genética além de comorbidades que podem afetar o tendão (Corrao et al., 2006).

1.3. MÚSCULO ESQUELÉTICO

1.3.1. Estrutura e função

O músculo esquelético é um tecido altamente plástico e funcional, tendo como funções principais a geração de energia mecânica, sustentação postural, além de funções fisiológicas que abrange desde o metabolismo, termogênese, armazenamento de aminoácidos até secreção de peptídeos para a sinalização celular (Grzelkowska-Kowalczyk, 2016). A organização estrutural do músculo é

basicamente composta por células musculares (fibras musculares ou miofibras) multinucleadas dispostas em feixes e tecido conjuntivo(Heinemeier et al., 2013). Em relação a composição das fibras musculares, sabemos que ela é composta em sua maior parte por proteínas, água e sarcoplasma, sendo a actina e a miosina as proteínas contráteis mais consideráveis do tecido. (Tedesco et al., 2010; Manegold et al., 2019)

A matriz extracelular muscular reveste as fibras musculares e são fundamentalmente compostas por glicoproteínas, proteoglicanos, elastina e colágeno (Tedesco et al., 2010). Algumas das diversas funções da MEC muscular são: oferecer ao tecido suporte estrutural ao tecido (células, vasos, nervos), participa da formação, diferenciação e manutenção do tecido e possibilita a transmissão lateral de força contrátil (Grzelkowska-Kowalczyk, 2016). O tecido conjuntivo intramuscular é formado por três camadas que formam uma rede contínua, onde o primeiro envolve a fibra muscular individualmente (endomísio), a segunda envolve o conjunto de fibras musculares (perimísio) e por último, a camada que recobre todo o músculo (epimísio) (estrutura do tecido conjuntivo intramuscular representado na Figura 1), que apresenta em sua extremidade uma ligação ao tendão (Peng et al., 2017).

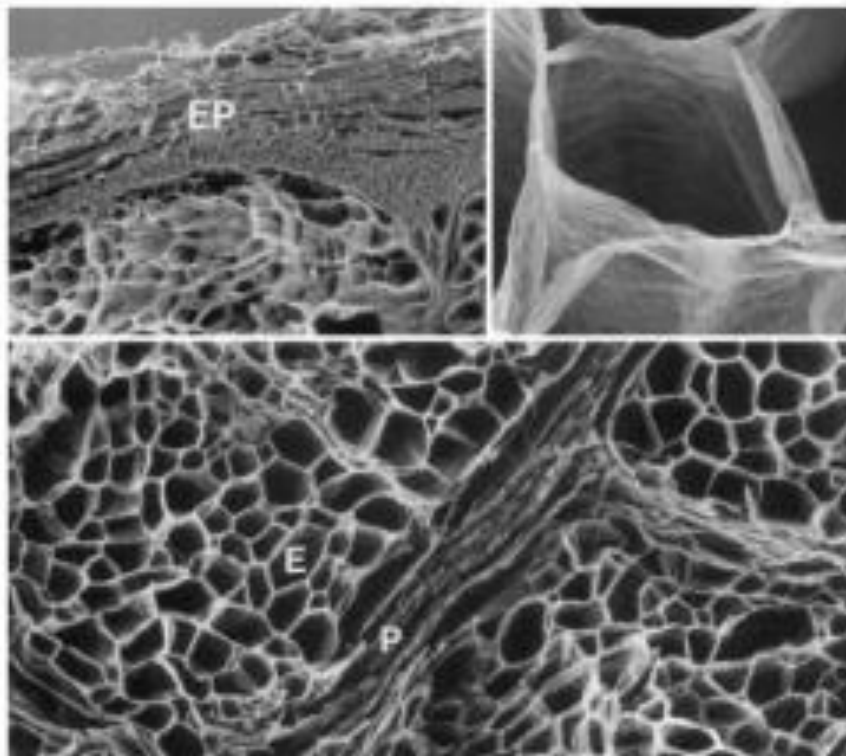


Figura 1. Estrutura do tecido conjuntivo intramuscular.

MEC intramuscular do músculo semitendíneo, imagem obtida através da técnica de micrografia eletrônica após a retirada das células musculares. As siglas presentes na imagem representam: Epimísio (EP) perimísio (P) e endomísio (E) (Nourissat et al., 2015).

Dentre as proteínas mais abundantes da MEC muscular estão o colágeno I e III. O colágeno I fornece ao tecido qualidade de rigidez e resistência e está presente em maior quantidade no perimísio, enquanto o colágeno III oferece elasticidade ao tecido e está mais presente no endomísio e epimísio (Sk et al., 2020). Grande parte dos proteoglicanos (PGs) que estão presentes na MEC muscular são pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) como a biglicana, fibromodulina, lumican e decorina. Esses SLRPs estão associados a glicosaminoglicanos (GAGs) que constantemente exercem a função de acomodar e liberar fatores de crescimento (Kjær, 2004a; Frontera and Ochala, 2015). A comunicação entre o colágeno e os proteoglicanos é essencial para a organização estrutural do tecido, por exemplo, a decorina e a biglicana podem regular a fibrogênese do colágeno do tipo I, regulando sua estrutura e função (Frontera and Ochala, 2015; Mukund e Subramaniam, 2020). Outro grupo de proteínas relevantes na MEC muscular são as glicoproteínas, que são essenciais no processo de adesão célula-matriz (Mukund e Subramaniam, 2020).

A homeostase entre síntese e degradação de componentes proteicos da MEC é essencial para garantir que processos como migração, síntese de miotubos a partir da fusão de mioblastos e outros ocorram e favoreçam a manutenção saudável do tecido (Schiaffino et al., 2013). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco que tem como papel principal a degradação de componentes proteicos da MEC, apesar dos inúmeros tipos de MMPs já mapeados, neste presente trabalho iremos dar maior atenção a gelatinase *Mmp-2*, que possui alta afinidade em quebrar ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas como colágeno, fibronectina, proteoglicanos e laminina (Tedesco et al., 2010), em contrapartida a atividade das MMP's, teremos a atividade dos inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (*Timps*), que têm como função estabilizar ou inibir a atividade proteolítica das MMPs, é importante destacar que a *Timp-1* e *Timp-2* são capazes de inibir a atividade de todos os tipos de MMPs. Estudos mostram que frequentemente essas duas enzimas (*Mmp* e *Timp*) são ativadas juntas em situações como exercício físico, mostrando mais uma estratégia de manutenção da homeostase entre síntese e degradação (Sk et al., 2020).

A homeostase da MEC do músculo depende da atividade de fatores de crescimento, enzimas e proteoglicanos. Nesse contexto, o fator de crescimento transformador beta (*Tgf-β*) é ativado via SMAD que interpreta as informações extracelulares, levando a ativação de genes específicos (*Col1a1* e *Col3a1*) que irão sintetizar o colágeno (Peng et al., 2017). O fator de crescimento do tecido conectivo (*Ctgf*) apresenta via semelhante, onde já foi demonstrado que a expressão excessiva desse gene pode provocar fibrose no tecido muscular (Jakobsen and Krosgaard, 2021). A regulação desse processo parece depender principalmente de proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) que conseguem bloquear a atividade do *Tgf-β* e do *Ctgf*, limitando a formação de novas fibrilas de colágeno, ou seja, atuando na síntese e degradação desse componente da MEC (Grzelkowska-Kowalczyk, 2016). A MEC intramuscular além de ter função estrutural, apresenta uma característica de transmissão de forças lateral entre as outras fibras musculares através das ligações de cisalhamento, esse evento é descrito principalmente no perimísio e endomísio do músculo, que difere a transmissão de força mediada pela junção miotendínea já conhecida (Barin et al., 2019). Sabemos que o músculo e o tendão são

estruturas que se adaptam ao treinamento, porém também respondem de forma negativa ao desuso (Juneja e Veillette, 2013).

1.4. RESPOSTA DA MEC MUSCULAR A ESTÍMULOS MECÂNICOS TENDÃO DEPENDENTE

A homeostase músculo tendínea decorre de uma comunicação bidirecional, que depende das células musculares (miócitos), migração de proteínas, transmissão de forças e fatores de crescimento (Freedman et al., 2018). Os genes *Ctgf* e *Tgf- β* são importantes participantes da síntese do colágeno da matriz extracelular, favorecendo o remodelamento da MEC (Nourissat et al., 2015). O gene *Tgf- β* com suas três isoformas na MEC são responsáveis por codificar proteínas que são importantes durante proliferação, diferenciação e crescimento celular, principalmente do colágeno (Grzelkowska-Kowalczyk, 2016). A sobrecarga do músculo na ausência de lesão pode levar a hipertrofia das fibras musculares e a remodelamento da MEC (Sk et al., 2020), em relação a isso, sabemos que componentes da MEC respondem a presença de carga por meio da mecanotransdução através da quinase de adesão focal (FAK), paxilina, quinase ligada à integrina (ILK) e a proteína quinase ativada por nitrogênio (MAPK) que são essenciais para converter a carga mecânica aplicada no tecido em resposta celular. A ILK é essencial para estabilidade mecânica muscular e na otimização da adesão célula-MEC (Jozsa et al., 1990). Estudos demonstraram que o músculo exposto ao treino de resistência teve como resposta o aumento da quantidade de colágeno I e III, bem como a expressão dos respectivos genes (Alamdari et al., 2009).

Em relação aos eventos moleculares, o aumento em quantidade do colágeno no contexto de exposição à carga no tecido pode estar relacionado à uma maior expressão do fator de crescimento de transformação beta (*Tgf- β* via de sinalização SMAD2/3), importante regulador de síntese proteica (Heinemeier et al., 2013), além disso, já foi observado que o tendão também responde aos diferentes tipos de contração (isométrica, concêntrica e excêntrica), pois os mesmos foram capazes de aumentar a expressão gênica do fator de crescimento do tecido conjuntivo (*Ctgf*), colágeno I e III (Heinemeier et al., 2013). O aumento da expressão do *Tgf- β* nos fibroblastos está ligado a exposição do

tecido a carga mecânica, conseqüentemente ao aumento de componentes estruturais da MEC, como colágeno e proteoglicanos (Grzelkowska-Kowalczyk, 2016) .

1.4.1. Resposta da MEC muscular à lesão tendínea:

Apesar das evidências trazerem as respostas a nível da MEC do tendão mediante a lesão muscular, ainda não há muitas evidências mostrando as alterações moleculares que ocorrem na matriz extracelular quando o tendão é exposto a uma lesão, ou seja, o presente trabalho tem como princípio demonstrar os possíveis mecanismos envolvidos nas modificações que ocorrem na MEC resultante de uma lesão tendínea, tendo em vista a sua importância para a manutenção da MEC e conseqüentemente no tecido, essa manutenção depende entre a homeostase entre síntese e degradação dos componentes estruturais (Wirth, 2021) .

O presente estudo poderia mostrar maneiras que as estruturas importantes pela manutenção da MEC do músculo se comportam com a transecção parcial do tendão calcâneo lesão parcial de tendão, como por exemplo o colágeno I e III (*Col1a1*, *Col3a1*) e seus importantes reguladores *Ctgf* e *Tgf-β*, essenciais para a formação e remodelamento da MEC. Já foi descrito que a imobilização pode aumentar a deposição de colágeno da MEC do tecido muscular, podendo causar fibrose e diminuição da função (Jozsa et al., 1990). Porém, é escasso na literatura quando se trata de estudos que mostrem a influência da lesão tendínea na expressão de genes relacionados à estrutura da MEC muscular.

Acreditamos que, com o presente estudo, nossas descobertas fornecerão um avanço significativo para compreender os mecanismos relacionados com a homeostasia da MEC do músculo exposto à lesão tendínea, tendo em vista que cerca de 50% das lesões que ocorrem no ambiente esportivo acometem o tendão (Egger e Berkowitz, 2017). Promovendo conhecimento a ciência básica e que, futuramente poderá auxiliar teoricamente em estudos da área da saúde, principalmente relacionados à área de reabilitação, cooperando para a prática baseada em evidências, integrando área básicas e prática clínica, beneficiando o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da transecção parcial realizada no terço médio do tendão calcâneo (TC) sobre as propriedades moleculares que influenciam o remodelamento do músculo gastrocnêmio (GA) de ratos após 3, 14, 28 e 55 dias da lesão (*time points* que caracterizam as fases de regeneração tendínea).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a expressão de genes chaves relacionadas à síntese de colágeno (*Ctgf*, *Tgf-β*, *Vgf*, *Timp2*, *Mmp2*, decorina, biglicana e fibromodulina) bem como do colágeno (*Col1a1* e *Col3a1*) do músculo gastrocnêmio em diferentes fases (3, 14, 28 e 55 dias) após transecção parcial do tendão calcâneo.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Trata-se de um estudo de caráter experimental. Foram utilizados 35 ratos Wistar, com peso médio de 250g. Os animais foram mantidos em biotério central da Universidade de Brasília, UnB. 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* (National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. and Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), 2011) . Todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 12 mg/Kg/peso corporal e ketamina 95 mg/Kg/peso corporal). O projeto foi aprovado Comissão de Ética No Uso De Animais (CEUA/UCB) (protocolos 028/15 e 012/19).

3.2. DESIGN EXPERIMENTAL

Foram utilizados 35 animais para as análises de expressão gênica do músculo gastrocnêmio no qual o tendão do calcâneo foi submetido à transecção parcial. Esses animais foram randomizados aleatoriamente em cinco grupos, com 07 animais em cada grupo: Grupo controle, sem transecção parcial do TC (C), grupo 3 dias após transecção parcial do TC (3D), grupo 14 dias após transecção parcial do TC (14D), grupo 28 dias após transecção parcial do TC (28D) e grupo 55 dias após transecção parcial do TC (55D). Esses intervalos de tempo foram escolhidos com a finalidade de analisar as possíveis alterações no músculo em diferentes fases de cicatrização tendínea. O desenho experimental foi detalhado na Figura 2.

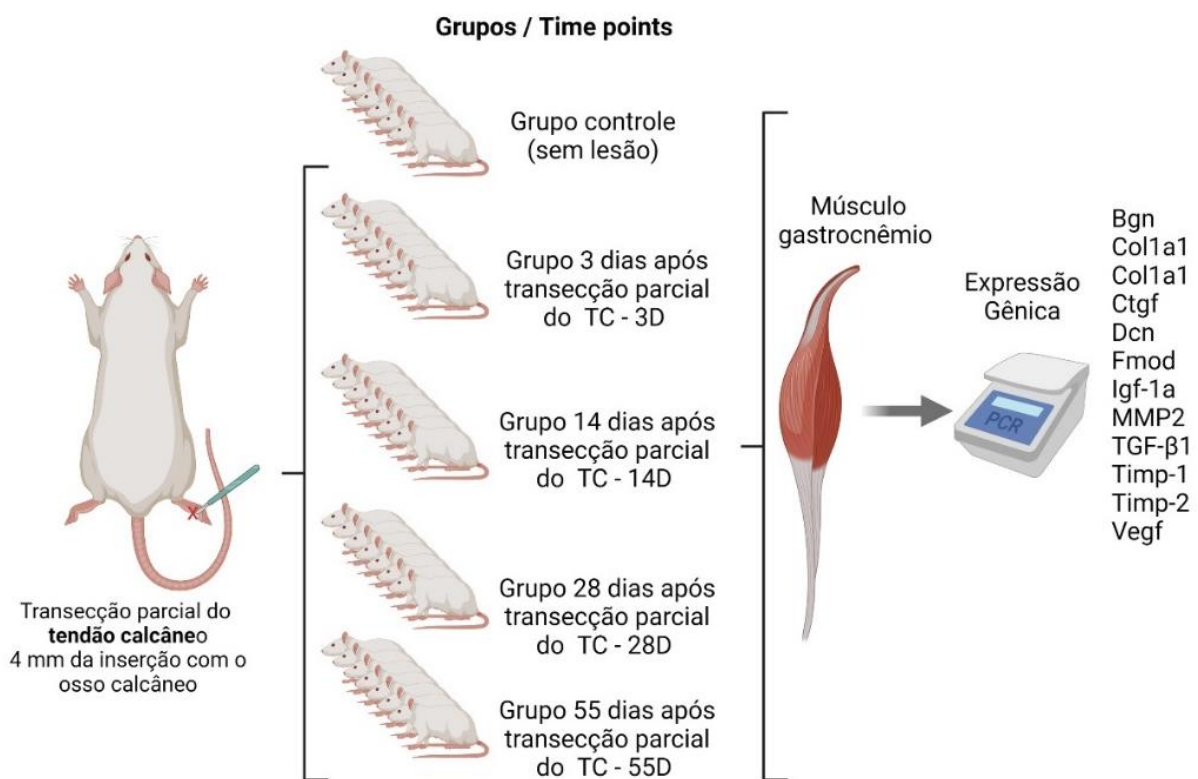


Figura 2. Desenho experimental

35 animais foram utilizados para as análises de expressão gênica do músculo gastrocnêmio no qual o tendão do calcâneo foi submetido à transecção parcial. Esses animais foram randomizados aleatoriamente em cinco grupos, com 07 animais em cada grupo: Grupo controle sem transecção parcial do TC (C), grupo 3 dias após transecção parcial do TC (3D), grupo 14 dias após transecção parcial do TC (14D), grupo 28 dias após transecção parcial do TC (28D) e grupo 55 dias após transecção parcial do TC 55D. Após o time course proposto pelo presente estudo, foram extraídos o músculo gastrocnêmio dos animais e realizado a extração de RNA, cDNA e qPCR para análise da expressão dos seguintes genes: Ctgf, Tgf-β, Vgf, Timp2, Mmp2, decorina, biglicana e fibromodulina bem como dos colágenos (Col1a1 e Col3a1).

3.3. PROTOCOLO DE TRANSECÇÃO PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO

Para induzir a lesão no tendão do calcâneo (TC), os animais foram anestesiados utilizando injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12mg/Kg/peso corporal) e quetamina (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) foi executada na região proximal do tendão a uma distância de 4 mm de sua inserção com o osso calcâneo (Figura 3) conforme protocolo de Bortolazzo (O. Bortolazzo et al., 2020). Posteriormente, os animais foram alocados em gaiolas com água e alimentação ad libitum sendo assim observados até que o efeito do anestésico tenha terminado.



Figura 3. Realização da transecção parcial

Realizada no terço médio do tendão calcâneo, segundo protocolo de Bortolazzo(O. Bortolazzo et al., 2020).

3.4. EUTANÁSIA E COLETA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO (GA)

Após o término do período experimental, foi realizada a coleta dos tecidos com os animais anestesiados, utilizando-se injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12 mg/Kg/peso corporal) e ketamina (95 mg/Kg/peso corporal). Após, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, com as patas presas e mantidas em extensão para, assim, efetuar a retirada do GA. A porção (superior) foi utilizada para a extração de RNA total. Os músculos foram então congelados e armazenados em freezer a -86°C . Em seguida, os animais foram eutanasiados com overdose anestésica. Após o time-course proposto pelo presente estudo, o músculo gastrocnêmio foi pesado e dividido em duas porções similares, com um corte horizontal no seu ventre, para análises moleculares e morfológicas do tecido. A porção (superior) foi utilizada no presente estudo para a extração de RNA total.

3.5. ANÁLISES

3.5.1. Extração de RNA

Para extrair o RNA do músculo gastrocnêmio, amostras de 35 animais (07 por grupo) foram homogeneizadas em tubos contendo 5 esferas de aço inoxidável (diâmetro, 2.3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) e partículas afiadas de carbonato de silício (1 mm) (BioSpec Products) através da máquina FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Posteriormente, o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen - EUA) conforme as instruções do fabricante. Um espectrofotômetro, NanoDrop® (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) foi utilizado para quantificar a concentração de RNA total extraído de cada amostra. Todas as amostras apresentaram uma relação de absorbância A_{260} / A_{280} de entre 1,8 e 2,0. Para evitar contaminação das amostras por DNA após extração, elas foram tratadas com TURBO DNA-freeKit (Ambion – Life Technologies – 1907M) conforme recomendações do fabricante.

3.5.2. Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Para avaliar a expressão gênica do músculo GA um total de 1µg de RNA, extraídos de cada amostra foram convertidos em cDNA (volume final 20 µl), usando-se a transcriptase reversa SuperScript® VILO™ MasterMix (Invitrogen-Cat. 11755-010), de acordo com o manual do fabricante. Para realizar a transcrição reversa os seguintes parâmetros de ciclagem foram utilizados: (1) amostras incubadas à 25° por 10 minutos; (2) amostras incubadas à 42°C por 60 minutos; (3) amostras incubadas à 85°C por 5 minutos. Ao final da reação as amostras foram armazenadas no freezer à uma temperatura -20°C. Para as reações de qPCR, um sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado conforme recomendações do fabricante GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega – A6102). Para tanto, foram homogeneizados 10µL de GoTaq Probe qPCR Master Mix; 1µL do primer 20x do gene alvo (Tabela 1) e uma quantidade de cDNA que foi determinada conforme curva padrão padronizada para cada gene que variou de 8-40ng em um volume final de 20µL.

Para a reação os seguintes parâmetros de ciclagem térmica foram utilizados: (1) 40°C durante 15 minutos; (2) 95°C durante 2 minutos (3) 95°C durante 15 segundos; (4) 60°C durante 1 minuto perfazendo um total de 40 ciclos. A curva de melting foi analisada após o término da corrida para confirmar a especificidade dos produtos amplificados. A expressão relativa dos produtos de qPCR foi determinada com auxílio da equação a seguir: $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). A reação de amplificação foi efetuada pelo Quant Studio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) para os seguintes genes: *Bgn*, *Col1a1*, *Col1a1*, *Ctgf*, *Dcn*, *Fmod*, *Igf-1a*, *Mmp2*, *Tgf-β1*, *Timp-1*, *Timp-2* e *Vegf*. Para cada gene, todas as amostras foram amplificadas simultaneamente em formato de duplicatas da mesma amostra de cDNA em uma única corrida. A expressão de cada gene alvo foi normalizada baseado na expressão do gene constitutivo beta actina que foi utilizado como controle interno da expressão de RNAm devido a menor variabilidade intra e intergrupo. É importante salientar que a eficiência de reação de cada gene analisado no presente estudo foi determinada através de uma curva de padronização que apresentou parâmetros referenciais de slope igual a -3.3, R2 = 0.9–1.0 demonstrando eficiência acima de 90%.

RNA_m	CÓDIGO (LIFE TECHNOLOGIES)
<i>Bgn</i>	rn01529736
<i>Col1a1</i>	rn01463849
<i>Col1a1</i>	rn01437681
<i>Ctgf</i>	rn01537279
<i>Dcn</i>	rn01503161
<i>Fmod</i>	rn00589918
<i>Igf-1a</i>	rn00710306
<i>Mmp2</i>	rn01538170
<i>Tgf-β1</i>	rn00572010
<i>Timp-1</i>	rn01430873
<i>Timp-2</i>	rn00573232
<i>Vegf</i>	rn01511602

Tabela 2. Lista de genes testados

Biglicana (Bgn), Cadeia alfa 1 de colágeno tipo I (Col1a1), Cadeia alfa 1 de colágeno tipo III (Col1a1), fator de crescimento do tecido conjuntivo (Ctgf), Decorina (Dcn), Fibromodulina (Fmod), Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (Igf-1a), Metaloproteinase de matriz do tipo 2 (Mmp-2), Fator de crescimento transformador beta 1 (Tgf-β1), Inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz do tipo 1 (Timp-1), Inibidor tecidual da metaloproteinase da matriz do tipo 2 (Timp-2), e Fator de crescimento do endotelial vascular (Vegf).

3.6. ANÁLISE DE DADOS

A normalidade dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene foi utilizado para analisar a homogeneidade da variância. Todas as variáveis apresentaram distribuição normal e homogênea. A ANOVA one-way foi utilizada para comparar a expressão gênica no músculo gastrocnêmico entre os grupos experimentais. Quando foi detectada uma diferença significativa, o teste post hoc de Tukey foi aplicado para identificar onde as mesmas ocorreram. Um nível alfa de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. O GraphPad Prism Software 8.0 (San Diego, Califórnia) foi utilizado para a análise estatística.

4. RESULTADOS

Foi observado que três dias após a transecção parcial do TC ocorreu aumento nos níveis de RNAm de *Col1a1* na MEC do músculo GA, quando comparado ao grupo 55D (Figura 4A). O grupo 3D, apresentou maior expressão gênica de *Tgf-β*, quando comparado ao grupo 28D (Figura 4C), e do *Ctgf* quando comparado ao grupo C (Figura 4D).

Três dias após a transecção parcial do TC, apresentou maior expressão gênica de *Mmp2* quando comparado ao grupo C (Figura 5A). Observamos também que três dias após a transecção parcial do TC, ocorreu maior expressão gênica de *Timp1* quando comparado ao grupo C e ao grupo 14D (Figura 5B).

Já a expressão de *Timp2* aumentou no grupo 3D, quando comparado ao grupo C e ao grupo 55D (Figura 5C). Ainda observamos que três dias após a transecção parcial do TC, ocorreu maior expressão de *biglicana* na MEC do músculo GA quando comparado ao grupo C, ao grupo 14D e ao grupo 28D (Figura 5E).

Não foi constatado diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais quanto a expressão gênica de *Col1a1* (Figura 4A), *Vegf* (Figura 4F), *Igf1a* (Figura 4E), *decorina* (Figura 5D) e *fibromodulina* (Figura 5F) ($p > 0,05$).

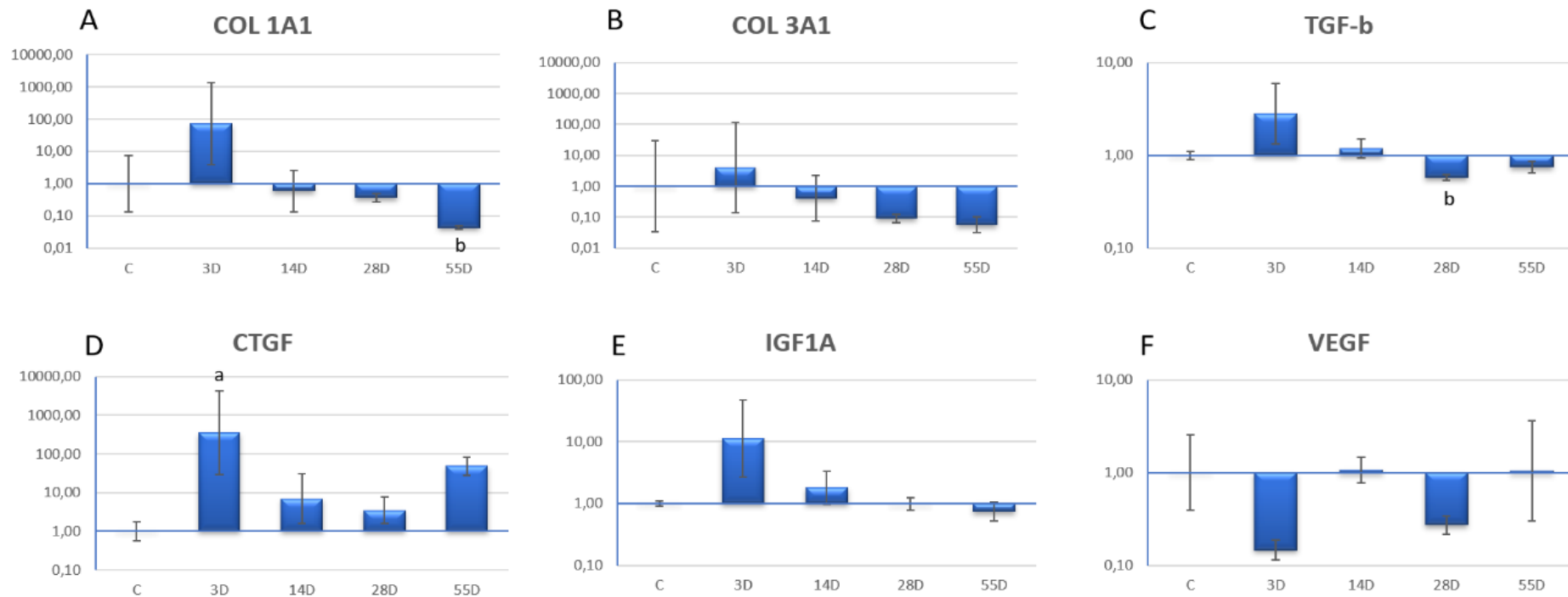


Figura 4. Análise da expressão gênica

Análise da expressão gênica no músculo gastrocnêmico após à transecção parcial do tendão calcâneo. (*Col1a1*): cadeia de colágeno tipo I alfa 1; (*Col3a1*): cadeia alfa 1 de colágeno tipo III; (*Tgf-β*): Fator de crescimento transformação beta; (*Ctgf*): Fator de crescimento do tecido conjuntivo; (*Igf-1a*): Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; (*Vegf*): Fator de crescimento endotelial vascular; Os grupos experimentais: controle (C; n= 10), 3 dias após transecção parcial do TC (3D; n= 10), 14 dias após transecção parcial do TC (14D; n=10), após transecção parcial do TC (28D; n=10) e 55 dias após transecção parcial do TC (55D; n=10). Diferenças significativas, a: diferente do grupo controle; b: diferente do grupo 3D.; $p \leq 0,05$.

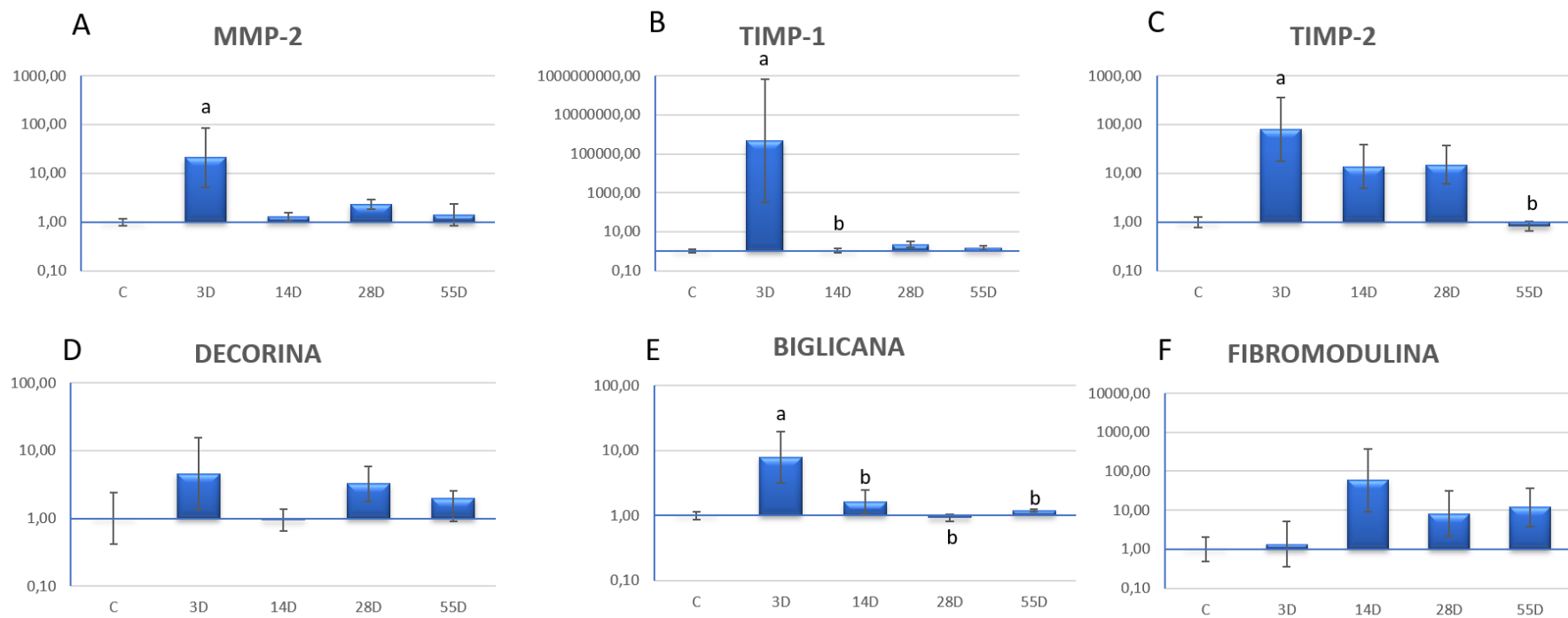


Figura 5. Análise da expressão gênica

Análise da expressão gênica no músculo gastrocnêmico após à transecção parcial do tendão calcâneo. (*Mmp-2*): Metaloproteinase de matriz do tipo 2; (*Timp-1*): Inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz do tipo 1; (*Timp-2*): Inibidor tecidual da metaloproteinase da matriz do tipo 2; (*Dcn*): Decorina; (*Bgn*): Biglicano e (*Fmod*): Fibromodulina. Os grupos experimentais: controle (C; n= 10), 3 dias após transecção parcial do TC (3D; n= 10), 14 dias após transecção parcial do TC (14D; n=10), após transecção parcial do TC (28D; n=10) e 55 dias após transecção parcial do TC (55D; n=10). Diferenças significativas, a: diferente do grupo controle; b: diferente do grupo 3D.; $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Por ser um tendão mais suscetível a rupturas, lesões do TC por sobrecarga têm sido comuns, principalmente com o aumento da frequência da população à prática de esportes e atividades físicas (Thomopoulos et al., 2015). Portanto, vê-se a importância de analisar evidências que demonstrem a relação músculo-tendão e como essa interação pode colaborar na tomada de decisão para novos tratamentos e futuras pesquisas em humanos. Os tendões são estruturas de extrema importância na transmissão de força entre os músculos e sistema esquelético, contudo, sabe-se que lesões causadas no tendão, especialmente no TC, são de difícil reparo, já que a vascularização não é tão eficaz nesse tipo de tecido (Corps et al., 2006). As fases de cicatrização desses tecidos se dão por etapas, onde nos primeiros dias ocorre a fase inflamatória aguda (Guyton - Tratado de Fisiologia Médica. 13a Ed.), seguida de reparação e fase proliferativa, evoluindo para o remodelamento da MEC, de forma que no final do processo ocorre a etapa de maturação tecidual (Minkwitz et al., 2017).

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito da transecção parcial no terço médio do TC sobre as propriedades moleculares que implicam o remodelamento do músculo GA de ratos após 3, 14, 28 e 55 dias após a lesão (a partir da avaliação da expressão de genes chaves relacionadas à síntese de colágeno (*Ctgf*, *Tgf-β*, *Vgf*, *Timp2*, *Mmp2*, *decorina*, *biglicana* e *fibromodulina*) bem como, dos colágenos (*Col1a1* e *Col3a1*) no músculo GA.

O nosso estudo foi capaz de trazer resultados relevantes em relação a resposta muscular à transecção parcial tendínea. Os principais resultados confirmam em partes a hipótese inicial, mostrando que a transecção parcial do TC exerce efeito sobre a expressão de genes chaves da MEC do músculo GA (*Ctgf*, *Tgf-β*, *Vgf*, *Timp2*, *Mmp2*, *decorina*, *biglicana* e *fibromodulina*) bem como, do colágeno (*Col1a1* e *Col3a1*).

A modulação desses genes no músculo pode ser afetada pela interação músculotendínea da junção miotendínea (JMT), que corresponde à região de transição entre tecido muscular e tecido tendíneo. Essa estrutura, composta por tecido conjuntivo, funciona como um sistema integrado entre tendão e músculo, sendo responsável por transmitir força, armazenar energia para a contração muscular e auxiliar em parte da nutrição do tendão, onde passam os vasos

sanguíneos. É, também, capaz de se adaptar tanto fisiologicamente, como funcionalmente aos estímulos provindos do músculo e/ou do tendão (Kjær, 2004), o que pode implicar na transmissão de sinais entre esses tecidos para adaptação e plasticidade tecidual, como ocorre, por exemplo, ao exercitar a musculatura. É, também, capaz de se adaptar tanto fisiologicamente, como funcionalmente (Kjær, 2004), aos estímulos provindos do músculo e/ou do tendão, o que pode implicar na transmissão de sinais entre esses tecidos para adaptação e plasticidade tecidual, como ocorre, por exemplo, ao exercitar a musculatura. É esse sistema integrado que, possivelmente, age como ponte para sinalização do processo reparatório do tecido, e, conseqüentemente, para expressão de genes que participam do reparo tecidual, decorrentes de uma ruptura tendínea.

Seguindo este pensamento, elaboramos a hipótese de que uma lesão parcial (transecção) do tendão calcâneo poderia modular a expressão dos genes que fazem parte da manutenção e homeostasia da MEC, sugerindo a plasticidade do músculo em resposta à transecção parcial do TC.

Os principais achados do estudo até o momento apontam que, logo após o terceiro dia de transecção parcial do TC, ou seja, ao final da fase inflamatória aguda, ocorre um aumento nos níveis de RNAm de *Col1a1*, *Ctgf* e *Tgf-β* na MEC do músculo GA. Estudos anteriores também demonstraram esse aumento de expressão do *Ctgf* e, conseqüentemente, aumento da síntese de colágeno em resposta a lesão aguda durante os primeiros dias da fase inflamatória (Galloway et al., 2013).

Quanto ao colágeno do tipo 3, devido sua tendência à de formação de tramas iniciais para futura substituição pelo colágeno tipo 1, sua síntese é maior, principalmente, em lesões mais recentes, com maior produção durante os 3 primeiros dias de lesão, com produção novamente aumentada durante a formação do tecido de granulação (Mukund e Subramaniam, 2020).

O aumento dos níveis de *Tgf-β* e *Ctgf* estão relacionados a ativação de genes responsáveis pela síntese do colágeno, em fases iniciais da lesão. Tendo em vista que o *Ctgf* é um importante regulador da síntese do colágeno na MEC, codificando proteínas que são importantes durante proliferação, diferenciação e crescimento celular, podemos esperar uma expressão maior nas fases iniciais da lesão oferecendo condições estruturais fisiológicas favoráveis à MEC. No

nosso modelo experimental, no entanto, não foi observado diferenças na expressão de colágeno logo após a transecção, pelo contrário, o *Col1a1* por exemplo, diminui a expressão após 55 dias da transecção. Sua atenuação em fases mais tardias da lesão pode levar a fibrose tecidual (Kjær, 2004). Era esperado que os níveis de expressão de *Col1a1* acompanhassem o aumento da expressão de *Ctgf*, em virtude deste último agir como um estimulador para síntese de colágeno na MEC (Frazier et al., 1996), demonstrando que foi iniciado o processo de reparo tecidual com reposição de colágeno do tipo I. O *Ctgf* também tem ação moduladora sobre a atividade do *Tgf-β*, interagindo de forma direta na sua via de sinalização, ativando seus sinais e estimulando sua interação com os receptores da MEC (Balbino et al., 2005), acompanhando sinergicamente à medida que os níveis de *Ctgf* se alteram (Abreu et al., 2002), o que nos leva a entender o sutil aumento, porém não significativo, do *Tgf-β* no grupo 3D após transecção. A elevação dos níveis dessas proteínas tem tido papel fundamental no reparo e manutenção das propriedades mecânicas do tendão, visto que o *Ctgf* é também responsável pela angiogênese, proliferação, migração celular e reparos teciduais enquanto o *Tgf-β* executa a regulação dessas ações (Liu et al., 2015).

No presente estudo, observamos que além do *Ctgf*, a *Mmp2*, *Timp1*, *Timp2* e a *biglicana* também apresentaram aumento no 3º dia após a transecção parcial do tendão. Com o aumento de *Mmp-2* (Figura 4A), nota-se um aumento expressivo de *Timp-1* (Figura 4B), seguido de elevação também da *Timp-2* (Figura 4C), que coincidem com achados anteriores sobre a função das *Timps*, principalmente da *Timp-1*, como inibidora do excesso de degradação da matriz realizada pela *Mmp-2* nos primeiros dias e tendo essa inibição mantida pela *Timp-2* nos dias seguintes como um inibidor secundário (Kjær, 2004b; Vieira et al., 2012). O *Tgf-β*, além de estimular a síntese do colágeno, também estimula a *Timp*, ou seja, favorecendo um acúmulo de colágeno, tendo em vista a atenuação da expressão de *Mmp2*, mostrando seu importante papel na manutenção e regeneração tecidual (Kjær, 2004).

Com este excesso de degradação de colágeno que é causado pela *Mmp-2* nos primeiros dias, também aguardava-se observar o aumento de *Col1a1*, como pôde ser verificado no gráfico (Figura 3A). A expressão de *Col1a1* nos primeiros dias tem como função balancear o dano, realizando sua reposição. Além disso,

os estudos como os de Kjær, 2004 e de Corps et al., 2006 relatam a elevação dos níveis de RNAm para colágenos tipo I e III, bem como de proteoglicanos e fatores angiogênicos, como elementos importantes no processo de reparo do tecido tendíneo.

Observamos que três dias após a transecção parcial do TC, ocorreu também maior expressão gênica de *biglicana* na MEC do músculo GA. A biglicana é um proteoglicano que confere organização à MEC, auxiliando na fibrilogênese e coordenando a espessura das fibrilas de colágeno, o que confere maior resistência ao tecido tendíneo quando em fase madura, sendo, em estudos, comumente regulada pela decorina (Galloway et al., 2013; Nourissat et al., 2015; Peng et al., 2017). Já foi demonstrado que na ausência da *decorina*, houve formação inadequada de componentes da MEC tendínea como, por exemplo, das fibrilas de colágeno (Zhang et al., 2005). A expressão aumentada de *biglicana* no grupo do 3º dia descreve um rearranjo das fibras colágenas, desempenhando o papel de auxiliar na integridade da MEC, indicando que uma plasticidade tecidual está ocorrendo naquela etapa do processo de cicatrização. Além disso, o *Tgf-β* induz o aumento da expressão de proteoglicanos como a biglicana (Kjær, 2004), que corresponde aos nossos achados, tendo o aumento da expressão de ambos os genes na fase aguda de regeneração do tecido.

O imobilismo pós lesão pode também justificar em parte essas alterações, já tendo sido demonstrado em estudo anterior que a ausência de tensão foi capaz de causar alterações morfológicas em fibroblastos e na expressão do colágeno, ou seja, embora o tecido seja capaz de responder à presença de tensão, a sua ausência tem o poder de modificar componentes estruturais da MEC. Além disso, o imobilismo pode levar ao aumento da expressão da *Mmp2* pré e pós tradução, levando a um aumento inicial da degradação de colágeno e também ao aumento da quantidade de colágeno do tipo III no perimísio após período de imobilismo (Kjær, 2004; Egger e Berkowitz, 2017).

Nos resultados obtidos, não foi observada diferença significativa na expressão gênica de *Col3a1*, *Igf1*, *Vegf* (Figura 3B, E e F, respectivamente), *decorina* e fibromodulina (Figura 4D e F, respectivamente). Entretanto, a análise desses genes será refeita posteriormente, uma vez que novos recursos foram adquiridos. Destacamos que esses achados são preliminares e partes de um grande estudo, de maneira que investigaremos também a morfologia e a

presença de proteínas mais importantes no músculo, considerando que a expressão gênica responde apenas em partes à nossa pergunta. Dessa forma, ainda há muito o que investigar, como a expressão de outros genes que estejam relacionados a inflamação, a atrofia e a hipertrofia do músculo.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo foi capaz de confirmar parcialmente nossa hipótese acerca dos genes expressos no músculo GA em resposta a transecção parcial realizada no TC. A partir dos resultados obtidos, no 3º dia após a lesão obtivemos maior pico de expressão de genes, como *Tgf-β*, *Ctgf*, *Timp-1*, *Timp-2* e *Mmp-2*, indicando sua participação no reparo tendíneo logo após a fase inflamatória aguda.

Nosso estudo concede informações importantes para melhor entendimento das interações músculo-tendão, bem como os mecanismos relacionados à homeostasia da MEC muscular mediante à transecção parcial do TC. Com isso, salientamos a importância de estudos futuros que investiguem de forma mais detalhada quanto a comunicação entre músculo-tendão e mecanismos envolvidos. Ressaltamos ainda, a relevância da realização de estudos futuros em humanos para analisar acuradamente a relação músculo-tendão, que promovam evidências com finalidade de auxiliar na tomada de decisão clínica para técnicas mais apropriadas em reabilitação de lesões relacionadas ao tendão.

7. REFERÊNCIAS

- Abreu, J. G., Ketpura, N. I., Reversade, B., and de Robertis, E. M. (2002). Connective-tissue growth factor (ctgf) modulates cell signalling by bmp and TGF- β . *Nature Cell Biology* 4, 599–604. doi: 10.1038/ncb826.
- Alamdari, N., O’Neal, P., and Hasselgren, P. O. (2009). Curcumin and muscle wasting-A new role for an old drug? *Nutrition* 25, 125–129. doi: 10.1016/j.nut.2008.09.002.
- Andarawis-Puri, N., Flatow, E. L., and Soslowky, L. J. (2015a). Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. in *Journal of Orthopaedic Research* (John Wiley and Sons Inc.), 780–784. doi: 10.1002/jor.22869.
- Balbino, C. A., Pereira, L. M., and Curi, R. (2005). Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. doi: 10.1590/S1516-93322005000100004.
- Barin, F. R., de Sousa Neto, I. V., Vieira Ramos, G., Szojka, A., Ruivo, A. L., Anflor, C. T. M., et al. (2019). Calcaneal Tendon Plasticity Following Gastrocnemius Muscle Injury in Rat. *Frontiers in Physiology* 10. doi: 10.3389/fphys.2019.01098.
- Beckham, C., Dimond, R., and Greenlee, T. K. The Role of Movement in the Development of a Digital Flexor Tendon.
- Corps, A. N., Robinson, A. H. N., Movin, T., Costa, M. L., Hazleman, B. L., and Riley, G. P. (2006). Increased expression of aggrecan and biglycan mRNA in Achilles tendinopathy. *Rheumatology* 45, 291–294. doi: 10.1093/rheumatology/kei152.
- Corrao, G., Zambon, A., Bertù, L., Bertù, B., Mauri, A., Paleari, V., et al. (2006). Evidence of Tendinitis Provoked by Fluoroquinolone Treatment A Case-Control Study.
- Dederer, K. M., and Tennant, J. N. (2019). Anatomical and Functional Considerations in Achilles Tendon Lesions. *Foot and Ankle Clinics* 24, 371–385. doi: 10.1016/j.fcl.2019.04.001.
- Docheva, D., Müller, S. A., Majewski, M., and Evans, C. H. (2015). Biologics for tendon repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 84, 222–239. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.015.
- Egger, A. C., and Berkowitz, M. J. (2017a). Achilles tendon injuries. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 10, 72–80. doi: 10.1007/s12178-017-9386-7.
- Franchi, M., Trirè, A., Quaranta, M., Orsini, E., and Ottani, V. (2007). Collagen structure of tendon relates to function. *ScientificWorldJournal* 7, 404–420. doi: 10.1100/tsw.2007.92.
- Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H., and Grotendorst, G. R. (1996). Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1111/1523-1747.ep12363389.
- Freedman, B. R., Rodriguez, A. B., Leiphart, R. J., Newton, J. B., Ban, E., Sarver, J. J., et al. (2018). Dynamic Loading and Tendon Healing Affect Multiscale Tendon Properties and ECM Stress Transmission. *Scientific Reports* 8. doi: 10.1038/s41598-018-29060-y.

- Frontera, W. R., and Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics* 45, 183–195. doi: 10.1007/s00223-014-9915-y.
- Galloway, M. T., Lalley, A. L., and Shearn, J. T. (2013a). The role of mechanical loading in tendon development, maintenance, injury, and repair. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 95, 1620–1628. doi: 10.2106/JBJS.L.01004.
- Grzelkowska-Kowalczyk, K. (2016). “The Importance of Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development and Function,” in *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body* (InTech). doi: 10.5772/62230.
- Guyton - Tratado de Fisiología Médica. 13a Ed.
- Heinemeier, K. M., Schjerling, P., Heinemeier, J., Magnusson, S. P., and Kjaer, M. (2013). Lack of tissue renewal in human adult Achilles tendon is revealed by nuclear bomb 14C. *FASEB Journal* 27, 2074–2079. doi: 10.1096/fj.12-225599.
- Ho, J. O. Y., Sawadkar, P., and Mudera, V. (2014). A review on the use of cell therapy in the treatment of tendon disease and injuries. *Journal of Tissue Engineering* 5. doi: 10.1177/2041731414549678.
- Jakobsen, J. R., and Krogsgaard, M. R. (2021). The Myotendinous Junction—A Vulnerable Companion in Sports. A Narrative Review. *Frontiers in Physiology* 12. doi: 10.3389/fphys.2021.635561.
- Jozsa, L., Kannus, P., Thoring, J., Reffy, A., and Jarvinen, M. (1990). THE EFFECT OF TENOTOMY AND IMMOBILISATION INTRAMUSCULAR CONNECTIVE TISSUE A MORPHOMETRIC AND MICROSCOPIC STUDY IN RAT CALF MUSCLES.
- Juneja, S. C., and Veillette, C. (2013). Defects in Tendon, Ligament, and Enthesis in Response to Genetic Alterations in Key Proteoglycans and Glycoproteins: A Review. *Arthritis* 2013, 1–30. doi: 10.1155/2013/154812.
- Kjær, M. (2004a). Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiological Reviews* 84, 649–698. doi: 10.1152/physrev.00031.2003.
- Lavagnino, M., Wall, M. E., Little, D., Banes, A. J., Guilak, F., and Arnoczky, S. P. (2015). Tendon mechanobiology: Current knowledge and future research opportunities. in *Journal of Orthopaedic Research* (John Wiley and Sons Inc), 813–822. doi: 10.1002/jor.22871.
- Leong, N. L., Kator, J. L., Clemens, T. L., James, A., Enamoto-Iwamoto, M., and Jiang, J. (2020). Tendon and Ligament Healing and Current Approaches to Tendon and Ligament Regeneration. *Journal of Orthopaedic Research* 38, 7–12. doi: 10.1002/jor.24475.
- Liu, J., Tao, X., Chen, L., Han, W., Zhou, Y., and Tang, K. (2015). CTGF positively regulates BMP12 induced tenogenic differentiation of tendon stem cells and signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry* 35, 1831–1845. doi: 10.1159/000373994.

- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Manegold, S., Tsitsilonis, S., Gehlen, T., Kopf, S., Duda, G. N., and Agres, A. N. (2019). Alterations in structure of the muscle-tendon unit and gait pattern after percutaneous repair of Achilles tendon rupture with the Dresden instrument. *Foot and Ankle Surgery* 25, 529–533. doi: 10.1016/j.fas.2018.04.004.
- Millar, N. L., Murrell, G. A. C., and McInnes, I. B. (2017). Inflammatory mechanisms in tendinopathy - towards translation. *Nature Reviews Rheumatology* 13, 110–122. doi: 10.1038/nrrheum.2016.213.
- Minkwitz, S., Schmock, A., Kurtoglu, A., Tsitsilonis, S., Manegold, S., Wildemann, B., et al. (2017). Time-dependent alterations of MMPs, TIMPs and tendon structure in human achilles tendons after acute rupture. *International Journal of Molecular Sciences* 18. doi: 10.3390/ijms18102199.
- Mukund, K., and Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 12. doi: 10.1002/wsbm.1462.
- Nakamoto, T., and Matsukawa, K. (2007). Muscle mechanosensitive receptors close to the myotendinous junction of the Achilles tendon elicit a pressor reflex. *Journal of Applied Physiology* 102, 2112–2120. doi: 10.1152/jappphysiol.01344.2006.
- National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., and Institute for Laboratory Animal Research (U.S.) (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.
- Nourissat, G., Berenbaum, F., and Duprez, D. (2015a). Tendon injury: From biology to tendon repair. *Nature Reviews Rheumatology* 11, 223–233. doi: 10.1038/nrrheum.2015.26.
- O. Bortolazzo, F., D. Lucke, L., de Oliveira Fujii, L., Marqueti, R. de C., Vieira Ramos, G., Theodoro, V., et al. (2020a). Microcurrent and adipose-derived stem cells modulate genes expression involved in the structural recovery of transected tendon of rats. *FASEB Journal* 34, 10011–10026. doi: 10.1096/fj.201902942RR.
- Peng, W. C., Chang, Y. P., Chao, Y. H., Fu, S. N., Rolf, C., Shih, T. T., et al. (2017). Morphomechanical alterations in the medial gastrocnemius muscle in patients with a repaired Achilles tendon: Associations with outcome measures. *Clinical Biomechanics* 43, 50–57. doi: 10.1016/j.clinbiomech.2017.02.002.
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., and Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal* 280, 4294–4314. doi: 10.1111/febs.12253.
- Sharma, P., Maffulli, N., and Maffulli, N. (2006). Tendon structure Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling.

- Sk, H., Ratzer J, and JI, N. (2020). Downloaded from journals.physiology.org/journal/jappl at Biblio Interuniversitaire De Sante.
- Tedesco, F. S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G., and Cossu, G. (2010). Repairing skeletal muscle: Regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *Journal of Clinical Investigation* 120, 11–19. doi: 10.1172/JCI40373.
- Thomopoulos, S., Parks, W. C., Rifkin, D. B., and Derwin, K. A. (2015a). Mechanisms of tendon injury and repair. in *Journal of Orthopaedic Research* (John Wiley and Sons Inc.), 832–839. doi: 10.1002/jor.22806.
- Valdivia, M., Vega-Macaya, F., and Olgún, P. (2017). Mechanical control of myotendinous junction formation and tendon differentiation during development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5. doi: 10.3389/fcell.2017.00026.
- Vieira, P., da Ré Guerra, F., de Oliveira, P., Dos, M., De, S., and Pimentel, R. (2012). ALTERATIONS IN THE ACHILLES TENDON AFTER INFLAMMATION IN SURROUNDING TISSUE. doi: 10.1590/S1413-78522012000500004 .
- Wang, J. H. C. (2006). Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics* 39, 1563–1582. doi: 10.1016/j.jbiomech.2005.05.011.
- Wirth, B. (2021). Spinal Muscular Atrophy: In the Challenge Lies a Solution. *Trends in Neurosciences* 44, 306–322. doi: 10.1016/j.tins.2020.11.009.
- Zhang, G., Young, B. B., Ezura, Y., Favata, M., Soslowsky, L. J., Chakravarti, S., et al. (2005). Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* .

CERTIFICADO

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

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

Brasília, 18 de Novembro de 2015.

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



Anexo II-Normas da revista escolhida por estudante e orientador.



Frontiers in Physiology

Impact Factor: 4.566

Qualis: A1

2. Manuscript Guidelines

2.3. Manuscript Requirements and Style Guide

2.3.1.1. Article Type

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript, and to comply with the article-type descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page. Please note that not all articles types are available for all journals/specialties. Please contact us if you have any questions. Please pay close attention to the word count limits. Focused Reviews, Frontiers Commentaries and Grand Challenge articles are invited by the chief editor and cannot be part of any Frontiers Research Topic. Unless you were contacted by the chief editor or the editorial office regarding the submission of a paper selected for tier 2 promotion, do not submit a Focused Review or a Frontiers Commentary - instead, submit a Review or a General Commentary. Please see Additional Requirements for specific article types including Focused Reviews, General Commentaries, Protocols and Data Reports.

2.3.1.2. Manuscript Length

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

2.3.1.3. Language Editing

Frontiers requires manuscripts submitted to meet international standards for English language to be considered for publication. For authors who would like their manuscript to receive language editing or proofing to improve the clarity of the manuscript and help highlight their research, Frontiers recommends the language-editing services provided by the following external partners:

Editage

Frontiers is pleased to recommend language-editing service provided by our external partner Editage to authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing. These services may be particularly useful for researchers for whom English is not the primary language. They can help to improve the grammar, syntax and flow of your manuscripts prior to submission.

Frontiers authors will receive a 10% discount by visiting the following link:

<http://editage.com/frontiers/>

The Charlesworth Group

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

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

2.3.1.4. Language Style

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

2.3.1.5. Search Engine Optimization (SEO)

There are a few simple ways to maximize your article's discoverability. Follow the steps below to improve search results of your article: 85 Include a few of your article's keywords in the title of the article; Do not use long article titles; Pick 5 to 8 keywords using a mix of generic and more specific terms on the article subject(s); Use the maximum amount of keywords in the first 2 sentences of the abstract; Use some of the keywords in level 1 headings.

2.3.1.6. Title

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title. Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative.

Authors should try to avoid, if possible:

Titles that are a mere question without giving the answer. Unambitious titles, for example starting with "Towards", "A description of", "A characterization of", "Preliminary study on". Vague titles, for example starting with "Role of...", "Link between...", "Effect of..." that do not specify the role, link, or effect. Include terms that are out of place, for example the taxonomic affiliation apart from species name. For Corrigenda, Book Reviews, General Commentaries and Editorials, the title of your manuscript should have the following format: "Corrigendum: Title of original article" "Book Review: Title of book" General Commentaries "Commentary: Title of original article" (This does not apply to Frontiers Commentaries) 86 "Response: Commentary: Title of original article" "Editorial: Title of Research Topic" For article types requiring it, the running title should be a maximum of 5 words in length. (see Summary Table)

2.3.1.7. Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names). Example: Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA. The Corresponding Author(s) should be marked with an asterisk. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section. CORRESPONDENCE: Dr. Max Maximus maximus@gmail.com If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the

correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

2.3.1.8. Consortium/Group and Collaborative Authors

Consortium/group authorship should be listed in the manuscript with the other author(s). In cases where authorship is retained by the consortium/group, the consortium/group should be listed as an author separated by “,” or “and”. Consortium/group members can be listed in a separate section at the end of the manuscript. Example: John Smith, Barbara Smith and The Collaborative Working Group. ⁸⁷ In cases where work is presented by the author(s) on behalf of a consortium/group, it should be included in the manuscript author list separated with the wording “for” or “on behalf of”. The consortium/group will not retain authorship. Example: John Smith and Barbara Smith on behalf of The Collaborative Working Group.

2.3.1.9. Headings and Sub-headings

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

2.3.1.10. Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. In the abstract, minimize the use of abbreviations and do not cite references. See Summary Table for abstract requirement and length according to article type. For Clinical Trial article types, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

2.3.1.11. Keywords

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

2.3.1.12. Text

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

2.3.1.13. Nomenclature

The use of abbreviations should be kept to a minimum. Non-standard abbreviations should be avoided unless they appear at least four times, and defined upon first use in the main text. Consider also giving a list of non-standard abbreviations at the end, immediately before the Acknowledgments. 88 Equations should be inserted in editable format from the equation editor. Italicize Gene symbols and use the approved gene nomenclature where it is available. For human genes, please refer to the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). New gene symbols should be submitted here. Common Alternative gene aliases may also be reported, but should not be used alone in place of the HGNC symbol. Nomenclature committees for other species are listed here. Protein products are not italicized. We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts. Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by IUPAC. Astronomical objects should be referred to using the nomenclature given by the International Astronomical Union provided here. Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords. An LSID is represented as a uniform resource name (URN) with the following format: urn:lsid::[:] For more information on LSIDs please see Inclusion of Zoological Nomenclature section.

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

INTRODUCTION

Succinct, with no subheadings.

MATERIALS AND METHODS

This section may be divided by subheadings. This section should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section (for further information, see section Materials and Data Policies) 89

RESULTS

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

DISCUSSION

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential shortcomings and limitations on their interpretations; discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future. For further information, please see Additional Requirements for specific article types including Focused Reviews, General Commentaries, Case Reports and Data Reports amongst others or you can

check the descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page.

2.3.1.15. Acknowledgments

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

2.3.1.16. Author Contributions Statement

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

2.3.1.17. Conflict of Interest Statement

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

2.3.1.18. Contribution to the Field Statement

When you submit your manuscript, you will be required to briefly summarize in 200 words your manuscript's contribution to, and position in, the existing literature of your field. This should be written avoiding any technical language or non-standard acronyms. The aim should be to convey the meaning and importance of this research to a non-expert. While Frontiers evaluates articles using objective

criteria, rather than impact or novelty, your statement should frame the question(s) you have addressed in your work in the context of the current body of knowledge, providing evidence that the findings - whether positive or negative - contribute to progress in your research discipline. This will assist the Chief Editors to determine whether your manuscript fits within the scope of a specialty as defined in its mission statement; a detailed statement will also facilitate the identification of the Editors and Reviewers most appropriate to evaluate your work, ultimately expediting your manuscript's initial consideration. Example Statement on: Markram K and Markram H (2010) The Intense World Theory – a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front. Hum. Neurosci.* 4:224. doi: 10.3389/fnhum.2010.00224 Autism spectrum disorders are a group of neurodevelopmental disorders that affect up to 1 in 100 individuals. People with autism display an array of symptoms encompassing emotional processing, sociability, perception and memory, and present as uniquely as the individual. No theory has suggested a single underlying neuropathology to account for these diverse symptoms. The Intense World Theory, proposed here, describes a unifying pathology producing the wide spectrum of manifestations observed in autists. This theory focuses on the neocortex, fundamental for higher cognitive functions, and the limbic system, key for processing emotions and social signals. Drawing on discoveries in animal models and neuroimaging studies in individuals with autism, we propose how a combination of genetics, toxin exposure and/or environmental stress could produce hyper-reactivity and hyperplasticity in the microcircuits involved with perception, attention, memory and emotionality. These hyper-functioning circuits will eventually come to dominate their neighbors, leading to hyper-sensitivity to incoming stimuli, over-specialization in tasks and a

hyper-preference syndrome. We make the case that this theory of enhanced brain function in autism explains 91 many of the varied past results and resolves conflicting findings and views and makes some testable experimental predictions.

2.3.2. References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. The references should only include articles that are published or accepted. Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list, include the version and unique identifier when available. For accepted but unpublished works use "in press" instead of page numbers. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only, for the article types that allow such inclusions. Personal communications should be documented by a letter of permission. Website urls should be included as footnotes. Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source. Preprints can be cited as long as a DOI or archive URL is available, and the citation clearly mentions that the contribution is a preprint. If a peer-reviewed journal publication for the same preprint exists, the official journal publication is the preferred source. The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting. SCIENCE, ENGINEERING, and HUMANITIES: For articles submitted in the domains of SCIENCE, ENGINEERING and HUMANITIES please apply Author-Year system for in-text citations. Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available. In-text citations should be called according to the surname of the first author, followed by the year. For works by 2 authors include both surnames,

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

ARTICLE IN A PRINT JOURNAL:

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

ARTICLE IN AN ONLINE JOURNAL:

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

ARTICLE OR CHAPTER IN A BOOK:

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

BOOK:

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

ABSTRACT:

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

PATENT:

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

DATA:

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

THESES AND DISSERTATIONS:

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

PREPRINT:

Smith, J. (2008). Title of the document. Preprint repository name [Preprint]. Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018). For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to the Chicago Manual of Style. Frontiers Science Endnote Style Frontiers Science, Engineering and Humanities Bibstyle

HEALTH, PHYSICS AND MATHEMATICS: For articles submitted in the domain of HEALTH or the journal Frontiers in Physics and Frontiers in Applied Mathematics and Statistics please apply the Vancouver system for in-text citations. Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al. and doi when available. In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis for Health articles, and in square brackets for Physics and Mathematics articles.

Reference examples

ARTICLE IN A PRINT JOURNAL:

Sondheimer N, Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. Mol Cell (2000) 5:163-72. 94

ARTICLE IN AN ONLINE JOURNAL:

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

ARTICLE OR CHAPTER IN A BOOK:

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

BOOK:

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

ABSTRACT:

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

PATENT:

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

DATA:

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837_95

THESES AND DISSERTATIONS:

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

PREPRINT:

Smith, J. Title of the document. Preprint repository name [Preprint] (2008). Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018). For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to Citing Medicine. Frontiers Health Endnote Style Frontiers Health and Physics Bibstyle

2.3.3. Disclaimer

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

2.3.4. Supplementary Material

Frontiers journals do not support pushing important results and information into supplementary sections. However, data that are not of primary importance to the text, or which cannot be included in the article because it is too large or the current format does not permit it (such as movies, raw data traces, power point presentations, etc.) can be uploaded during the submission procedure and will be displayed along with the published article. All supplementary files are deposited to FigShare for permanent storage, during the publication stage of the article, and receive a DOI. The Supplementary Material can be uploaded as Data Sheet (word, excel, csv, cdx, fasta, pdf or zip files), Presentation (power point, pdf or zip files), Supplementary Image (cdx, eps, jpeg, pdf, png or tif), Supplementary Table (word, excel, csv or pdf), Audio (mp3, wav or wma) or Video (avi, divx, flv, mov, mp4, mpeg, mpg or wmv). 96 Supplementary material is not

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

Suggested Fonts

The title is written in title case, centred, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page. Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold. The text of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman. The body text is in 12 point normal Times New Roman.