



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

**PLASTICIDADE DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO APÓS LESÃO DE
TENDÃO CALCÂNEO EM RATOS**

VICTORIA L. A. DE MENDONÇA

BRASÍLIA - DF / 2023



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO**

**PLASTICIDADE DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO APÓS LESÃO DE
TENDÃO CALCÂNEO EM RATOS**

VICTORIA L. A. DE MENDONÇA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Marqueti Durigan

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPDF

BRASÍLIA - DF / 2023

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

Ap Assis, Victoria
PLASTICIDADE DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO APÓS LESÃO DE TENDÃO
CALCÂNEO EM RATOS / Victoria Assis; orientador Rita
Marqueti; co-orientador Bernardo Petriz. -- Brasília, 2023.
89 p.

Dissertação(Mestrado em Ciências da Reabilitação) --
Universidade de Brasília, 2023.

1. Remodelamento Muscular. 2. Lesão tendínea. 3.
Interação músculo-tendínea. I. Marqueti, Rita, orient. II.
Petriz, Bernardo, co-orient. III. Título.

MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan

(Presidente)

(Universidade de Brasília – UnB)

Prof. Dr. Jeaser Alves de Almeida

(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

Prof. Dr. Thiago dos Santos Rosa

(Universidade Católica de Brasília-UCB)

Prof. Dr. Felipe Augusto dos Santos Mendes

Suplente

(Universidade de Brasília - UnB)

BRASÍLIA – DF / 2023

*É melhor você tentar algo, vê-lo não funcionar e
aprender com isso, do que não fazer nada!*

Mark Zuckerberg

Dedico este trabalho...

Àqueles que mais amo:

Minha mãe, Vania Maria e meu pai, Jorge Luiz que por muito amor dedicaram suas vidas, para que os meus sonhos fossem conquistados. Sou eternamente grata por todo cuidado e esforço;

Meu irmão, Rhuan, por toda companhia, amor e boas risadas que nos une a cada dia, sendo uma grande parceiro desde sempre;

E finalmente ao meu amor, Ygor. Que me apoiou em todos os momentos, desde o início desta linda jornada. Te agradeço imensamente, meu anjo.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora **Profª Dra. Rita de Cássia Marqueti Durigan**, pelo carinho, orientação, disponibilidade e atenção dedicada durante todo o processo do meu mestrado. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e por todas as oportunidades de ser uma profissional mais capacitada. Obrigada, profª! Espero mantê-la em minha vida para sempre.

Ao meu querido coorientador Prof. Dr. **Bernardo Petriz de Assis**, que para todo o sempre será o meu primeiro orientador. Agradeço a Deus não só por ser a pessoa que me oportunizou momentos incríveis dentro da vida acadêmica, mas que transformou por completo a minha vida pessoal. Obrigada, prof. Eu amo ter o senhor em minha vida!

Aos meus amigos e colegas do **Grupo de Pesquisa em Plasticidade Músculo-Tendínea (Gplast)** da Universidade de Brasília- UnB. Foram muito prazerosos os momentos de aprendizados e risadas. Em especial, o Prof. Dr. João Luiz Quagliotti Durigan, por todo aprendizado compartilhado.

Ao meu colega de grupo de pesquisa, **Prof. Dr. Ivo Vieira de Souza Neto**, pela ajuda e contribuição substancial durante esta jornada. Meus sinceros agradecimentos, prof.

Aos meus amigos do outro grupo de pesquisa **Fisiologia Molecular do Exercício (FMEx)**, que estiveram comigo durante o período da iniciação científica. Obrigada por toda parceria, carinho e ensinamentos. Vocês fazem parte da minha história!

Aos professores **Prof. Dr. Octavio Luiz Franco** e **Prof. Dra. Rosângela Vieira**, por acreditarem no trabalho realizado e por manterem sempre abertas as portas de seus laboratórios.

Sumário

Desenvolvimento muscular	15
Regeneração Muscular	16
Fatores Miogênicos	17
Principais vias de síntese e Degradação Muscular	19
O papel da matriz extracelular no músculo esquelético	24
Estrutura e função Tendínea	28
Interações entre músculos e tendões	30
Processo de reparo após lesão tendínea	32
Alterações musculares diante de uma lesão no tendão	34
Objetivos	37
Objetivos específicos	37
Materiais e Métodos	38
Protocolo de lesão parcial do tendão calcâneo	41
Extração de RNA de amostras de Músculo Gastrocnêmio	41
Determinação da atividade de MMPs por zimografia	43
Painel inflamatório	44
Análise Histológica do Músculo	44
Análise estatística	45
Resultados	46
Lesão do tendão Calcâneo altera a expressão gênica no músculo gastrocnêmio em ratos	47
Relação da lesão do tendão com a atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio	56
Análise morfológica do remodelamento do tecido muscular	57

RELAÇÃO DE ABREVIACÕES

(AKT) - Protein kinase B

(BGN) - Biglicana

(COL1A1) - Cadeia alfa 1 de colágeno tipo I

(COL3A1) - tipo III cadeia alfa 1 de colágeno

(CTGF) - Fator de transformação de crescimento beta 1

(DCN) - Decorina

(EGR-1) - Early Growth Response 1

(FMOD) - Fibronectina

(FOXO) - Forkhead box protein O1

(IGF-1) - Fator de crescimento semelhante à pró-insulina 1

(ME) - Músculo Esquelético

(MEC) - Matriz Extracelular

(MMP-2) - Matriz metaloproteinase-2

(MSTN) - Myostatin

(MURF-1) - E3 ubiquitina-proteína ligase TRIM63

(MYOD) - Myoblast determination protein 1

(P70S6K) - Ribosomal protein S6 kinase beta-1

(PAX7) - Paired Box 7

(SMAD2) - Mothers against decapentaplegic homolog 3

(SMAD3) - Mothers against decapentaplegic homolog 3

(TGF- β) - Fator de transformação de crescimento beta 1

(TIMP-1) - Inibidor tecidual da metaloproteinase-1 da matriz

(TIMP-2) - Inibidor tecidual da metaloproteinase-2 da matriz

(VEGF) - Fator de crescimento do tecido conjuntivo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de regeneração muscular.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 2. Representação esquemática do processo de miogênese. Erro! Indicador não definido.	
Figura 3. Diagrama de sinalização das vias da miostatina Erro! Indicador não definido.	
Figura 4. Estruturas da MEC	Erro! Indicador não definido.
Figura 5. Hierarquia dos tendões	Erro! Indicador não definido.
Figura 6. Desenho Experimental	40
Figura 7. Comparação do peso médio de ratos Wistar	46
Figura 8. Avaliação histológica do processo de cicatrização do tendão de Aquiles nos cinco diferentes grupos pós-lesão com coloração de hematoxilina-eosina (HE).....	47
Figura 9. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio.	48
Figura 10. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio.	50
Figura 11. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio.	52
Figura 12. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio.	54
Figura 13. Atividade das isoformas pró e ativa da metaloproteinases de matriz 2 no músculo gastrocnêmio.	56
Figura 14. Avaliação do painel inflamatório do músculo gastrocnêmio de ratos.....	57
Figura 15. Avaliação morfológica do músculo gastrocnêmio nos grupos controle, 3D, 14D, 28D e 55D.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Listas dos genes	43
----------------------------------	----

RESUMO

Introdução: o músculo esquelético é um dos tecidos mais dinâmicos do corpo humano. Dentre muitas adaptações, a plasticidade desse tecido pode estar relacionada ao seu extenso remodelamento estrutural e metabólico. No entanto, existem algumas lacunas na literatura relacionadas a resposta adaptativa do músculo esquelético a uma lesão tendínea, entre elas, a identificação precisa dos fatores reguladores que impactam a comunicação entre essas estruturas, bem como a interação dinâmica entre as células musculares, células do tecido tendíneo e células inflamatórias em resposta à lesão. **Objetivo:** Analisar as respostas adaptativas do músculo gastrocnêmio à lesão parcial do tendão calcâneo (TC) de ratos. **Metodologia:** Foram incluídos no estudo 50 ratos Wistar com aproximadamente 2 meses de idade e peso médio de 261 ± 15 g. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n = 10 animais por grupo): controle sem lesão parcial do tendão (C), grupo observado 3 dias após lesão parcial do tendão (3D), grupo observado 14 dias após lesão parcial do tendão (14D), grupo observado 28 dias após lesão parcial do tendão (28D) e grupo observado 55 dias após lesão parcial do tendão (55D). O músculo gastrocnêmio após a coleta tecidual foi utilizado para análises de expressão gênica, zimografia, citometria de fluxo e morfologia. **Resultados:** Foi observado uma diminuição na expressão dos genes *Vegf*, *Smad3*, *Egr* e *Akt* no músculo gastrocnêmio 3 dias após à lesão parcial do TC. Assim como ocorreu o aumento da expressão dos genes, *Col3a1*, *Ctgf*, *Timp-2* e *Bgn* 3 dias após à lesão parcial do TC. No período de 14 dias após a lesão parcial do tendão calcâneo, foi verificada diminuição do conteúdo dos genes *Mstn* e de *Smad3*. Por outro lado, houve um aumento nos níveis de expressão dos genes *Akt* e *Vegf*. Já no período de 28 dias após a lesão, houve um aumento dos níveis de expressão dos genes *Tgf- β* , *Vegf*, *Mstn*, *Pax7* e *Myod1*. Com a diminuição da expressão de *Smad3*, *Akt*.

Finalmente 55 dias após a lesão parcial do tendão calcâneo, os genes *Akt*, *P70s6k*, *Pax7*, *Mstn* e *Atrogin-1* apresentaram um aumento da sua expressão. Enquanto os níveis de *Smad3*, *Timp-2* apresentaram diminuição Todos quando comparados ao grupo controle. Quanto a atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio, a MMP-2 pró aumentou nos grupos 28D e 55D quando comparados ao grupo controle. Finalmente, o grupo 55D exibiu aumento da AST e do diâmetro das fibras musculares, o que foi acompanhado pela regulação positiva dos níveis de IL-8. **Conclusão:** Este estudo examinou o impacto da lesão parcial da TC na homeostase e remodelação do músculo esquelético em ratos. Os resultados sugerem que este tipo de lesão pode causar efeitos adversos nas vias de sinalização e degradação intracelular, perturbando os mecanismos reguladores da matriz extracelular muscular e a comunicação com o tendão. No entanto, parece que o músculo esquelético tem a capacidade de mitigar estes efeitos prejudiciais em comparação com lesões que afectam principalmente o músculo e o seu impacto no tendão. Estes resultados oferecem informações valiosas sobre os mecanismos envolvidos nas lesões dos tendões e podem potencialmente ajudar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para a recuperação de lesões musculotendíneas em humanos.

Palavras-chave: Expressão Gênica, Musculo Esquelético, Lesão Tendínea, Remodelamento

ABSTRACT

Introduction: Skeletal muscle is one of the most dynamic tissues in the human body. Among many adaptations, the plasticity of this tissue may be related to its extensive structural and metabolic remodeling. However, there are some gaps in the literature related to the adaptive response of skeletal muscle to tendon injury, including the precise identification of regulatory factors that impact communication between these structures and the dynamic interaction between muscle cells and tissue cells, tendon and inflammatory cells in response to injury. Objective: To analyze the adaptive responses of the gastrocnemius muscle to partial injury of the Achilles tendon (CT) in rats.

Methodology: Fifty Wistar rats, approximately 2 months old and with an average weight of 261 ± 15 g, were included in the study. The rats were randomly distributed into five groups (n = 10 animals per group): control without partial tendon injury (C), the group observed 3 days after partial tendon injury (3D), the group observed 14 days after partial tendon injury (14D), the group observed 28 days after partial tendon injury (28D) and the group observed 55 days after partial tendon injury (55D). The gastrocnemius muscle after tissue collection was used for gene expression, zymography, flow cytometry, and morphology analyses.

Results: A decrease in the expression of *Vegf*, *Smad3*, *Egr* and *Akt* genes was observed in the gastrocnemius muscle 3 days after partial CT injury. Likewise, there was an increase in the expression of the genes *Col3a1*, *Ctgf*, *Timp-2*, and *Bgn* 3 days after the partial lesion of the CT. Within 14 days after partial injury to the Achilles tendon, a decrease in the content of the *Mstn* and *Smad3* genes was observed. On the other hand, there was an increase in the expression levels of the *Akt* and *Vegf* genes. In 28 days after the injury, there was an increase in the expression levels of the *Tgf-b*, *Vegf*, *Mstn*, *Pax7*, and *Myod1* genes. With decreased expression of *Smad3*, *Akt*. Finally, 55 days after partial

injury to the Achilles tendon, the genes *Akt*, *P70s6k*, *Pax7*, *Mstn*, and *Atrogin-1* showed an increase in expression. While the levels of *Smad3*, *Timp-2* showed a decrease compared to the control group. Regarding MMP-2 activity in the gastrocnemius muscle, MMP-2 pro increased in the 28D and 55D groups when compared to the control group. Finally, the 55D group exhibited increased AST and muscle fiber diameter, which was accompanied by upregulation of IL-8 levels. **Conclusion:** This study examined the impact of partial CT injury on skeletal muscle homeostasis and remodeling in rats. The results suggest that this type of injury can cause adverse effects on signaling and intracellular degradation pathways, disrupting the regulatory mechanisms of the muscle extracellular matrix and communication with the tendon. However, it appears that skeletal muscle can mitigate these detrimental effects compared to injuries that primarily affect the muscle and its impact on the tendon. These results provide valuable information about the mechanisms involved in tendon injuries and can potentially help in the development of more effective therapeutic strategies for recovery from musculotendinous injuries in humans.

Keywords: Gene Expression, Skeletal Muscle, Tendon Injury, Remodeling.

INTRODUÇÃO

Desenvolvimento muscular

O músculo esquelético (ME) é um dos tecidos mais numerosos do corpo humano, representando cerca de 40% a 45% da massa corporal [1,2]. Um tecido que sua geração muscular (miogênese) pode ser dividida em várias fases distintas [3], a fase embrionária, as estruturas derivadas do mesoderma são precursoras das primeiras fibras musculares do corpo e nas fases seguintes, fibras adicionais são geradas ao longo desta fibra primária [4,5]. Na fase perinatal, apesar de pouco compreendida, acredita-se que os progenitores miogênicos presentes no músculo, inicialmente multiplicam-se intensamente, porém atenuam à medida que o número de mionúcleos alcançam um estado estacionário e um pico de síntese proteica miofibrilar [6]. Na medida que o músculo vai amadurecendo, esses progenitores acabam encontrando um repouso e, neste momento irão residir nele como células satélites, pois o ME adulto, assim como os demais órgãos, irá depender de um mecanismo compensatório para a renovação de células diferenciadas, a fim de manter a homeostase do tecido [7]. Desta forma, a maioria dos estudos de miogênese são concentrados em relação quando um músculo já maduro, é danificado o suficiente para que haja o recrutamento e diferenciação de células satélites, para a reparação do tecido, com intuito de restabelecer a homeostase [8].

Todos os músculos dos vertebrados são originários da mesoderme e a maioria destes tecidos são da musculatura esquelética são originadas a partir de células progenitoras musculares localizadas na região mais amadurecida dos somitos, o dermomiótico [9]. Condensações epiteliais de mesoderma paraxial localizadas nos dois lados da notocorda e tubo neural, formadas aos pares com sentido antero-posterior no dorso do embrião [10]. Os sinais advindos da notocorda, tubo neural e ectoderma são os principais responsáveis pela expressão dos fatores regulatórios miogênicos, os quais, possuem influência sobre

as células do dermomiótico e possuem a função de atuar na especificação e a diferenciação destes progenitores miogênicos [11].

Regeneração Muscular

Dentre tantas características já citadas em relação ao tecido muscular esquelético, a sua alta capacidade de regeneração talvez seja um destaque positivo para o tecido, e segue uma série de passos que recapitulam algumas das fases do desenvolvimento muscular [9]. Entretanto, o músculo maduro apresenta uma subpopulação de miócitos parcialmente indiferenciados, mononucleares, que estão localizados nas periferias das fibras musculares e dos miotubos maduros, entre a lâmina basal e o sarcolema [12]. Estas células tão importantes para a manutenção da homeostase são chamadas de Células Satélites (CSs), mas também podem ser chamadas de células precursoras miogênicas e sua principal função é fornecer a musculatura esquelética a capacidade de se adaptar a demandas de crescimento e lesão [12], demonstrados na **figura 1**. Pois vantagem de as CSs estarem tão próximas às fibras é a rápida resposta destas células frente a lesões e/ou a necessidade de crescimento do musculo [13]. Pois estas células estão aptas não só a estimular a síntese de progenitores miogênicos, mas também aumentar a reserva de célula-tronco presentes no músculo [13].

Porém, quando não estimuladas, elas permanecem num estado inerte (quiescente) e não proliferativo [12,14]. Com isto, esta população de células precursoras musculares são capazes de lidar com os diferentes ciclos de regeneração (síntese de fibras musculares) e degeneração (Apoptose ou necrose das fibras musculares) [15]. E durante o processo de degeneração ou lesão do tecido muscular, ocorre a ativação de células mononucleadas, especialmente das CSs e de algumas células inflamatórias, para iniciar o processo de regeneração [16,17]. Caso ocorra esta ativação, as CSs são capazes de se diferenciarem

em um progenitor miogênico e migrar até o local da lesão, desencadeando o processo de reparação da fibra muscular alvo, através do processo de hiperplasia (fusão entre si) ou hipertrofia (fundindo-se a ela) [16,17]. Além disto, esta fibra ainda passará pelo processo de maturação [13], ilustrada na **figura 1**.

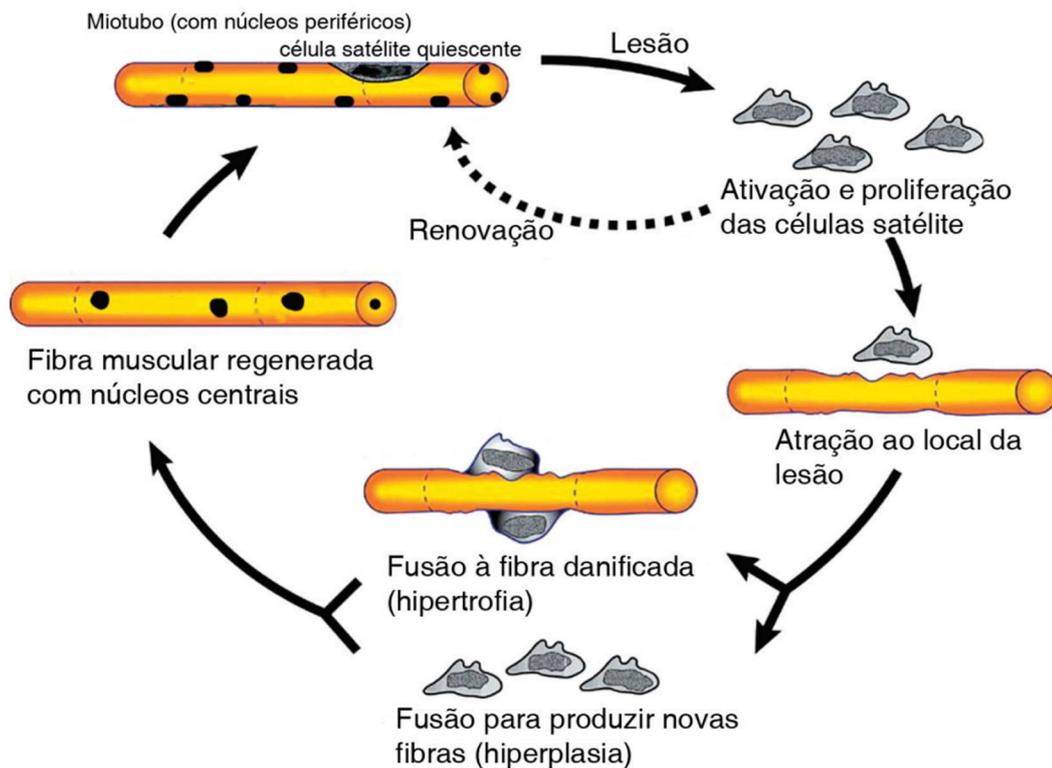


Figura 1. Processo de regeneração muscular. Hiperplasia e hipertrofia (Adaptado de Hawke e Garry, 2001[16]).

Fatores Miogênicos

As CSs, tanto no estado quiescente como no estado ativado, expressam marcadores miogênicos (que não são expressos pelas fibras musculares), os quais definem a caracterização de sua biologia [16], descritos na **figura 2**. Diversos marcadores expressos em etapas distintas, definem uma assinatura molecular para as CSs e juntos regulam as fases de ativação, proliferação, migração e diferenciação do processo de reparo muscular [18]. Desta forma, as diferentes fases já citadas, dependem de uma complexa rede

composta por segmentos celulares e acelulares, incluindo fatores de transcrição, fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular, quimiocinas, entre outros [19]. Que se diferem no potencial de linhagem e de diferenciação miogênica, assim como, nos padrões de expressão [20].

O fator de transcrição *Paired box 3* (Pax3) está amplamente relacionado ao desenvolvimento embrionário das CSs, na maioria dos músculos [21]. A Pax7 (um fator de transcrição da mesma família) é mais expressa em CSs quiescentes e essencial na manutenção de autorrenovação das CSs, podendo variar a depender do músculo avaliado [21]. O Fator miogênico 5 (Myf5) é importante para o processo de regeneração e no desenvolvimento do tecido muscular [22]. O fator de diferenciação miogênica 1 (MyoD) controla a diferenciação de células da linhagem miogênica, sendo um excelente marcador para CSs ativadas [23] e geralmente sua maior concentração é encontrada em músculos neonatos e/ou músculos durante o processo de regeneração [23]. A miogenina (MyoG) é expressa em miócitos comprometidos com a diferenciação. Ao passo que o fator regulador miogênico 4 (MRF4) está presente durante a fase final da diferenciação [23].

A Pax7 e Myf5 são expressas em maior quantidade em CSs quiescentes e quando ativadas, elas migram para o local da lesão e é iniciado o processo de regeneração. A ativação das CSs não se limita apenas ao local lesionada, mas são capazes de regenerar ao longo da fibra e são capazes de atuar mesmo após diversas lesões [19] (**figura 2**). Elas podem sofrer divisões simétricas ou assimétricas, sendo que uma ocorre a geração de duas células-tronco não idênticas, retornando para o nicho de manutenção do *pool* e a outra se prolifera e diferencia (contribuindo diretamente para a regeneração muscular), respectivamente [19,23]. O estado de proliferação das CSs é acompanhado pelo aumento da expressão de MyoD e Myf5, pois as células em proliferação ainda expressam Pax7 em maior quantidade [19,23]. Após ativação, as CSs são chamadas de mioblastos e estas

células, por conseguinte, passaram a expressar os fatores de transcrição MyoG e MRF4, tornando-se fusiformes (chamados de miócitos) [19]. A regulação positiva destes genes (em contato com outros não citados), sinalizam a progressão de diferenciação e a partir das CSs diferenciadas, se fundem para restaurar fibras danificadas e/ou gerar uma nova fibra [19]. É importante ressaltar que existem outros fatores do que os supracitados para a ativação das CSs, pois elas podem ser reguladas por fatores de vascularização, inervação, nutrição e concentração de hormônios [24].

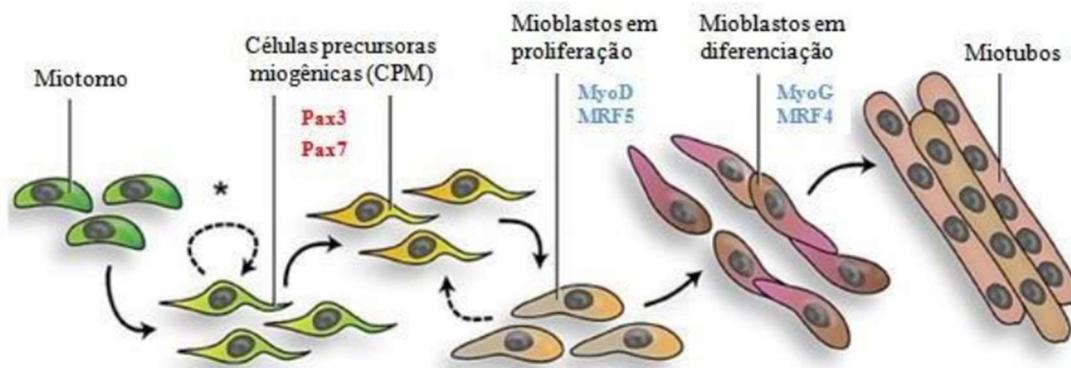


Figura 2. Representação esquemática do processo de miogênese. (Adaptada de Dumont et al., 2015 [22]).

Principais vias de síntese e Degradação Muscular

Em condições normais, as vias de sinalização são responsáveis pelo controle e coordenação de sinais hipertróficos e atrofícos, em busca do equilíbrio entre a síntese proteica e proteólise [25], apontados na **figura 3**. Estudos indicam algumas vias vinculadas ao aumento e/ou perda de massa muscular, assim como eventos de sinalização que induzem a diferenciação e regeneração muscular como foi abordado em tópico superiores [25,26]. Os processos de crescimento muscular são controlados pela execução coordenada de diferentes moléculas, como hormônios, citocinas, fatores de crescimento, entre outros [27](**figura 3**). Dentre os fatores de crescimento, estão o fatores de

crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento transformadores β s (TGF- β), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de necrose tumoral α (TNF α) [27]. O aumento da massa muscular pelo mecanismo de hipertrofia, geralmente ocorre pela incorporação de núcleos de CSs, depois de sua proliferação, às fibras musculares em regeneração ou em crescimento [12] e pelo aumento nos níveis proteicos dentro da fibra muscular [28]. Ou seja, a manutenção tanto da massa muscular, quanto do tamanho das fibras depende principalmente deste *turnover* de proteínas e caso haja um desbalanço entre a síntese e degradação proteica nessas células, pode resultar na redução da massa muscular, conhecida como atrofia [29]. É uma das principais e mais importantes vias de sinalização anabólica no ME, conhecida como via do IGF1/PI3K/Akt [30].

O IGF-1 é um hormônio circulante, que se origina das atividades metabólicas do fígado, mas também é sintetizado no músculo esquelético, atuando na manutenção da massa muscular e na regulação do crescimento [31]. Para que o IGF-1 atue, é necessário a presença de seu receptor (IGF-1rec) disposto no sarcolema, uma proteína transmembrana com atividade tirosina quinase e de autofosforilação. Esta ligação gera deformação conformacional no IGFrec, resultando na ancoragem e fosforilação de outras proteínas, por exemplo, o substrato do receptor de insulina (IRS) [32]. Por conseguinte, o IRS fosforilado acarreta a ativação sequencial do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), quinase dependente de fosfoinosítideo (PDK1) e proteína quinase B (Akt). A Akt ativada é capaz de estimular a síntese proteica via ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (m-TOR) e inibe as vias de degradação proteica por meio da fosforilação e repressão dos fatores de transcrição da família FoxO [32].

Na via ubiquitina-proteossoma, o início da degradação proteica é marcado por marcações de determinadas proteínas que serão degradadas por cadeias de moléculas de

ubiquitina (ubiquitinização) [32]. Denominada desta forma, porque as proteínas ligadas às ubitiquinas são degradadas por um complexo especializado, formado por proteases multicatalíticas, chamadas de proteossoma [32]. Além disto, o controle da degradação é mediado por um grupo de enzimas conhecidas como ubiquitina-ligases, que estão envolvidas desenvolvem diferentes funções no ME, por exemplo a MAFbx (do inglês, *Muscleatrophy Fboxprotein*), MuRF1 (do inglês, *Muscle RING finger-containingprotein 1*) e atrogina-1 [32,33]. Neste sentido, proteínas musculares que são meio de substratos para ubiquitinização pelo MAFbx, em geral, estão correlacionados ao crescimento muscular [34]. Mas quando ubiquitinizadas pelo MurF1, estão relacionadas a degradação de proteínas musculares estruturais, por exemplo, cadeias pesadas de miosina e actina [32,35]. Além disto, a fosforilação do FoxO promove sua saída do núcleo para o citoplasma, inibindo a expressão de seus genes alvo MAFbx e MurF1, ou seja, reduz a taxa de degradação proteica, diminuindo consequentemente as taxas de catabolismo [36]. A via NF- κ B é ativada em resposta à ligação da citocina pró-inflamatória TNF- α ao seu receptor disposto no sarcolema [37]. Este processo ocorre porque normalmente a proteína NF- κ B está ligada às proteínas I κ -B no citoplasma. Porém, a ligação do TNF- α ao seu receptor, desencadeia a fosforilação desse complexo, NF- κ B e I κ -B acabam se dissociando, viabilizando que o NF- κ B entre no núcleo e ative a expressão de genes-alvo que induzem a atrofia muscular [25,38]. Outro sistema de degradação de proteínas musculares é o das calpaínas, que correspondem a uma grande família de proteases responsáveis pela degradação seletiva de determinadas proteínas sarcoméricas durante o processo de atrofia [39,40]. Destas, o músculo esquelético apresenta três tipos de calpaínas (Tipo 1, 2 e 3) [39]. Neste sentido, as calpaínas são capazes de clivar centenas de substratos proteicos, como as proteínas miofibrilares do

disco Z do sarcômero. Sua atividade é inibida pela ligação das calpaínas à proteína calpastatina [41].

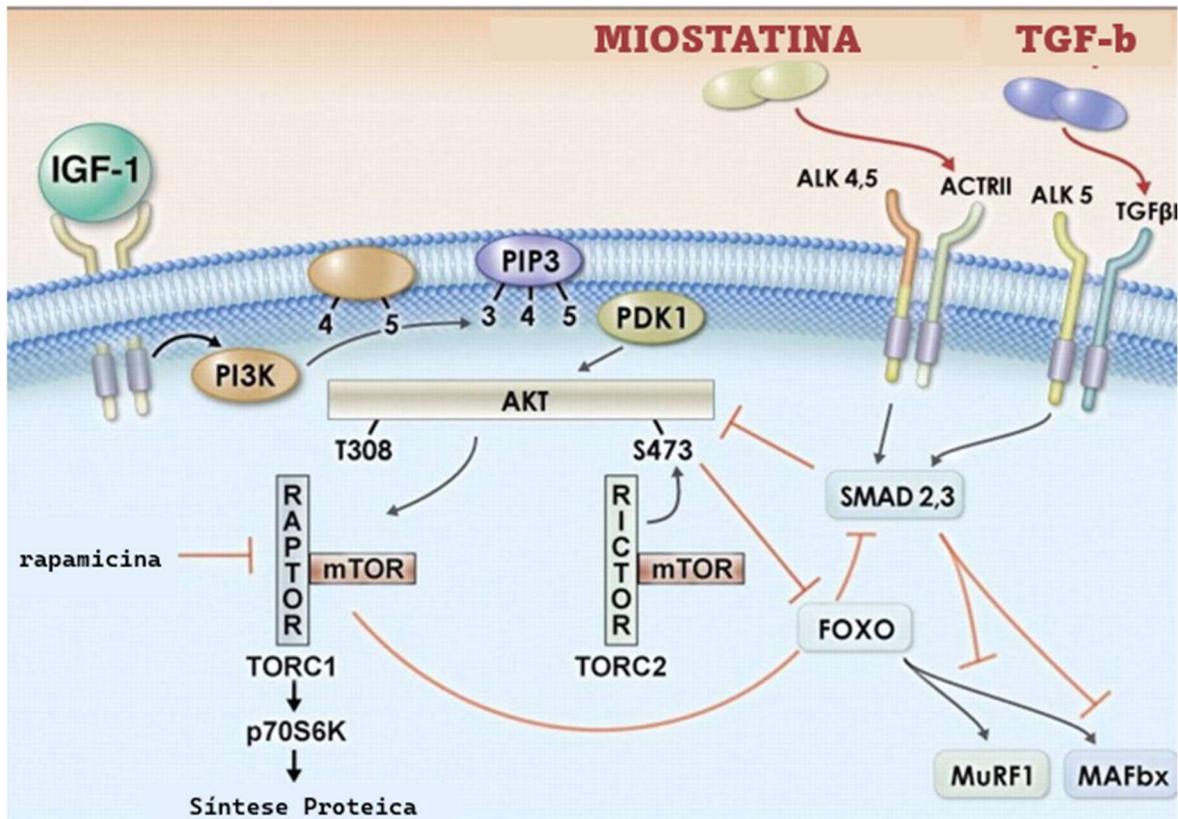


Figura 3. Diagrama de sinalização das vias da miostatina, TGF-β e IGF-1 (Adaptado de Agbons et al., 2017 [42])

Existem outras vias sinalizadoras que atuam no desenvolvimento muscular, por exemplo, a superfamília TGF-β, que no músculo esquelético demonstram ter efeitos potentes no desenvolvimento muscular e na massa muscular esquelética pós-natal [43], ainda sinalizadas na **figura 3**. O TGF-β atua em uma via de transdução que consiste em três componentes principais: 1) o ligante; 2) os receptores (serina/tronina quinases); e 3) mediadores intracelulares (Smads) [44]. Quando os dois primeiros (ligante e receptor) estão ativados, ocorre a fosforilação de uma proteína Smad, regulada por um receptor que oligomeriza com um Smad comum (Smad4), desta forma, o oligômero Smad se transloca para o núcleo, onde interage com parceiros de ligação Smad para regular a transcrição

[45]. Como seria insustentável considerar todos os 50 ligantes de TGF- β , esta revisão irá se concentrar no TGF- β 1 e a miostatina. Pois apesar de atuarem de forma semelhante no ME, possuem característica mutuamente exclusivas. O TGF- β 1 é capaz de desempenhar um papel importante no desenvolvimento do ME, ele também tem influência em outros diferentes tecidos [46,47]. Além disto, sua atividade é bastante específica para o contexto celular, ou seja, seu resultado de sinalização é determinado pelo meio intracelular da célula [47].

A miostatina, é um membro da superfamília de fatores de crescimento e transformação β (TGF- β), que é expressa e secretada predominantemente pelo ME, atuando como uma potente citocina reguladora negativa do crescimento muscular e indução da atrofia muscular [48,49]. Dentre os diversos estudos que apontam a miostatina como indutora à atrofia, McFarlane et.al 2006 [50] em um estudo de cultura de células relataram que a miostatina pode regular positivamente as ubiquitina ligases relacionadas à atrofia essencial e descobriu-se que esta regulação era depende de FOxO [50]. Ou seja, de fato o tratamento com miostatina inibe a via IGF1-PI3K-Akt e ativa FoxO1, permitindo a expressão de atrogina-1 [50]. Este *crosstalk* entre as duas vias supracitadas não é dependente de NF κ B, isto é, sua inibição não impede a regulação positiva da atrogina-1, propiciando a regulação positiva das vias de degradação de proteínas musculares [50]. Além disto, existem duas proteínas que são fatores de transcrição a jusante da miostatina/ TGF- β e induzem um programa de atrofia independente, a Smad2 e Smad3 [51,52]. E a inibição de Smad2 e Smad3 podem promover a hipertrofia muscular independentemente de células satélites, mas parcialmente dependente da sinalização da Akt ([51,53]. Indicando a possível comunicação entre as vias da miostatina e Akt, em diferentes níveis [51,53]. Ainda sobre as Smads, foi relatado que a Smad3 é o mediador chave da inibição de TGF- β da miogênese, pois a Smad3 interage com o MyoD, inibindo-

o [54]. E a Smad2, tem seu papel menos claro na literatura, mas é sugerido que ela é um componente importante da repressão da diferenciação mediada por TGF- β em mioblastos [55].

O papel da matriz extracelular no músculo esquelético

A matriz extracelular (MEC) é um material elástico não linear, mantida por meio de processos anabólicos e catabólicos bem definidos, governados por vários fatores de crescimento, proteoglicanos e enzimas degradadoras de colágeno [56]. Enquanto as fibras musculares são lineares e elásticas, a MEC serve como um apoio para interação célula-matriz, fornecendo a capacidade de se adaptar ou modificar frente a diversos estímulos dentro do tecido muscular [56]. Dentre as fases do processo de remodelamento (destruição, reparo e remodelamento tecidual), o remodelamento tecidual é caracterizado por processos de maturação das fibras regeneradas e a reorganização tecidual [57,58]. Fase a qual, seja ela fisiológica ou patológica, é dependente da ação coordenada da degradação e síntese de proteínas miócitos e de componentes da MEC [16]. Neste sentido, apesar da MEC ser capaz de fornecer um microambiente estável que suporta a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular no tecido muscular esquelético, ela também pode ter suas características afetadas pela atividade fisiológica do ME [56].

Na morfologia, a MEC do tecido muscular esquelético pode ser dividida em três camadas independentes e interligadas [59], descritas na **figura 4**. Sendo elas: o epimísio, que é um tecido conjuntivo denso que envolve todo o músculo. Composto principalmente de ondulina, fibronectina, tenascina e colágeno tipo I; o perimísio, que se origina do epimísio e envolve os feixes musculares e é composto principalmente por decorina, fibronectina, colágenos, principalmente, o colágeno tipo III etc; e por último o endomísio ou lâmina basal, que é uma espécie de membrana especializada ao redor de cada fibra.

Composto principalmente por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, fatores de crescimento etc. [59–62].

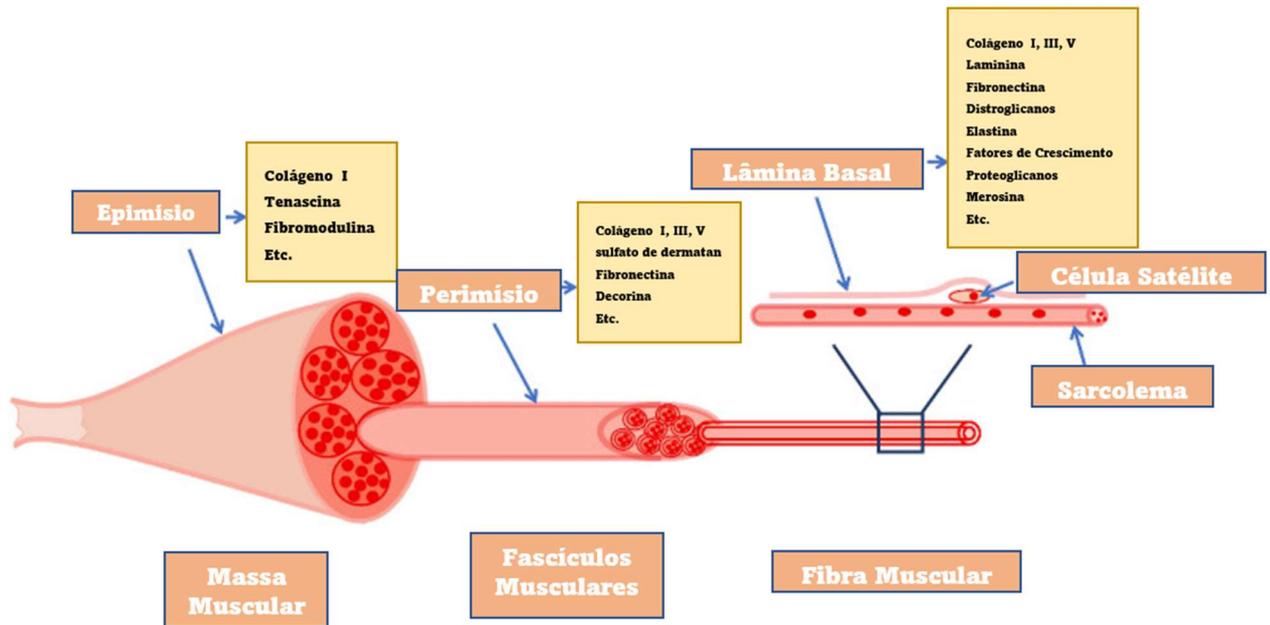


Figura 4. Figura representativa das estruturas presentes nas três camadas da MEC (Adaptado de Zhang et al., 2021 [63])

Após a ligação aos receptores ligados à membrana, Macdonald e Chn, 2012 [64], apontaram que os fatores de crescimento da superfamília do TGF- β são capazes de induzir a fosforilação de proteínas Smad que traduzem sinais extracelulares para o núcleo. Onde ativam a transcrição gênica, resultando na produção de colágeno [64]. Outro fator semelhante, ainda que menos descrito, é o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), cuja superexpressão foi correlacionada ao surgimento de fibrose muscular semelhante à distrofia e déficits funcionais [65]. O colágeno tipo I exógeno pode inibir significativamente a diferenciação miogênica, assim como o colágeno tipo I foi regulado negativamente durante a diferenciação mioblástica [66]. Pois, mioblastos e miotubos são

capazes de sintetizar CTGF na presença de TGF- β , além de ácido lisofosfatídico, o que promove inibição da superdiferenciação de mioblastos, desencadeando a expressão de uma variedade de componentes da MEC, como o próprio colágeno tipo I e integrina [67].

A função desses fatores anabólicos é principalmente regulada por pequenos proteoglicanos ricos em leucina (em inglês, SLRPs) [68]. A decorina é o membro protótipo desta família, desativa o profibrótico TGF- β e CTGF, além de limitar a fibrilogênese por ligação direta do colágeno tipo I [68,69]. Nesta perspectiva, existe um outro SLRP chamado de biglicana, que atua semelhante a decorina pelo mesmo sítio de ligação no colágeno e provavelmente desempenha um papel tanto na formação quanto na regeneração muscular [70].

Outras moléculas que estão envolvidas na regulação da homeostase da MEC, as metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) [71]. As MMPs são as principais proteinases que quebram o colágeno que quebram o colágeno na MEC e são inibidas por TIMPs [71]. E são classificadas em 6 subfamílias maiores que abrangem as, gelatinases (MMP-2 e MMP-9), colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), MMPs tipo membrana (MMP-14 até MMP-17) e outras como a matrilisina (MMP-7) e a metaloeslastase (MMP-12) [72]. No músculo esquelético, as MMPs são essenciais no desenvolvimento, homeostase e regeneração da MEC [73]. E fatores como sobrecarga, alterações morfológicas e/ou redução da atividade contrátil podem desencadear o remodelamento da MEC e por consequência, ocorre a ativação de MMPs específicas [73].

Ainda no contexto muscular, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 desempenham um papel muito importante na adaptação muscular diante de alguma perturbação presente no tecido [74]. Ambas são capazes de quebrar o colágeno tipo IV e funcionam para degradar colágenos de rede menores e os pedaços de colágenos fibrilares que sobram da atividade

da colagenase, participando da homeostase da MEC durante processos como: proliferação e apoptose celular.[71,75]. Em músculos saudáveis, os níveis de MMP-2 e MMP-9 são relativamente baixos, enquanto a atividade da MMP-9 é irrelevante ou ausente [74], entretanto, pesquisas apontam uma maior expressão e ativação destas MMPs na presença de miopatias e quadros inflamatórios no ME [73,74,76].

Diante de uma lesão muscular, no estágio inicial da lesão da fibra muscular, a hiperplasia da MEC geralmente resulta em aumento da rigidez do tecido muscular esquelético, e essa desintegração ordenada e a fibrose, são projetadas para proteger o ME de possíveis danos subsequentes [77,78]. A degeneração da matriz após lesão pode liberar esses fatores de crescimento, que podem então transduzir seus sinais para as células e regular o processo de regeneração [79]. Com a diferenciação das células satélites, a migração celular envolve interações complexas, por exemplo, a regulação positiva da adesão por meio de integrinas, pois estas moléculas desempenham um papel essencial no processo de migração e reparo muscular [26,78]. A MEC também pode atuar como um reservatório de fatores de crescimento, por exemplo, TGF β se liga à decorina [46]. Além disso, a MEC também pode participar das vias de sinalização essenciais para a diferenciação muscular, já que a miogenina sozinha não é capaz de estimular a diferenciação celular terminal [79].

Por outro lado, após uma lesão do músculo esquelético, a MEC atenua os fatores deletérios na função muscular até um certo limite. Por exemplo, Hyeonyu kim et al., 2019 [80] demonstraram em seu trabalho, que a rigidez afeta a força mecânica transferida no final das fibras musculares, o que tem grande implicação nos estudos de engenharia muscular esquelética [80]. Apoiando esta ideia, estudos antigos já indicavam que a MEC é capaz de regular a transmissão de força no local lesionado, ao invés de depender da regeneração do músculo esquelético, por exemplo [81]. Neste sentido, existem outros

fatores que ultrapassam este limite de uma ação positiva da MEC, gerando uma maior hiperplasia da MEC e o aumento da rigidez, como envelhecimento [77], ressecção do tendão [82] e miopatias [83,84] etc. Ou seja, tudo indica que qualquer estado anormal do ME pode afetar suas propriedades mecânicas, assim como a montagem normal da MEC melhorará a fraqueza muscular até certo ponto [85].

Estrutura e função Tendínea

O tendão é constituído por tecido conjuntivo denso, formado por fibroblastos e pela MEC, onde estão inseridas as proteínas fibrosas de colágeno e elastinas, por exemplo, as proteoglicanas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos [86] demonstrado na **Figura 5**. Nesta perspectiva, as células que compõem este tecido são denominadas de tenoblastos (fibroblastos presentes no tendão) e tenócitos, que se conectam através da MEC umas das outras, comunicando-se por meio de junções gap [87]. Células estas, desempenham o papel de produzir colágeno (tipo I e tipo III), que são os principais componentes da MEC tendínea. Nesta direção, uma das curiosidades presentes neste tecido é de que a maior característica que o diferencia das demais estruturas do corpo, se deve a pequena quantidade de células próprias quando comparadas a proporção em quantidade de MEC presente [88].

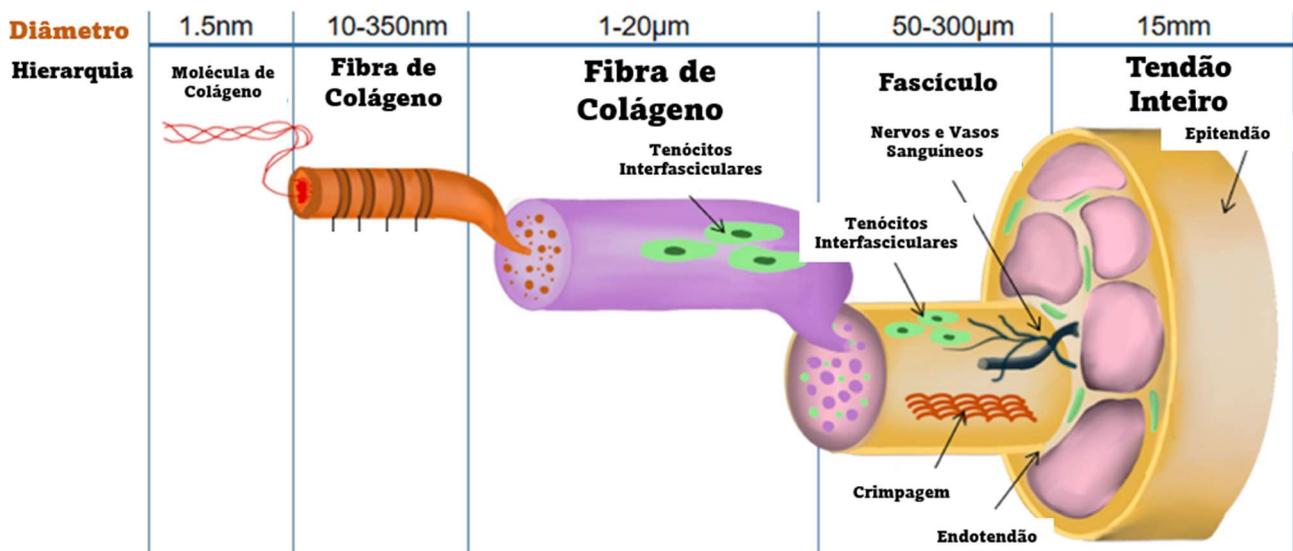


Figura 5. Figura representativa da hierarquia estrutural dos tendões, salientando a organização dos feixes de colágeno. (Adaptado de Zhang et al., 2022[180]).

Anatomicamente, tendões saudáveis são brancos, com aspecto brilhante e a presença de uma textura fibroelástica, possibilitando a resistência diante de cargas mecânicas [89,90]. Por exemplo, o tendão calcâneo é capaz de produzir uma força que corresponde a 12.5 vezes o peso do corpo do indivíduo [91,92]. Em relação a sua anatomia, as fibras colágenas tendíneas são compostas pela união de fibrilas, arquitetando uma forte estrutura [93]. Estruturas estas que se dispõem de tal maneira, para fornecer uma maior resistência às forças externas atuantes sobre o tecido, formando espirais, decorrentes de uma organização transversal, longitudinal e horizontal, com fibrilas de colágeno longitudinais [94]. Além disto, o tecido tendíneo é envolto por bainhas de tecido conjuntivo. O epitendão, reveste o feixe de fibras colágenas e concomitantemente são revestidas pelo paratendão. O endotendão reveste cada uma das fibras colágenas, possibilitando a união destas estruturas. Além disto, o endotendão é responsável por nutrir o tendão através da inervação e de suprimento sanguíneo [93]. O peritendão é formado pela comunicação entre o epitendão e o paratendão [95].

Interações entre músculos e tendões

Para a melhor compreensão deste tópico, é importante frisar que o tendão ou qualquer outro tecido conjuntivo intramuscular possui interações íntimas com elementos contráteis do ME para a transmissão de força [96,97]. E que as dimensões dos tendões podem influenciar a capacidade de alongamento e a capacidade do tendão (ou tecido conjuntivo intramuscular) de armazenar e liberar energia elástica durante o movimento [98]. Próximo a junção miotendínea, as miofibras possuem processos análogos a dedos, compostos de invaginações da membrana plasmática [99]. Estrutura a qual aumenta a área de superfície na transmissão de força e este processo parece ocorrer por meio da interação destas destas invaginações da fibra muscular e as fibras de colágeno (principalmente o colágeno XXII) por intermédio do cisalhamento da lâmina basal [100].

Por outro lado, é descrito que uma porção significativa de fibras de músculos longos cessa intrafascicularmente sem sequer atingir diretamente um tendão [101], o que indica que a via miotendínea não é a única via de transferência de força entre estas estruturas [101]. Denotando que estas fibras de terminação intrafascicular provavelmente contam com um meio paralelamente organizado com elas, capazes de transmitir forças aos componentes passivos do sistema locomotor [102,103]. Neste contexto, o provável meio supracitado foi reconhecido pela primeira vez por Street [104] sendo os componentes fibrosos centrais dentro da MEC, que desempenham o papel de facilitar a transferência lateral de força contrátil [104]. O que parece é que esta transmissão lateral de força acaba sendo um mecanismo biomecânico indispensável na tentativa de manter a integridade muscular, melhorando a eficiência da contração [105]. Auxiliando a distribuição de forças contráteis por toda a superfície das miofibrilas, o que pode reduzir o estresse mecânico e preservar as fibras de possíveis superextensão, em especial, das regiões terminais das fibras [106].

Porém, a MEC não se limita apenas ao papel de transferir lateralmente a força contrátil, mas é capaz de interferir o encurtamento das fibras musculares [107]. Geralmente a contratilidade das miofibrilas é uma função exclusiva da geometria de suas estruturas constituintes, como os sarcômeros, ou seja, o encurtamento da fibra cessa quando as bandas z entram em contato com os filamentos de miosina. Todavia, as fibras musculares estão associadas a uma extensa rede de componentes fibrosos da MEC, interferindo no encurtamento da fibra [107]. Em um modelo computacional e análises *in situ* em músculo de sapo realizado por [108], demonstrou-se que alterações nos aspectos mecânicos da MEC são capazes de restringir a capacidade dos fascículos e das fibras musculares de se expandir radialmente, ou seja, encurtamento muscular pode ser prejudicado quando há um aumento da proporção MEC em uma determinada área de secção transversal muscular.

Além disto, estudos de modelos animais mutantes knockout são importantes e dão base para o atual conhecimento sobre a MEC destes tecidos e o *crosstalk* entre as estruturas. Por exemplo, um papel importante na ligação entre os elementos fibrosos da MEC, seja no tendão ou no músculo, são os proteoglicanos (PGs) [109,110]. Um dos pequenos PGs é a decorina [111,112] e o nocaute desta molécula sugere seu envolvimento na formação das fibrilas de colágeno e, até certo ponto, pode controlar o diâmetro da fibrila, evitando qualquer fusão lateral das fibrilas de colágeno [111,112]. Assim como, a inibição da decorina, é capaz de resultar em fibrilas de colágeno maiores e suas propriedades mecânicas aumentadas nos ligamentos de cicatrização [113,114]. Porém, animais nulos de fibromodulina, foi observado fibrilas de colágenos com estruturas irregulares do tendão, mas não de outras estruturas, como ossos e cartilagens [115]. Camundongos sem fibromodulina e biglicano podem apresentar ossificação ectópica do tendão [103].

Ainda sobre estudos com modelos animais *knockout*, foi demonstrado que mutações ou falta de laminina resulta em retardo de crescimento e/ou distrofia muscular. Assim como, mutações das integrinas também pode levar à distrofia muscular [116,117]. Além disto, estudos indicam que a homeostase muscular e tendínea é alterada quando há uma lesão em qualquer um dos tecidos [96,97,118]. Assim, Barin e colaboradores [96,97,118], investigaram a plasticidade do tendão calcâneo em resposta à lesão do músculo gastrocnêmico, em diferentes *time points*, com ênfase na expressão gênica e outras análises morfológicas [118]. E demonstraram que o processo de remodelamento tecidual muscular perdura pelo menos 28 dias, assim como, nos primeiros dias após a lesão há desregulações nas vias de sinalização de alguns genes, por exemplo a redução das vias de sinalização do colágeno I [118].

Processo de reparo após lesão tendínea

Processos como síntese e remoção de colágeno orquestrados pelos tenoblastos, ocorrem tanto em períodos de reparo do tecido, quanto durante o desenvolvimento embrionário e regeneração [119]. Estes processos dependem da diferenciação ou amadurecimento de fibroblastos, que são células imaturas dispostas em cadeias longas, que podem apresentar diferentes formas e tamanhos (alongados, arredondados ou poligonais) [120,121] E só a partir deste amadurecimento, estas células são denominadas tenócitos [120,121].

O processo de reparo inicia assim que ocorre a lesão tendínea e este fenômeno é mediado por diversos mediadores que chegam ao local especificamente para atuar na restauração do tecido. Mediadores estes, compostos principalmente por enzimas, metaloproteinases (MMPs), fatores de crescimento, neuropeptídeos, entre outros [122–124]. Neste aspecto, a regeneração do tendão consiste em três fases consecutivas, são elas: fase inflamatória, proliferativa, e de remodelamento. Na fase inflamatória (1 a 7 dias

após a lesão) tem início logo após a lesão, pois a inflamação é um pré-requisito para que o processo de reparo aconteça, já que é uma resposta natural do organismo ao trauma lesivo [125–127]. Nesta fase, moléculas de fibrina e fibronectina são depositados pelas plaquetas dentro do hematoma, ou coágulo resultante, ativa a liberação de vários fatores quimiotáticos (vasodilatadores e moléculas pró-inflamatórias) que atraem as células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e monócitos do tecido próximo, para a fagocitose do coágulo [128,129]. Além disto, há uma grande liberação de fatores de crescimento, principalmente, Igf-1 e Tgf- β , fatores angiogênicos, assim como citocinas, que auxiliam na diferenciação, proliferação celular e síntese da MEC [128,130,131]. A fase proliferativa é marcada por um pico de 14 dias após a lesão, mas pode durar entre 8 e 21 dias [132]. Com ela, novos fatores de crescimento são expressos como *FGF*, *VEGF* [128,131]. Ocorre o recrutamento contínuo e intenso da proliferação de fibroblastos, que mediam a síntese de colágeno, proteoglicanos, entre outros componentes da MEC, os quais podem ser dispostos de forma totalmente aleatória [133]. Ou seja, esta fase é marcada pela tendinogênese, pois ocorre uma constante deposição de matriz, constituída principalmente por colágeno do tipo III, acompanhada de um elevado teor de água e acentuada atuação de células e componentes da MEC [133]. E por último, a fase de remodelamento, que tem início cerca de 21 dias após a lesão [134]. Fase esta, marcada pela síntese de glicosaminoglicanos e decréscimo de celularidade e de componentes da MEC, como a redução gradual do colágeno tipo III [132]. Neste estágio, as células apresentam uma forma mais alongada entre os feixes de colágeno, que por sua vez, situam-se de forma organizada no eixo longitudinal tendíneo [131,135]. No entanto, acredita-se que o tecido reparado jamais retornará suas respectivas funções biomecânicas e morfologia de um tendão nunca lesionado [131]. Uma das teses para esta crença é de que a lesão tendínea é seguida de uma intensa resposta fibrótica, capaz de restaurar o

tecido, mas que o deixa mais espesso e mais rígido, limitando sua estrutura e capacidade [131,136].

Alterações musculares diante de uma lesão tendínea

Assim como demonstrado nos tópicos anteriores, o estímulo mecânico é essencial para a manutenção da arquitetura muscular e o inverso também é verdadeiro. Levando em consideração que os tendões e músculos são dois componentes fundamentais do sistema musculoesquelético é fundamental ressaltar que qualquer lesão em um deles pode afetar o outro [137]. Portanto, a lesão de tendão é capaz de provocar alterações na funcionalidade do músculo, tanto em questões biomecânicas, gerando limitações funcionais. Como na morfologia do tecido, desencadeando perda de massa muscular, por exemplo. Informações estas, foram evidenciadas em alguns estudos com tenotomia, os quais indicaram a redução do número de capilares no músculo, acúmulo de gordura intramuscular, redução da elasticidade muscular, diminuição da circulação e também a acentuação da quantidade de tecido conjuntivo intramuscular [137–139].

Kubo et al. [140], que relatou que a imobilização prolongada após uma lesão no tendão pode levar a uma diminuição significativa na massa muscular e força muscular, além de uma maior proporção de fibras musculares de contração lenta. Esse resultado indica uma mudança no perfil de ativação muscular, que pode dificultar a recuperação adequada do tendão. Uma referência complementar seria o estudo realizado por Gerber, Schneeberger et al. [137] sugerindo que o grau das adaptações musculares podem aumentar de acordo com a gravidade da lesão no tendão, levando a modificações significativas na estrutura e função do músculo. E que tempo decorrido desde a lesão do tendão também influencia na intensidade dessas alterações, podendo resultar em perda de massa muscular e acúmulo de gordura intramuscular. Visto que, esses fatores prejudicam o processo de recuperação do tendão, pois afetam negativamente a força e a resistência

do músculo, tornando-o menos capaz de fornecer o suporte necessário ao tendão lesionado [137].

Além disto, as lesões também podem desencadear uma resposta inflamatória no tecido tendíneo, que pode levar a uma disfunção celular e a um aumento da apoptose (morte celular programada). Conseqüentemente, a lesão do tendão reduz a capacidade das células musculares de sintetizar RNA mensageiro necessário para produzir proteínas contráteis, comprometendo ainda mais a função muscular [141,142]. Nesta perspectiva, Kjaer et al [143] sugeriu que as alterações moleculares ocorrem em resposta à lesão do tendão, afetando o músculo associado. Com isto, os músculos podem perder sua elasticidade devido à rigidez do tecido cicatricial que se forma no local da lesão, levando a um desequilíbrio muscular e a uma maior predisposição a lesões futuras. Os autores também enfatizam que estas alterações moleculares podem levar a um enfraquecimento e a uma diminuição da força muscular, além de uma diminuição na resposta contrátil em nível muscular [143]. Ou seja, diante desta gama de informações relacionadas a esta incrível interface entre músculos e tendões, é de suma importância que se tenha uma abordagem mais abrangente para a reabilitação de tendinopatias. Desta maneira, é importante considerar a reabilitação muscular em conjunto com o tratamento do tendão lesionado para garantir uma recuperação efetiva e prevenir a recorrência da lesão.

Neste sentido, vale ressaltar que este projeto é uma continuação do estudo de Barin e colaboradores [136], pois ao demonstrarem que o tendão calcâneo sofre remodelamento extracelular extensivo diante de uma lesão no músculo gastrocnêmio. Este projeto visa avaliar os possíveis efeitos deletérios no músculo, na presença de uma lesão parcial de tendão calcâneo, no que se refere às principais vias de sinalização da síntese e degradação muscular, bem como, dos componentes da matriz extracelular no processo de remodelamento. Permitindo a análise complementar ao primeiro estudo, para que desta

forma, suporte a hipótese de que alterações na integridade músculo-tendão sejam capazes de interferir na mecanotransdução entre ambos os tecidos, afetando suas funções biológicas.

Observação: Vale ressaltar que todas as figuras presentes foram adaptadas de imagens com licença total para reprodução e compartilhamento. Pois de acordo com a licença concedida pela empresa *Creative Commons*, o licenciante não pode revogar os direitos autorais destas imagens.

Objetivos

O objetivo do estudo foi analisar a adaptação do músculo gastrocnêmio diante da lesão parcial do tendão calcâneo após os intervalos de 3, 14, 28 e 55 dias.

Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica do músculo gastrocnêmio em cada intervalo (3, 14, 28 e 55 dias após lesão parcial) para compreender as principais vias envolvidas no processo de remodelamento muscular;
- Avaliar a atividade enzimática das MMPs no processo de remodelamento muscular (3, 14, 28 e 55 dias após lesão parcial);
- Avaliar o perfil inflamatório (3, 14, 28 e 55 dias após lesão parcial) incluindo as principais citocinas envolvidas na resposta imunológica do músculo esquelético.
- Avaliar as propriedades morfológicas e estruturais do músculo gastrocnêmio;

Hipótese

A hipótese do presente estudo foi de que o músculo gastrocnêmio seria perturbado diante de uma lesão parcial no TC.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 50 ratos Wistar de aproximadamente 2 meses, com peso médio de 261 ± 15 g, os quais foram randomizados aleatoriamente em 5 grupos (n= 10 animais por grupo): controle sem lesão parcial do tendão (C), grupo 3 dias após lesão parcial de tendão (RT-3d), grupo 14 dias pós lesão parcial de tendão (RT-14d), grupo 28 dias pós lesão parcial de tendão (RT-28d) e grupo 55 dias pós lesão parcial de tendão (RT-55d). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Católica de Brasília, UCB. Eles permaneceram agrupados em gaiolas plásticas, com livre acesso à água e ração peletizada, com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e temperatura controlada. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Além disto, o protocolo de pesquisa recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Pontifícia Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil **12/2019**. Todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais em overdose anestésica (injeção intraperitoneal de solução de xilazina 12 mg/Kg/peso corporal e cetamina 95 mg/Kg/peso corporal).

Após o tempo cronológico proposto, o músculo gastrocnêmio foi retirado para análises moleculares e morfológicas. Após a retirada, os músculos e divididos em duas porções similares com um corte transversal no seu ventre. Uma porção (superior - gastrocnêmio medial) foi utilizada para a extração de RNA total e proteína total, e a outra (inferior - gastrocnêmio medial) foi utilizada para análise histológica. Os músculos destinados para análises moleculares foram então congelados e armazenados em freezer a -8°C . Os músculos destinados para a histologia foram colocados em tampão formalina 10% (pH 7,4). Para avaliar as propriedades morfológicas das fases da lesão, os tendões foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato salina (PBS) por 24 horas, após esta etapa, foram lavados em água destilada, desidratados em séries graduadas de etanol

(70%) e embebidos em parafina. Foram realizadas colorações com hematoxilina. Para melhor entendimento, as etapas do desenho experimental foram ilustradas na **Figura 6**.

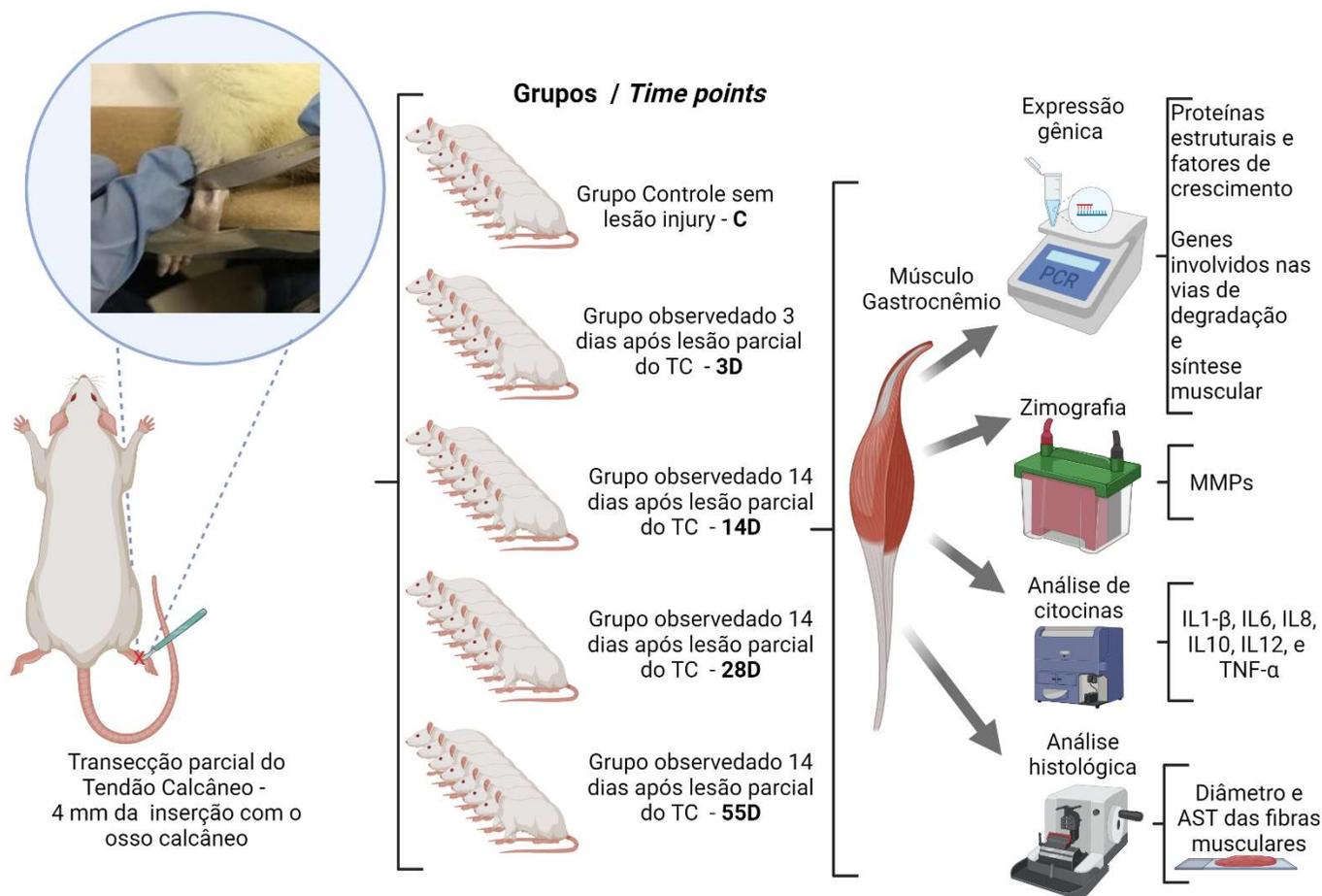


Figura 1. Desenho experimental. Foram utilizados 50 ratos Wistar com aproximadamente 2 meses de idade. Dividido aleatoriamente em cinco grupos: [C] Grupo Controle; [3D] Grupo 3 dias após lesão parcial do TC; [14D] Grupo 14 dias após lesão parcial do TC; [28D] Grupo 28 dias após lesão parcial do TC; [55D] Grupo 55 dias após lesão parcial do TC. Após a coleta do músculo gastrocnêmio, foram realizadas as análises: Expressão Gênica, Zimografia, Análise de Citocinas e Análise Histológica.

Protocolo de lesão parcial do tendão calcâneo

A indução à lesão no TC, os animais foram anestesiados utilizando injeção intraperitoneal de solução de xilazina (12 mg/kg/peso corporal) e cetamina (95 mg/kg/peso corporal). Após este procedimento, a pata posterior direita foi submetida à assepsia e tricotomia. Uma transecção parcial transversa foi executada na região proximal do tendão a uma distância de 4 mm de sua inserção com o osso calcâneo conforme protocolo já validado [144]. Posteriormente, os animais foram alocados em gaiolas com água e alimentação *ad libitum*, e observados até que o efeito do anestésico tenha terminado.

Extração de RNA de amostras de Músculo Gastrocnêmio

Amostras de 30 animais (6 por grupo) foram homogeneizadas em um microtubo contendo cinco esferas de aço inoxidável (diâmetro, 2,3 mm) (BioSpec Products, Bartlesville, OK, EUA) e três partículas de carbeto de silício (1 mm) (BioSpec Products), agitadas em FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA). Para que a homogeneização completa do tecido fosse realizada, o processo de agitação foi repetido 4 vezes de 20 segundos cada, com resfriamento em gelo com água entre cada etapa de agitação para evitar a degradação do RNA. Após esta etapa, o RNA total foi extraído de acordo com o método Trizol descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Um espectrofotômetro NanoDrop[®] (ND-1000; NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, EUA) foi usado para quantificar as concentrações de RNA em cada amostra, determinando a razão de absorvância de 260–280 nm.

Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A qRT-PCR foi realizada utilizando o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA – Cat. 4304437). A reação de amplificação foi realizada pelo QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante. 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 qRT-PCR foi realizada usando um sistema de PCR em tempo real QuantStudio 3 (Applied Biosystems) para os genes apresentados na Tabela 1. Para cada gene, todas as amostras foram amplificadas simultaneamente em formato de duplicatas da mesma amostra de cDNA em uma única corrida. Como gene constitutivo foi utilizado o RPLP0 e a actina- β , no entanto o RPLP0 foi escolhido como normalizador por ter se mostrado mais estável entre os grupos experimentais.

Tabela 1. Listas dos genes:

mRNA	Code (Life technologies)	mRNA	Code (Life technologies)
<i>Actb</i>	Rn00667869	<i>Mstn</i>	Rn00569683_m1
<i>Akt</i>	Rn00667869_m1	<i>Murf</i>	Rn00590197_m1
<i>Bgn</i>	Rn01529736_m1	<i>Myod1</i>	Rn01457527_g1
<i>Colla1</i>	Rn01463848_m1	<i>Rplp0</i>	Rn03302271_gh
<i>Col3a1</i>	Rn01437681_m1	<i>Smad2</i>	Rn00569900_m1
<i>Ctgf</i>	Rn01537279_g1	<i>Smad3</i>	Rn00565331_m1
<i>Dcn</i>	Rn01503161_m1	<i>Tgf-β1</i>	Rn00572010_m1
<i>Egr1</i>	Rn00561138_m1	<i>Timp-1</i>	Rn01430873_g1
<i>Fmod</i>	Rn00589918_m1	<i>Timp-2</i>	Rn00573232_m1
<i>Igf-1a</i>	Rn00710306_m1	<i>Vegf</i>	Rn01511602_m1
<i>Mmp2</i>	Rn01538170_m1	<i>Pax7</i>	Rn01518732_m1

Tabela 1

Proteína Quinase B (*Akt*), Biglicano (*Bgn*), Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo I (*Colla1*), Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo III (*Col3a1*), Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (*Ctgf*), Decorina (*Den*), Resposta de Crescimento Precoce 1 (*Erg1*), FoxO (*FoxO*), Fator de Crescimento semelhante à insulina (*Igf1a*), Fibromodulina (*Fmod*), Metaloproteinase de Matriz-2 (*Mmp-2*), Miostatina (*Mstn*), E3 Ubiquitina-Proteína Ligase TRIM63 (*Murf-1*), Proteína de Determinação de Mioblastos 1 (*Myod1*), Proteína Ribossomal LP (*Rplp0*), Smad2 (*Smad-2*), Smad3 (*Smad-3*), Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (*Tgf- β 1*), Inibidor de Metaloproteinase-1 (*Timp-1*), Inibidor de Metaloproteinase-2 (*Timp -2*), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vegf*), *Box Pared 7 (Pax7)*. Proteína Ribossômica S6 Quinase Beta-1 (*P70s06k*).

Determinação da atividade de MMPs por zimografia

O extrato tecidual de músculo foi testado para a verificar a presença de atividade de metaloproteases por meio da técnica de zimografia, conforme descrito por Cleutjens [145]. As amostras foram homogeneizadas em tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0; 0,15 M NaCl; 1 μ M ZnCl₂; 20 mM CaCl₂; 1,5 mM NaN₃ e 0,01% de Triton X-100] (25 mg de tampão para cada mg de tecido) e incubadas a 4°C por um período de 24 horas. Após este período, o tampão de extração foi coletado por centrifugação (30 minutos, 4°C em 13000rpm). Finalizada a extração, 10 μ g de proteína foram adicionadas à 10 μ L de uma solução de tampão de amostra sem β -mercaptoetanol (agente redutor) para serem resolvidas por eletroforese. O gel de corrida, foi constituído de poliacrilamida (10%) contendo SDS e gelatina na concentração final de 1mg/ml para eletroforese. Para identificação das isoformas latente, intermediária e ativa das MMPs, foram adicionados 5 μ L do marcador de massa molecular pré-corado (SM0671 - Fermentas) em um dos poços. Após a corrida, o gel foi lavado 2 vezes durante 20 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl₂ 5mM; NaN₃ 0,02% e ZnCl₂ 10 mM), a 37°C, por 18 horas. Após este tempo, foi corado com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade. A pipetagem foi realizada pelo mesmo pesquisador a fim de reduzir

as variáveis que pudessem resultar em erros. Ademais, a realização dos géis foi em remessa e as corridas duraram aproximadamente 5 horas e 30 minutos. O programa ImageScanner III, Lab- digitalização 6.0 foi utilizado para determinar a atividade das metaloproteases pela densitometria de bandas. A intensidade das bandas foi avaliada em pixels com o uso do programa Image Master 2D Platinum 7.0 software.

Painel inflamatório

O sangue foi coletado e o soro obtido foi mantido congelado a -80 °C até o descongelamento para avaliação dos mediadores imunológicos. As concentrações de citocinas foram avaliadas por um método de citometria de fluxo multiplexado usando um conjunto de imunoensaio baseado em esferas conhecido como *kit Mouse Inflammatory CBA* fabricado pela BD Biosciences (San Diego, CA, EUA), e usado de acordo com os protocolos do fabricante que produziram medições para 6 mediadores circulantes diferentes, como segue: interleucina-1 β (IL1 β), IL6, IL8, IL10, IL12 e fator de necrose tumoral- α (TNF α). Resumidamente, os padrões de citocinas liofilizadas e as amostras de soro foram processados e os resultados adquiridos utilizando o citômetro de fluxo BD FACSVers, canal FL4. Trezentos eventos foram adquiridos para cada esfera de citocina utilizada. Os dados foram analisados utilizando o software FCAP, versão 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Curvas padrão para cada citocina foram geradas utilizando mistura padrão de mediadores fornecidos. A concentração em cada soro foi determinada por interpolação da curva padrão correspondente.

Análise Histológica do Músculo

O músculo gastrocnêmio foi processado para análise histológica. Cortes histológicos seriados foram fixados em formalina tamponada a 10% (pH 7,4) e embebidos em parafina. Os cortes foram cortados com espessura de 4 μ m utilizando um micrótomo

(Leica RTS2125, Nussloch, Alemanha). Os cortes transversais foram corados com hematoxilina e eosina (HE, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Avaliar aspectos morfológicos, diâmetro da fibra muscular e área de secção transversa da fibra (AST). Imagens das seções coradas foram capturadas usando um microscópio (Axioplan 2, Zeiss, Alemanha) com magnificação de 400x. As imagens obtidas foram analisadas no software Image J (National Institute of Health) e os dados foram submetidos à análise estatística. Além disso, foram selecionados cortes histológicos de cada tendão calcâneo localizado na região central da lesão parcial para identificar a extensão da lesão e as fases subsequentes de acordo com os grupos experimentais.

Análise estatística

Os resultados da expressão gênica foram analisados e apresentados de acordo com Heinemeier et al. (2007) e Marqueti et al. (2018). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade das variáveis e o teste de Levene para analisar a homogeneidade da variância. Para as variáveis que não apresentaram homogeneidade de variância, foi aplicado o teste de Welch para ajuste dos graus de liberdade dos resíduos. Os valores médios foram comparados entre os grupos por ANOVA unidirecional com correção de Bonferroni aplicada para comparações múltiplas. Em relação aos dados que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando apropriado, comparações pareadas foram realizadas usando o procedimento de correção de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância foi $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

Resultados

Peso dos animais

A análise comparativa do peso dos animais, iniciando com um peso médio de cerca de 261 ± 15 g aos 2 meses de idade. Os animais apresentaram aumento de peso significativo apenas nos dias 28 e 55 dias após a lesão parcial no TC ($p > 0,05$) (**Figura 7**).

Figura 7. Comparação do peso médio de ratos Wistar com aproximadamente 2 meses de idade e peso médio de 261 ± 15 g em diferentes período de tempo após lesão parcial do tendão. Valores médios de peso foram coletados e analisados para identificar possíveis variações ao longo do tempo.

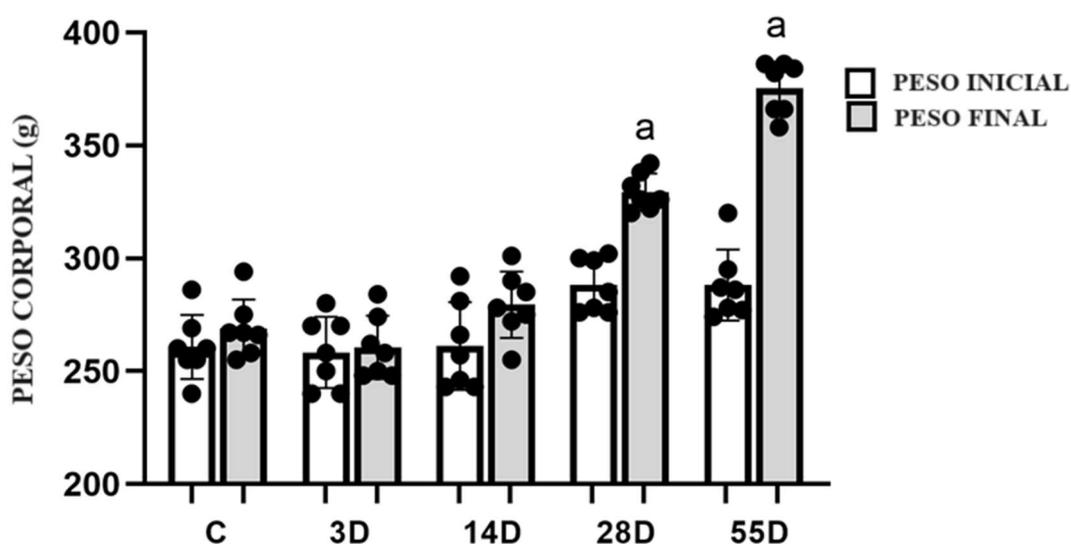


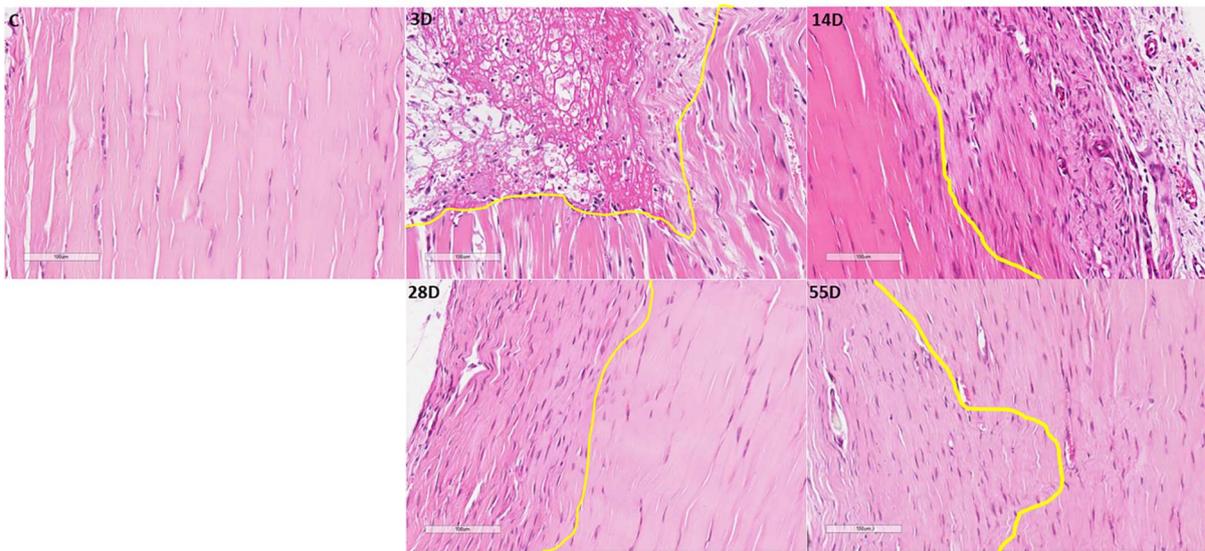
Figura 2

Morfologia da lesão parcial do tendão calcâneo

Para validar a presença da lesão parcial no TC, foi realizada análise qualitativa dos cortes histológicos corados com HE em todos os grupos experimentais (**Figura 8**). Foi possível observar que as estruturas tendíneas estão preservadas e não parecem estar em qualquer desorganização no grupo C. Em contrapartida o grupo 3D apresentou anormalidades estruturais mais pronunciadas limitadas por uma linha amarela provavelmente indicando a presença de infiltrados inflamatórios e separação clara entre as fibras do tendão. No grupo 14D é perceptível menos desorganização estrutural, presença de tecido cicatricial e menor atividade de células inflamatórias. Não se observa infiltração inflamatória no

grupo 28D e há menor composição tecidual cicatricial, indicando que se encontra na fase final do processo de regeneração. No grupo 55D, o tecido parece semelhante ao grupo controle.

Figura 8. Avaliação histológica do processo de cicatrização do tendão de Aquiles nos cinco diferentes grupos pós-lesão com coloração de hematoxilina-eosina (HE). (C): Grupo controle; (3D): Grupo 3 dias pós-lesão; (14D): Grupo 14 dias pós-lesão; (28D): Grupo 28 dias pós-lesão; (55D): Grupo 55 dias pós-lesão. Ampliação: 400x. A barra representa 40 μ m.



Lesão do tendão Calcâneo altera a expressão gênica no músculo gastrocnêmio em ratos

Para analisar o impacto da lesão do TC no músculo gastrocnêmio, foi avaliada a expressão de genes-chave que regulam a homeostase da MEC e seu remodelamento. A análise da expressão gênica foi normalizada pelo gene constitutivo RPLP0. Também testamos a β -actina e o GAPDH, mas eles não se apresentaram tão estáveis quanto o RPLP0.

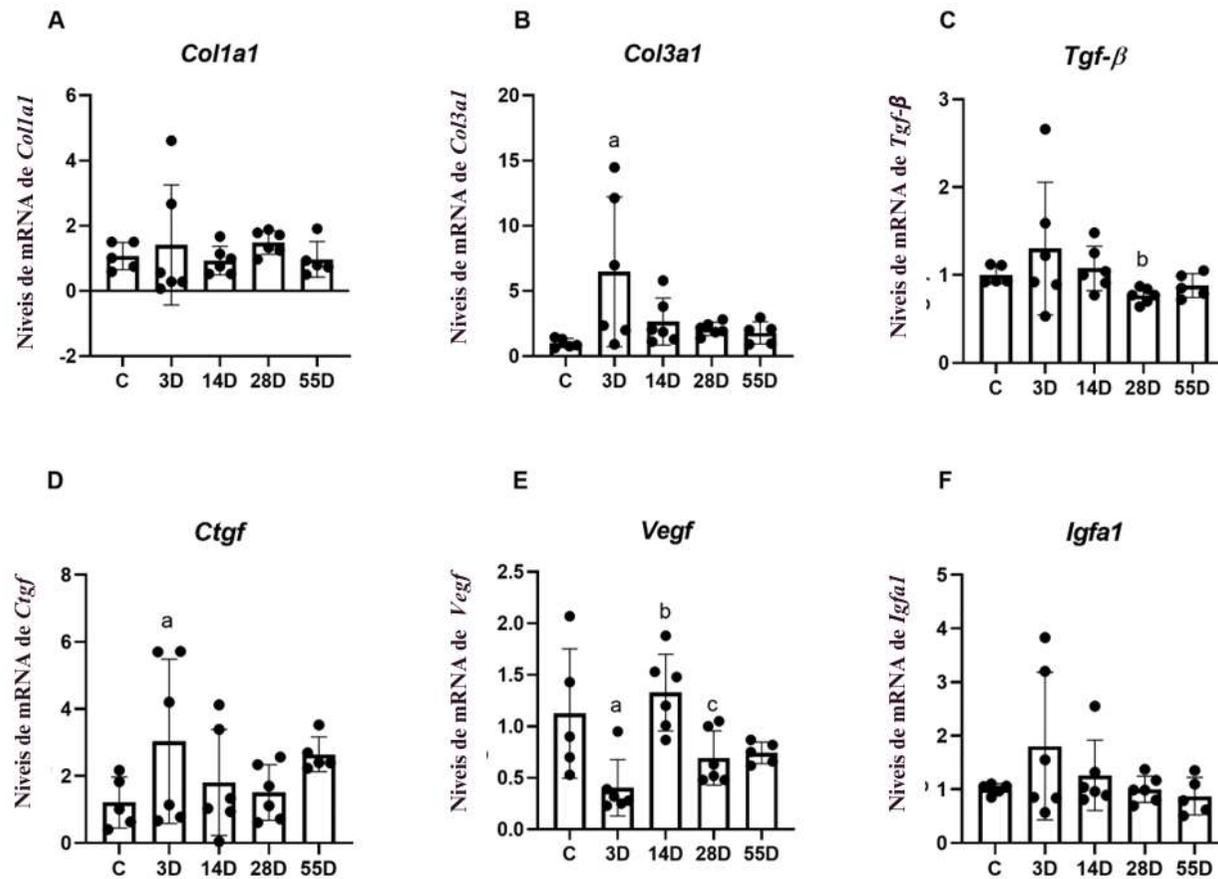


Figure 9. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio. [A-B] Proteínas Estruturais: colágeno tipo III (*Col3a1*), colágeno tipo I (*Col1a1*); [C-F] Fatores de crescimento: fator de crescimento transformador beta 1 (*Tgf-β1*), fator de crescimento endotelial vascular (*Vegf*), fator de crescimento semelhante à insulina IA (*Igf-ia*) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (*Ctgf*). C): Grupo controle; (3D): Grupo 3 dias pós-lesão; (14D): Grupo 14 dias pós-lesão; (28D): Grupo 28 dias pós-lesão; (55D): Grupo 55 dias pós-lesão. (a ≠ grupo controle; b ≠ grupo 3D; c ≠ grupo 14D; d ≠ grupo 28D)

Proteínas estruturais e Fatores de Crescimento: os níveis de mRNA de *Col3a1* apresentaram *upregulation* no grupo 3D quando comparado ao grupo C ($p=0,028$) (**Figura 9A**). Não houve diferenças nos níveis de mRNA do gene *Colla1* entre os grupos ($p>0,05$) (**Figura 9B**). Por outro lado, observou-se *downregulation* nos níveis de mRNA de *Tgf-b* no grupo 28D quando comparado ao grupo 3D ($p= 0,007$) (**Figura 9c**). Assim como houve *upregulation* na expressão do gene *Ctgf* no grupo 3D quando comparado ao grupo controle ($p=0,035$) (**Figura 9D**). Dentre os fatores de crescimento o gene que mais apresentou alterações entre os grupos nos níveis de expressão foi o *Vegf*, sendo que no grupo 3D houve *downregulation* quando comparado ao grupo controle ($p= 0,024$) (**Figura 9E**), no grupo 14D houve *upregulation* dos níveis de mRNA do mesmo gene quando comparado ao grupo 3D ($p=0,001$) (**Figura 9E**) e por fim *downregulation* no grupo 28D quando comparado ao grupo 14D ($p=0,042$) (**Figura 9E**). No entanto, quando se trata dos níveis de expressão do gene *Igfa1*, não foram encontradas diferenças entre os grupos ($p>0,05$) (**Figura 9F**)

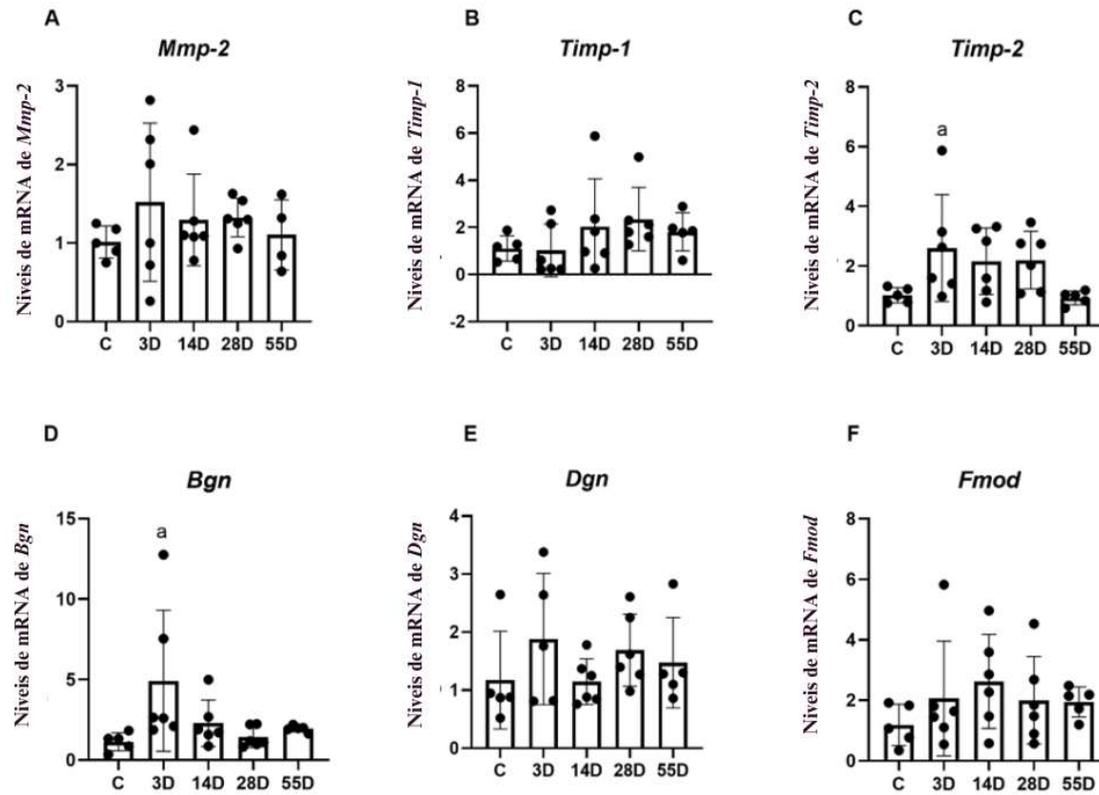


Figura 10. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio. [AC] Enzimas de remodelamento de matriz: metaloproteinase de matriz-2 (*Mmp-2*), inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz-1 (*Timp-1*) e inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz-2 (*Timp-2*) [DF]; Pequenos proteoglicanos ricos em leucina: biglicano (*Bgn*), decorina (*Dcn*) e fibromodulina (*Fmod*). C): Grupo controle; (3D): Grupo 3 dias pós-lesão; (14D): Grupo 14 dias pós-lesão; (28D): Grupo 28 dias pós-lesão; (55D): Grupo 55 dias pós-lesão. (a ≠ grupo controle; b ≠ grupo 3D; c ≠ grupo 14D; d ≠ grupo 28D).

Figura 5

Enzimas de remodelamento da matriz e Pequenos proteoglicanos ricos em leucina:

Apesar de não ter sido observadas alterações nos níveis de expressão dos genes *Mmp-2* e *Timp-1* entre os grupos ($p>0,05$) (**Figura 10A e 10B, respectivamente**). Foi percebido o aumento dos níveis de mRNA do gene *Timp-2* no grupo 3D em comparação ao grupo controle ($p=0,038$) e no grupo 55D quando comparado ao grupo 3D ($p=0,028$) (**Figura 10C**). Para os *SLRP*, foi constatado *upregulation* dos níveis de mRNA do gene *Bgn* no grupo 3D em comparação com o grupo C ($p<0,01$) (**Figura 10D**). Entretanto, não houve alterações nos níveis de expressão dos genes *Dcn* e *Fmod* entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (**Figura 10E e 10F, respectivamente**).

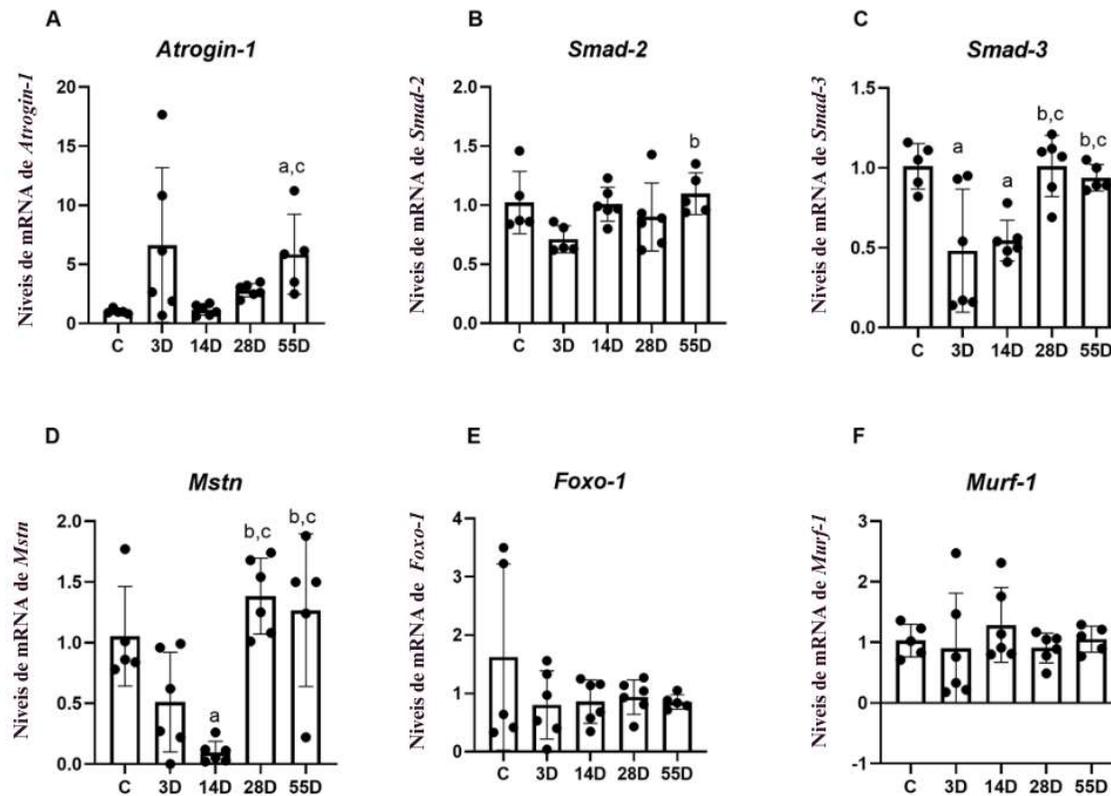


Figura 11. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio. [A-F] Genes envolvidos nas vias de degradação: Atroquina (*Atrogin-1*), Smad2 (*Smad2*), Smad3 (*Smad3*), Miostatina (*Mstn*), Proteína Forkhead box O1 (*FoxO*), proteína RING-finger muscular-1 (*Murf-1*). C): Grupo controle; (3D): Grupo 3 dias pós-lesão; (14D): Grupo 14 dias pós-lesão; (28D): Grupo 28 dias pós-lesão; (55D): Grupo 55 dias pós-lesão. (a ≠ grupo controle; b ≠ grupo 3D; c ≠ grupo 14D; d ≠ grupo 28D).

Vias de sinalização de degradação: Houve *upregulation* dos níveis de mRNA do gene *Atrogin-1* no grupo 55D quando comparado aos grupos controle e ao grupo 14D ($p=0,030$; $p=0,029$, respectivamente), assim (**Figura 11A**). Para os níveis de *Smad2*, foi observada *upregulation* no grupo 55D quando comparado ao grupo 3D ($p= 0,002$) (**Figura 11B**). Da mesma forma, que foi notado *downregulation* do gene *Smad3* nos grupos 3D e 14D quando comparados aos grupos controle ($p=0,005$; $p=0,015$, respectivamente) (**Figura 11C**), bem como *downregulation* desse mesmo gene nos grupos 28D e 55D em comparação ao grupo 3D ($p=0,003$; $p=0,017$, respectivamente) (**Figura 11C**) e *downregulation* no grupo 28D em comparação ao grupo 14D ($p=0,009$) (**Figura 11C**). O gene *Mstn* (Miostatina) também apresentou *upregulation* no grupo 14D quando comparado ao grupo 13D ($p=0,005$) (**Figura 11D**), além disso, houve um aumento dos níveis de expressão desse mesmo gene para o grupo 28D em comparação aos grupos 3D e 14D ($p=0,007$; $p<0,01$, respectivamente) (**Figura 11D**). Houve também *upregulation* no grupo 55D quando comparado aos grupos 3D e 14D ($p=0,032$; $p<0,01$) (**Figura 11D**). Finalmente, para os genes *FoxO* e *Murf-1*, não foram observadas alterações significativas ($p>0,05$) (**Figura 11E e 11F, respectivamente**).

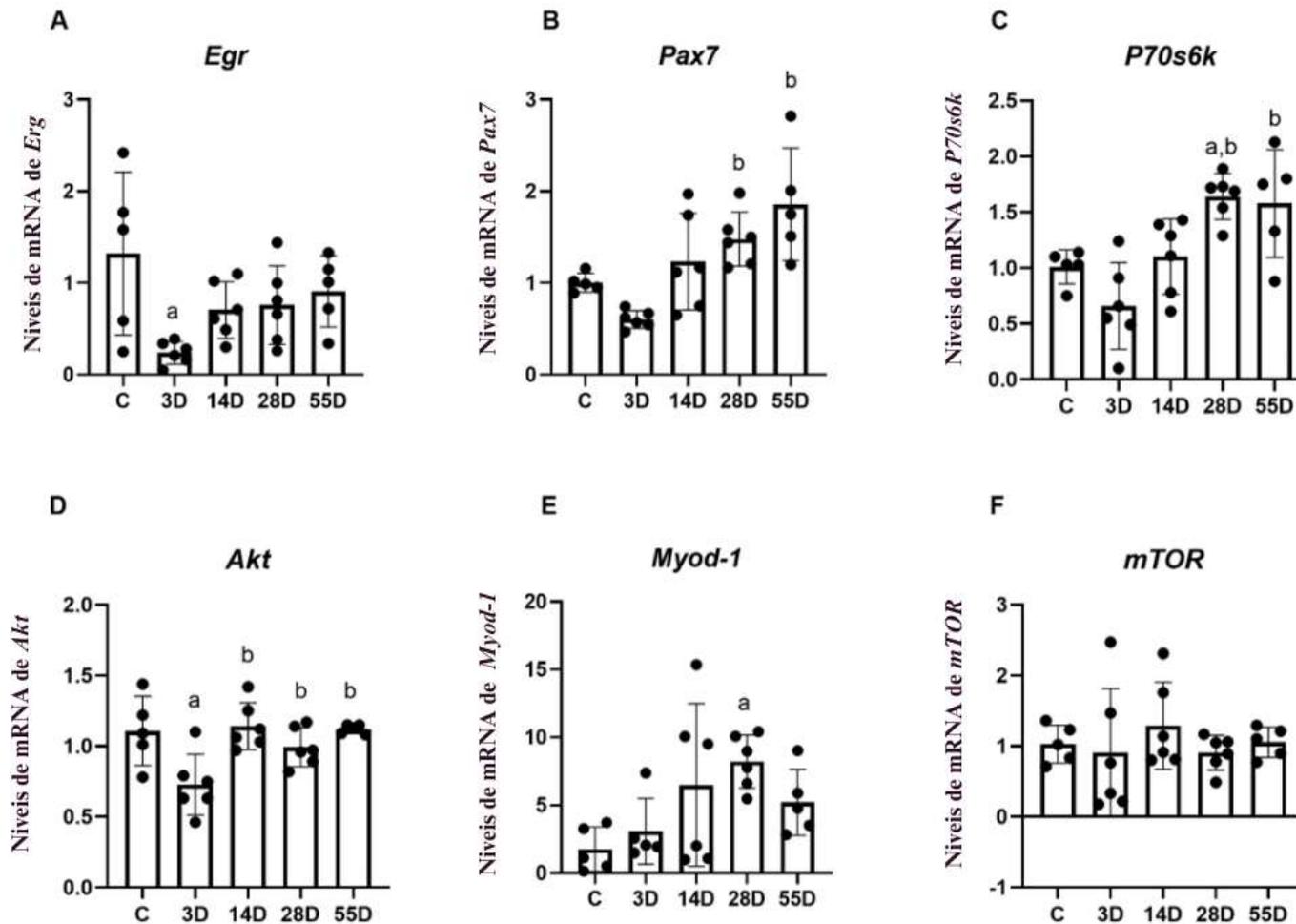


Figura 12. A lesão parcial do tendão calcâneo modifica a expressão gênica relacionada à síntese, remodelamento e reparo do músculo gastrocnêmio. [A-F] Genes envolvidos nas vias de sinalização de síntese: resposta de crescimento precoce 1 (*Erg1*), proteína ribossômica 70 kDa S6 quinase (*P70S6K*), AKT1 (*Akt*), Paired Box 7 (*Pax7*), Diferenciação Miogênica 1 (*Myod1*), alvo mamífero de rapamicina (*m-TOR*). C): Grupo controle; (3D): Grupo 3 dias pós-lesão; (14D): Grupo 14 dias pós-lesão; (28D): Grupo 28 dias pós-lesão; (55D): Grupo 55 dias pós-lesão. (a ≠ grupo controle; b ≠ grupo 3D; c ≠ grupo 14D; d ≠ grupo 28D).

Vias de sinalização de síntese: os níveis de mRNA do gene *Erg* apresentaram *downregulation* no grupo 3D quando comparado ao grupo controle ($p=0,010$) (**Figura 12A**). Para os níveis de expressão de *P70s6k* houve *upregulation* no grupo 28D quando comparado ao grupo controle e 3D ($p= 0,034$; $p<0,01$, respectivamente) (**Figura 12B**), assim como *upregulation* no grupo 55D quando comparado ao grupo Grupo 3D ($p<0,01$) (**Figura 12B**). Os níveis de mRNA do gene *Akt* apresentaram *downregulation* no grupo 3D em comparação com o grupo controle ($p=0,048$) (**Figura 12C**) e no grupo 28D em comparação com o grupo 3D ($p=0,046$) (**Figura 12C**). E *upregulation* desse gene foi observada nos grupos 14D e 55D em relação ao grupo 3D ($p<0,01$; $p=0,002$, respectivamente) (**Figura 12C**). Além disso, os níveis de Pax7 apresentaram *upregulation* nos grupos 28D e 55D em comparação com o grupo 3D ($p=0,006$; $p>0,01$, respectivamente) (**Figura 12D**). Para a expressão do gene *Myod1* houve *upregulation* apenas no grupo 28D em relação ao grupo controle ($p= 0,031$) (**Figura 12E**). Por fim, não foram observadas alterações nos níveis de expressão do gene mTOR entre os grupos ($p>0,05$) (**Figura 12F**).

A lesão parcial no tendão calcâneo influencia atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio

Considerando a atividade proteolítica, foi observado aumento na isoforma MMP-2 pró nos grupos 28D e 55D quando comparada ao grupo controle. Ademais, o grupo 55D apresentou também aumento quando comparado ao grupo 3D. Não houve alterações entre os grupos em relação a isoforma ativa da MMP-2.

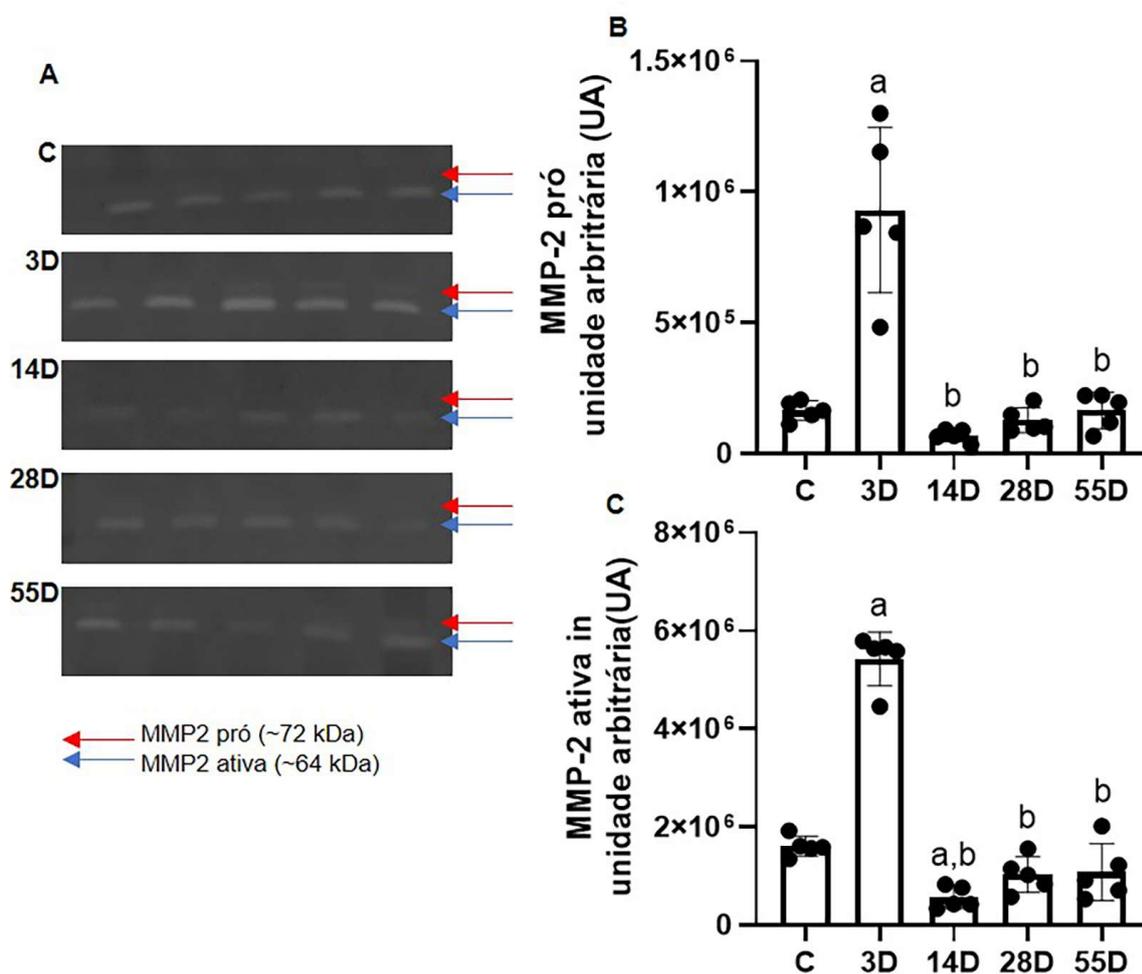


Figura 8

Figura 13. Atividade das isoformas pró e ativa da metaloproteinases de matriz 2 no músculo gastrocnêmio.

Painel Inflamatório

O painel inflamatório apresentou diferenças apenas no caso da IL-8 e exclusivamente no grupo 55D quando comparado ao grupo 28D ($p < 0,05$). As demais citocinas não apresentaram diferenças significativas (**Figura 14A**).

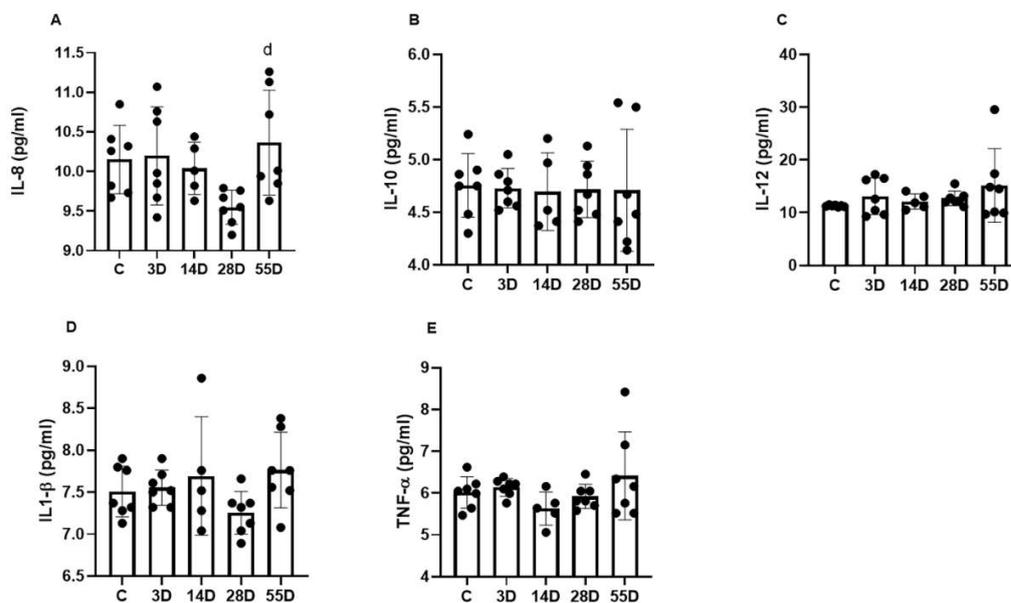


Figura 9

Figura 14. Avaliação do painel inflamatório do músculo gastrocnêmio de ratos, das seguintes moléculas: **[A]**: Interleucina-8 (*IL-8*); **[B]**: Interleucina-10 (*IL-10*); **[C]**: Interleucina-12 (*IL-12*); **[D]**: Interleucina-1-Beta (*IL-1-β*); **[E]**: Fator de Necrose Tumoral-Alfa (*TNF-α*). C): Grupo controle; (3D): Grupo 3 dias pós-lesão; (14D): Grupo 14 dias pós-lesão; (28D): Grupo 28 dias pós-lesão; (55D): Grupo 55 dias pós-lesão.

Análise morfológica do remodelamento do tecido muscular

A coloração HE foi realizada para as análises morfológicas considerando a área de secção transversa (AST) e diâmetro do músculo gastrocnêmio em todos os grupos experimentais (Figura 13 A - E). Foi observado que o grupo 55D apresentou um aumento da AST quando comparado aos

demais grupos experimentais (C, 3D, 14D e 28D) (**Figura 15 E e F**), Quanto ao diâmetro, o grupo 55D apresentou diferenças quando comparado aos grupos controle, 3D e 28D (**Figura 15 E e G**).

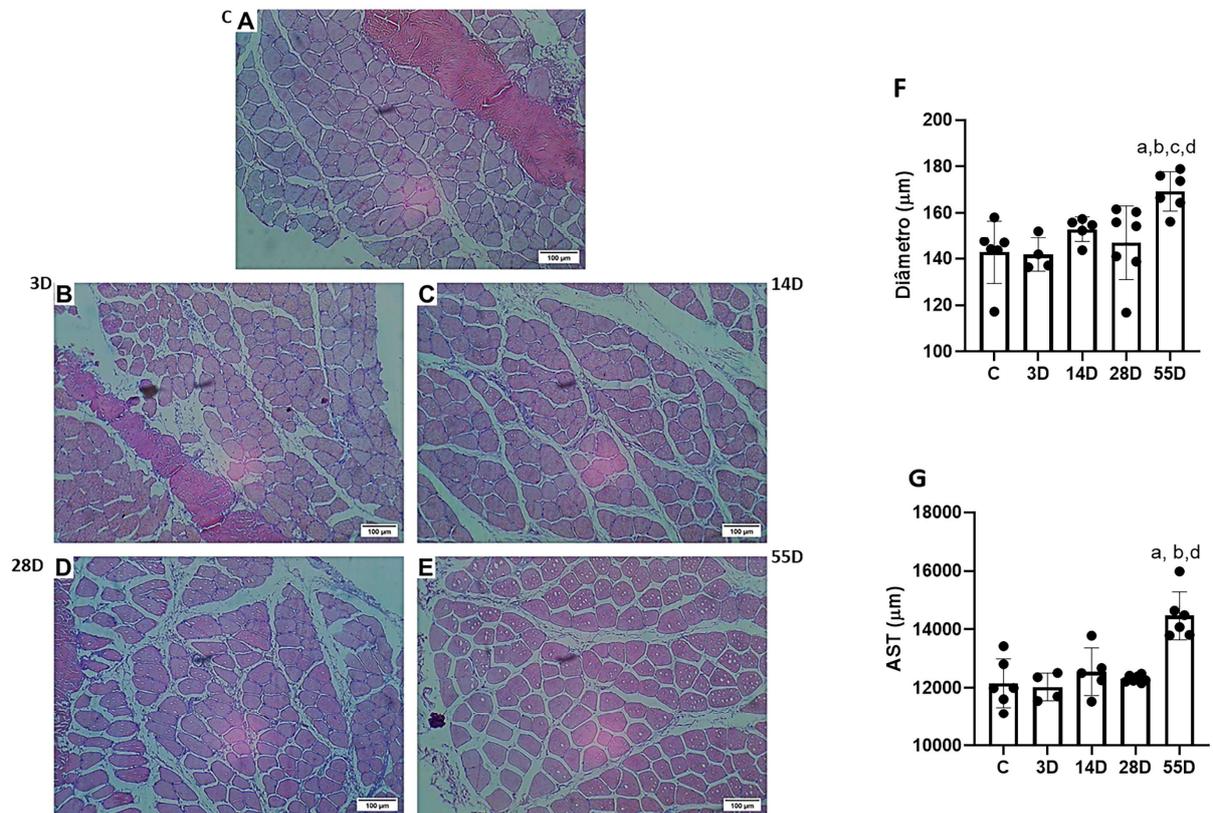


Figura 10

Figura 15. Avaliação morfológica do músculo gastrocnêmio nos grupos controle, 3D, 14D, 28D e 55D. Painel [A-E]: Imagens representativas de seções coradas com HE mostrando o músculo gastrocnêmio em diferentes momentos pós-lesão. [F]: Quantificação da área de seção transversa (AST) do músculo gastrocnêmio em cada grupo experimental. O grupo 55D exibiu um aumento significativo na AST em comparação aos grupos controle, 3D, 14D e 28D. [G]: Comparação do diâmetro da fibra muscular entre o grupo 55D e os grupos controle, 3D, 14D e 28D. O grupo 55D apresentou diferenças significativas no diâmetro muscular em comparação aos grupos controle, 3D e 28D. (a ≠ grupo controle; b ≠ grupo 3D; c ≠ grupo 14D; d ≠ grupo 28D).

DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi investigar os efeitos da lesão parcial do TC e a possível repercussões do gastrocnêmio em modelo de rato, ao longo de um quadro temporal estendido. Análise de expressão gênica indicava alterações agudas, principalmente 3 dias após a lesão parcial da TC. Esta descoberta, sugere uma estreita relação entre tendões e músculos, pois os tendões transmitem a força das contrações musculares para as inserções ósseas, sugerindo que lesões no tendão pode liberar sinais que afetam a homeostase muscular logo após a lesão. Além disso, análises morfológicas indicou uma resposta tecidual tardia, com aumento da AST e do diâmetro da contagem de fibras musculares apenas 55 dias após o ruptura parcial da TC. Embora a expressão gênica e a morfologia tenham sido consideradas interessantes, não houve mudanças significativas no perfil inflamatório do gastrocnêmio ao longo do tempo. Isto sugere que o ambiente intracelular e a sinalização pode não ser afetada pelo ambiente inflamatório, mesmo com uma lesão na TC. Estes achados destacam a importância de avaliar como as lesões dos tendões impactam os músculos adjacentes e enfatizar a necessidade de uma abordagem terapêutica focada para alcançar a recuperação completa do tecido.

Respostas musculares agudas à lesão parcial do tendão (3D e 14D):

Este estudo demonstrou que as alterações musculares mais substanciais foram observadas durante o período de 3 dias após a lesão na TC. Genes como *Col3a1* e *Ctgf* apresentaram regulação positiva em 3 dias. Apesar da existência de vários estudos que correlacionam a atividade de *Ctgf* com *Colla1*, ainda existem estudos inconclusivos sobre a relação direta entre *Col3a1* e *Ctgf* no músculo esquelético, embora ambos desempenhem papéis cruciais no suporte mecânico da contração muscular e na regulação da diferenciação celular em resposta à lesão. Portanto, o aumento a expressão desses genes na área suportada sugere uma possível associação com a lesão

parcial na TC [146,147]. É plausível que a mobilidade restrita possa induzir alterações nos tecidos conjuntivos, resultando em aumento da expressão de *Col3a1* e *Ctgf*. No entanto, é crucial notar que estas hipóteses permanecem especulativo, sendo necessários mais estudos para estabelecer um resultado definitivo. É importante enfatizar que o gastrocnêmio é um músculo fundamental no movimento do tornozelo e compartilha um tecido conjuntivo comum com a TC, e a interação entre as duas estruturas permite afetar os processos de remodelamento tecidual [143,148].

Ao contrário da regulação positiva evidenciada nos genes, a regulação negativa do *Vegf* foi identificada no período de três dias. O *Vegf* desempenha um papel crucial no desenvolvimento e na manutenção dos vasos sanguíneos, assim como na angiogênese no músculo esquelético em resposta a diversos estímulos fisiológicos, como exercícios e lesões [149]. Além disso, atua como um fator de sobrevivência para as células musculares, protegendo-as contra apoptose e atrofia muscular [149]. Nesse mesmo intervalo temporal, Além disso, neste mesmo contexto temporal, o gene *Akt*, uma molécula intrinsecamente envolvida na regulação do crescimento e da adaptação muscular, desempenhando um papel significativo na homeostase muscular [150], também apresentou uma regulação negativa semelhante. A interação entre esses dois genes é crucial para a manutenção da função muscular. O *Vegf* é capaz de ativar a via de sinalização *Akt/PI3K*, essencial para a sobrevivência, supervisão e migração de células endoteliais. Essa ativação não está apenas associada à regulação vascular, mas também desencadeia eventos essenciais para o crescimento de novos vasos sanguíneos, um processo fundamental conhecido como angiogênese [151]. Além disso, o *Vegf* exerce influência significativa na regulação do metabolismo celular em condições fisiológicas normais, modulando processos intracelulares que impactam diretamente a homeostase e a funcionalidade celular [151,152]. Neste sentido, a regulação negativa do gene *Vegf* pode ter implicações significativas na expressão da *Akt*, porém esta rede complexa e multifacetada ainda

precisa ser explicada por estudos posteriores para a compreensão plena em como esses genes interagem em diversos contextos fisiológicos e patológicos no músculo.

De uma perspectiva individualista, a diminuição da expressão de *Vegf* no músculo gastrocnêmio após lesão parcial do tendão pode ser atribuída ao aumento do fluxo sanguíneo para a área lesionada [153]. Este aumento do fluxo sanguíneo poderia resultar em maior disponibilidade de *Vegf* dentro do próprio tendão, reduzindo a necessidade de produção de *Vegf* pelo músculo adjacente [153]. Esta interrupção no fluxo sanguíneo pode resultar em um fornecimento reduzido de nutrientes e oxigênio disponível para as células musculares [154], o que subsequentemente leva à diminuição da atividade metabólica e à atenuação da expressão gênica importante para a função celular, como *Akt* [155]. Porém, é importante ressaltar que não existem estudos que avaliem especificamente qual mecanismo poderia resultar na diminuição desses genes no músculo 3 dias após a lesão do tendão [156].

A regulação positiva do *Bgn* no período 3D foi uma descoberta significativa. *Bgn* desempenha um papel crucial na manutenção da integridade estrutural e funcional do músculo esquelético [68,157], bem como na regulação da adesão celular e comunicação com a MEC [158]. Este achado oferece suporte substancial ao aumento nos níveis de mRNA de *Ctgf*, uma vez que há uma conexão direta e indireta entre os dois genes [159]. A interação entre *Bgn* e *Ctgf* emerge como um elemento essencial para a regulação da regulamentação e diferenciação celular, assumindo grande importância na organização da matriz extracelular na interface músculo-tendão. Esta interação influencia aspectos cruciais, como adesão celular, força de tração e integridade estrutural, conforme evidenciado por estudos prévios [160,161]. Neste contexto, o aumento da expressão de *Ctgf* pode estar associado à regulação da proliferação celular e à síntese da matriz extracelular, enquanto o aumento da expressão de *Bgn* pode estar associado ao remodelamento da MEC.

Além dos achados mencionados anteriormente, a regulação negativa do *Smad3* foi observada 3 dias após a lesão parcial. *Smad3* é uma importante proteína envolvida na via de sinalização do *TGF-β*, que regula vários processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e resposta imune no músculo esquelético [162]. A via de sinalização *Smad3/TGF-β* pode desempenhar um papel crucial na resposta inflamatória do músculo esquelético durante o envelhecimento e na patologia muscular, como a distrofia muscular [162]. Por outro lado, Yujie Li et al. (2022) discutem a importância da via de sinalização *Smad3/TGF-β* na cicatrização do tendão. A ativação desta via de sinalização desempenha um papel importante na resposta inflamatória, proliferação celular, diferenciação tecidual e remodelamento durante o processo de cicatrização do tendão [163]. A regulação negativa observada no *Smad3* no grupo 3D pode ser interpretada como uma resposta dinâmica frente à lesão, diminuindo uma adaptação às demandas específicas do processo de cicatrização. Isto sugere uma regulação finamente ajustada do *Smad3*, possivelmente como parte de um mecanismo intrínseco de controle, como atualização das fases da resposta cicatricial.

Outra informação relevante, foi o aumento da atividade da MMP-2 no músculo gastrocnêmio 3 dias após a lesão do tendão, tanto em sua isoforma pró quanto ativa. Isto é evidenciado pelo aumento simultâneo na expressão gênica de *Ctgf*, *Col3a1* e *Timp-2*, que poderia estar relacionado ao aumento da atividade da MMP-2 por zimografia. Os níveis elevados de *Timp-2* durante este período sugerem um esforço potencial para inibir o aumento da atividade da MMP-2 no tecido [164]. Embora pareça que estes genes estão a trabalhar juntos em resposta à lesão, é possível que o aumento de *Col3a1* e *Ctgf* tenha ocorrido devido ao aumento de factores de degradação como MMP-2 [165–167]. Em outras palavras, durante os primeiros dias após a lesão da TC, a regulação desses genes simultaneamente com a atividade da MMP-2 pode fazer parte de

um programa de resposta organizado, com o objetivo de prevenir maiores danos à função muscular. Esta interação orquestrada reflete os intrincados mecanismos regulatórios em ação à medida que o músculo esquelético sofre mudanças dinâmicas para restaurar a integridade do tecido.

Embora a ausência de alterações no painel de citocinas sugira que não há inflamação significativa no músculo, isso não exclui o provável envolvimento de outras vias de sinalização em resposta à lesão do tendão. Uma possível via que poderia estar envolvida na resposta muscular é a via de mecanotransdução. Forças mecânicas geradas durante a contração muscular e lesão tendínea podem ativar cascatas de sinalização envolvidas na remodelamento e adaptação tecidual [168]. No entanto, levanta-se a hipótese de que durante a fase aguda da lesão do tendão, pode haver supressão da sinalização da integrina e da quinase de adesão focal (FAK) no músculo esquelético [169]. A lesão do tendão perturba as forças mecânicas normais transmitidas ao músculo, levando potencialmente a uma diminuição na ativação das vias de mecanotransdução mediadas por integrinas e FAK. Adicionalmente, vale considerar o envolvimento de outros processos celulares, como o estresse oxidativo, na resposta muscular à lesão tendínea [170]. Esses processos podem influenciar a remodelamento tecidual e a resposta geral à lesão. Na verdade, a falta de avaliação do estresse oxidativo e da mecanotransdução pode ser considerada uma limitação deste estudo.

Respostas musculares tardias à lesão parcial do tendão (D28 e D55):

Foi observado aumento no diâmetro da fibra e na AST entre 28 e 55 dias, mas não necessariamente acompanhado de redução da AST nos demais períodos. Estes resultados estão alinhados com os dados de expressão genética, sugerindo que durante as fases iniciais, ocorreram alterações na expressão genética sem quaisquer diferenças estruturais visíveis. Nas fases iniciais, parece haver uma possível estabilização tanto da AST quanto do diâmetro das fibras musculares,

mesmo na presença de vias de sinalização reduzidas para síntese proteica. Isto pode ser atribuído à potencial regulação positiva do *Timp-2*, com o objetivo de melhorar o dano à matriz muscular e preservar a integridade do músculo esquelético [171,172]. De particular importância é o aumento simultâneo no diâmetro da fibra muscular e na AST acompanhado pela regulação positiva dos genes-chave *Pax7*, *P70s6k* e *Myod1* aos 28 e 55 dias após a lesão parcial. Esses genes estão envolvidos em processos cruciais para o desenvolvimento das fibras musculares [173]. Por exemplo, *Pax7* é um marcador de células satélites, potencialmente capaz de recrutar e ativar essas células, influenciando diretamente no aumento do diâmetro e da CSA [174,175]. O gene *P70s6k* está envolvido na sinalização via *mTOR*, que desempenha um papel importante na regulação do crescimento e estrutura das fibras musculares, portanto, o aumento exponencial deste gene está diretamente associado à hipertrofia muscular [176,177]. *MyoD1* é um dos dois fatores de transcrição miogênicos, que desempenha um papel crucial na especificação e diferenciação de células precursoras musculares em células miogênicas, levando a um aumento não apenas no tamanho, mas também no número de fibras musculares [178]. Em conjunto, a interação dos genes *Pax7*, *P70s6k* e *Myod1* com a morfologia das fibras musculares demonstra a natureza multifacetada do desenvolvimento e hipertrofia muscular.

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória que não apenas promove a ativação de neutrófilos, mas tem um papel importante na regulação do tamanho das miofibras. No presente estudo, observamos uma regulação positiva de IL-8 no grupo 55D quando comparado ao grupo 28D, o que pode ter contribuído para o aumento da AST no mesmo momento. De acordo com Milewska et al. 2019, IL-8 impacta a hipertrofia do músculo esquelético de forma semelhante ao IGF-I devido ao seu papel na regulação negativa das vias de sinalização de atrofia (*Atrogin* e *MuRF1*)[179]. Além disso, os autores descobriram que a IL-8 presente no ambiente extracelular

dos mioblastos primários estimulou a expressão da miocilina, uma proteína envolvida no crescimento do músculo esquelético [179]. Estes resultados apoiam a hipótese de que níveis elevados de IL-8 e alterações morfológicas associadas fazem parte de uma resposta adaptativa que visa restaurar a homeostase do músculo esquelético após lesão do tendão.

CONCLUSÃO

Após a compreensão das análises dos perfis de expressão gênica, o presente estudo evidencia as principais dinâmicas de respostas moleculares no músculo esquelético após a lesão parcial de seu tendão subjacente, oferecendo informações valiosas sobre os intrincados processos de remodelamento tecidual. O rápido aumento da expressão de *Col3a1*, *Ctgf*, *Timp-2* e *Bgn* após um período de 3 dias sugere uma reação rápida e robusta à lesão, potencialmente associada ao aumento da atividade da MMP-2. Por outro lado, a diminuição precoce da expressão dos genes *Vegf*, *Mstn* e *Akt* revela interações intrincadas entre diversas vias de sinalização durante os estágios iniciais pós-lesão. Além disto, vale ressaltar que a resposta tardia de genes associados a processos de síntese, incluindo *Pax,7*, *p70s6k* e *MyoD-1*, implica na ativação de mecanismos de reparo celular que contribuem para a resolução da perturbação muscular. Morfologicamente, o grupo 55D manifestou um aumento da AST e do diâmetro das fibras musculares, mas não necessariamente acompanhado de uma redução nos demais períodos. Neste sentido, as respostas morfológicas são atribuídas, em parte, à regulação positiva dos níveis de IL-8, desencadeando potentes fatores anticatabólicos no músculo esquelético. Estes achados destacam as complexidades do processo de remodelamento do tecido muscular em resposta à lesão do tecido conjuntivo, contribuindo significativamente a compreensão da regeneração e adaptações musculares neste contexto.

Referências

1. Kwee, B.J.; Mooney, D.J. Biomaterials for Skeletal Muscle Tissue Engineering. *Curr Opin Biotechnol* **2017**, *47*, 16, doi: 10.1016/J.COPBIO.2017.05.003.
2. Ahmad, K.; Lee, E.J.; Moon, J.S.; Park, S.Y.; Choi, I. Multifaceted Interweaving Between Extracellular Matrix, Insulin Resistance, and Skeletal Muscle. *Cells* **2018**, *7*, doi:10.3390/CELLS7100148.
3. Tajbakhsh, S. Skeletal Muscle Stem Cells in Developmental versus Regenerative Myogenesis. *J Intern Med* **2009**, *266*, 372–389, doi:10.1111/J.1365-2796.2009.02158. X.
4. Parker, M.H.; Seale, P.; Rudnicki, M.A. Looking Back to the Embryo: Defining Transcriptional Networks in Adult Myogenesis. *Nat Rev Genet* **2003**, *4*, 497–507, doi:10.1038/NRG1109.
5. Sambasivan, R.; Tajbakhsh, S. Skeletal Muscle Stem Cell Birth and Properties. *Semin Cell Dev Biol* **2007**, *18*, 870–882, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2007.09.013.
6. Davis, T.A.; Fiorotto, M.L. Regulation of Muscle Growth in Neonates. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2009**, *12*, 78, doi: 10.1097/MCO.0B013E32831CEF9F.
7. Pellettieri, J.; Alvarado, A.Š. Cell Turnover and Adult Tissue Homeostasis: From Humans to Planarians. *Annu Rev Genet* **2007**, *41*, 83–105, doi: 10.1146/ANNUREV.GENET.41.110306.130244.
8. Asakura, A.; Komaki, M.; Rudnicki, M.A. Muscle Satellite Cells Are Multipotential Stem Cells That Exhibit Myogenic, Osteogenic, and Adipogenic Differentiation. *Differentiation* **2001**, *68*, 245–253, doi:10.1046/J.1432-0436.2001.680412. X.
9. Bentzinger, C.F.; Wang, Y.X.; Rudnicki, M.A. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4*, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A008342.
10. Nowicki, J.L.; Burke, A.C. Hox Genes and Morphological Identity: Axial versus Lateral Patterning in the Vertebrate Mesoderm. *Development* **2000**, *127*, 4265–4275, doi:10.1242/DEV.127.19.4265.
11. Asfour, H.A.; Allouh, M.Z.; Said, R.S. Myogenic Regulatory Factors: The Orchestrators of Myogenesis after 30 Years of Discovery. *Exp Biol Med* **2018**, *243*, 118, doi:10.1177/1535370217749494.
12. Musarò, A.; Carosio, S. Isolation and Culture of Satellite Cells from Mouse Skeletal Muscle. *Methods Mol Biol* **2017**, *1553*, 155–167, doi:10.1007/978-1-4939-6756-8_12.
13. Rudnicki, M.A.; le Grand, F.; McKinnell, I.; Kuang, S. The Molecular Regulation of Muscle Stem Cell Function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **2008**, *73*, 323–331, doi:10.1101/SQB.2008.73.064.
14. Chen, J.C.J.; Goldhamer, D.J. Skeletal Muscle Stem Cells. *Reprod Biol Endocrinol* **2003**, *1*, doi:10.1186/1477-7827-1-101.

15. Dewi, L.; Lin, Y.C.; Nicholls, A.; Condello, G.; Huang, C.Y.; Kuo, C.H. Pax7+ Satellite Cells in Human Skeletal Muscle After Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med* **2022**, doi:10.1007/S40279-022-01767-Z.
16. Hawke, T.J.; Garry, D.J. Myogenic Satellite Cells: Physiology to Molecular Biology. *J Appl Physiol (1985)* **2001**, *91*, 534–551, doi:10.1152/JAPPL.2001.91.2.534.
17. Ho, T.L.; Tang, C.H.; Chang, S.L.Y.; Tsai, C.H.; Chen, H. te; Su, C.M. HMGB1 Promotes In Vitro and In Vivo Skeletal Muscle Atrophy through an IL-18-Dependent Mechanism. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/CELLS11233936.
18. Relaix, F.; Zammit, P.S. Satellite Cells Are Essential for Skeletal Muscle Regeneration: The Cell on the Edge Returns Centre Stage. *Development* **2012**, *139*, 2845–2856, doi:10.1242/DEV.069088.
19. Yin, H.; Price, F.; Rudnicki, M.A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev* **2013**, *93*, 23, doi:10.1152/PHYSREV.00043.2011.
20. Kuang, S.; Kuroda, K.; le Grand, F.; Rudnicki, M.A. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* **2007**, *129*, 999, doi: 10.1016/J.CELL.2007.03.044.
21. Buckingham, M.; Relaix, F. PAX3 and PAX7 as Upstream Regulators of Myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **2015**, *44*, 115–125, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2015.09.017.
22. Dumont, N.A.; Wang, Y.X.; Rudnicki, M.A. Intrinsic and Extrinsic Mechanisms Regulating Satellite Cell Function. *Development* **2015**, *142*, 1572–1581, doi:10.1242/DEV.114223.
23. Koishi, K.; Zhang, M.; McLennan, I.S.; Harris, A.J. MyoD Protein Accumulates in Satellite Cells and Is Neurally Regulated in Regenerating Myotubes and Skeletal Muscle Fibers. *Dev Dyn* **1995**, *202*, 244–254, doi:10.1002/AJA.1002020304.
24. Velloso, C.P. Regulation of Muscle Mass by Growth Hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol* **2008**, *154*, 557–568, doi:10.1038/BJP.2008.153.
25. Enwere, E.K.; LaCasse, E.C.; Adam, N.J.; Korneluk, R.G. Role of the TWEAK-Fn14-CIAP1-NF-KB Signaling Axis in the Regulation of Myogenesis and Muscle Homeostasis. *Front Immunol* **2014**, *5*, doi:10.3389/FIMMU.2014.00034.
26. Grassot, V.; da Silva, A.; Saliba, J.; Maftah, A.; Dupuy, F.; Petit, J.M. Highlights of Glycosylation and Adhesion Related Genes Involved in Myogenesis. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 621, doi:10.1186/1471-2164-15-621.
27. Chargé, S.B.P.; Rudnicki, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* **2004**, *84*, 209–238, doi:10.1152/physrev.00019.2003.
28. Otto, A.; Patel, K. Signalling and the Control of Skeletal Muscle Size. *Exp Cell Res* **2010**, *316*, 3059–3066, doi: 10.1016/J.YEXCR.2010.04.009.
29. Schiaffino, S.; Dyar, K.A.; Ciciliot, S.; Blaauw, B.; Sandri, M. Mechanisms Regulating Skeletal Muscle Growth and Atrophy. *FEBS J* **2013**, *280*, 4294–4314, doi:10.1111/FEBS.12253.

30. Rommel, C.; Bodine, S.C.; Clarke, B.A.; Rossman, R.; Nunez, L.; Stitt, T.N.; Yancopoulos, G.D.; Glass, D.J. Mediation of IGF-1-Induced Skeletal Myotube Hypertrophy by PI (3)K/Akt/MTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 Pathways. *Nat Cell Biol* **2001**, *3*, 1009–1013, doi:10.1038/NCB1101-1009.
31. Clemmons, D.R. Role of IGF-I in Skeletal Muscle Mass Maintenance. *Trends Endocrinol Metab* **2009**, *20*, 349–356, doi: 10.1016/J.TEM.2009.04.002.
32. Schiaffino, S.; Mammucari, C. Regulation of Skeletal Muscle Growth by the IGF1-Akt/PKB Pathway: Insights from Genetic Models. *Skelet Muscle* **2011**, *1*, 1–14, doi:10.1186/2044-5040-1-4/FIGURES/4.
33. Olguín, H.C. The Gentle Side of the UPS: Ubiquitin-Proteasome System and the Regulation of the Myogenic Program. *Front Cell Dev Biol* **2022**, *9*, doi:10.3389/FCELL.2021.821839.
34. Tintignac, L.A.; Lagirand, J.; Batonnet, S.; Sirri, V.; Leibovitch, M.P.; Leibovitch, S.A. Degradation of MyoD Mediated by the SCF (MAFbx) Ubiquitin Ligase. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 2847–2856, doi:10.1074/JBC.M411346200.
35. Bodine, S.C.; Baehr, L.M. Skeletal Muscle Atrophy and the E3 Ubiquitin Ligases MuRF1 and MAFbx/Atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2014**, *307*, E469–E484, doi:10.1152/AJPENDO.00204.2014.
36. Shimamoto, S.; Nakashima, K.; Nishikoba, N.; Kohrogi, R.; Ohtsuka, A.; Fujimura, S.; Ijiri, D. Suppression of FoxO1 mRNA by B2 -Adrenoceptor-CAMP Signaling through MiR-374b-5p and MiR-7a-1-3p in C2C12 Myotubes. *FEBS Open Bio* **2022**, *12*, 627–637, doi:10.1002/2211-5463.13368.
37. Lu, A.; Proto, J.D.; Guo, L.; Tang, Y.; Lavasani, M.; Tilstra, J.S.; Niedernhofer, L.J.; Wang, B.; Guttridge, D.C.; Robbins, P.D.; et al. NF-KB Negatively Impacts the Myogenic Potential of Muscle-Derived Stem Cells. *Mol Ther* **2012**, *20*, 661–668, doi:10.1038/MT.2011.261.
38. Li, H.; Malhotra, S.; Kumar, A. Nuclear Factor-Kappa B Signaling in Skeletal Muscle Atrophy. *J Mol Med (Berl)* **2008**, *86*, 1113–1126, doi:10.1007/S00109-008-0373-8.
39. Dargelos, E.; Poussard, S.; Brulé, C.; Daury, L.; Cottin, P. Calcium-Dependent Proteolytic System and Muscle Dysfunctions: A Possible Role of Calpains in Sarcopenia. *Biochimie* **2008**, *90*, 359–368, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2007.07.018.
40. Hyatt, H.W.; Powers, S.K. The Role of Calpains in Skeletal Muscle Remodeling with Exercise and Inactivity-Induced Atrophy. *Int J Sports Med* **2020**, *41*, 994–1008, doi:10.1055/A-1199-7662.
41. Schroder, E.A.; Wang, L.; Wen, Y.; Callahan, L.A.P.; Supinski, G.S. Skeletal Muscle-Specific Calpastatin Overexpression Mitigates Muscle Weakness in Aging and Extends Life Span. *J Appl Physiol (1985)* **2021**, *131*, 630–642, doi:10.1152/JAPPLPHYSIOL.00883.2020.
42. Agbons, E.; Egbaidomeh, O. A Review of Maximizing Muscle Building Capabilities with Anabolic Enzymes. *Movement, Health & Exercise* **2017**, *6*, doi:10.15282/MOHE.V6I2.147.

43. Girardi, F.; Taleb, A.; Ebrahimi, M.; Datye, A.; Gamage, D.G.; Peccate, C.; Giordani, L.; Millay, D.P.; Gilbert, P.M.; Cadot, B.; et al. TGF β Signaling Curbs Cell Fusion and Muscle Regeneration. *Nat Commun* **2021**, *12*, doi:10.1038/S41467-020-20289-8.
44. Massagué, J. TGF-Beta Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* **1998**, *67*, 753–791, doi: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.67.1.753.
45. Derynck, R.; Budi, E.H. Specificity, Versatility, and Control of TGF- β Family Signaling. *Sci Signal* **2019**, *12*, doi:10.1126/SCISIGNAL.AAV5183.
46. Grafe, I.; Alexander, S.; Peterson, J.R.; Snider, T.N.; Levi, B.; Lee, B.; Mishina, Y. TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2018**, *10*, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A022202.
47. Ohsawa, Y.; Takayama, K.; Nishimatsu, S.I.; Okada, T.; Fujino, M.; Fukai, Y.; Murakami, T.; Hagiwara, H.; Itoh, F.; Tsuchida, K.; et al. The Inhibitory Core of the Myostatin Prodomain: Its Interaction with Both Type I and II Membrane Receptors, and Potential to Treat Muscle Atrophy. *PLoS One* **2015**, *10*, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0133713.
48. Clop, A.; Marcq, F.; Takeda, H.; Pirottin, D.; Tordoir, X.; Bibé, B.; Bouix, J.; Caiment, F.; Elsen, J.M.; Eychenne, F.; et al. A Mutation Creating a Potential Illegitimate MicroRNA Target Site in the Myostatin Gene Affects Muscularity in Sheep. *Nat Genet* **2006**, *38*, 813–818, doi:10.1038/NG1810.
49. Zumbaugh, M.D.; Johnson, S.E.; Shi, T.H.; Gerrard, D.E. Molecular and Biochemical Regulation of Skeletal Muscle Metabolism. *J Anim Sci* **2022**, *100*, doi:10.1093/JAS/SKAC035.
50. McFarlane, C.; Plummer, E.; Thomas, M.; Hennebry, A.; Ashby, M.; Ling, N.; Smith, H.; Sharma, M.; Kambadur, R. Myostatin Induces Cachexia by Activating the Ubiquitin Proteolytic System through an NF-KappaB-Independent, FoxO1-Dependent Mechanism. *J Cell Physiol* **2006**, *209*, 501–514, doi:10.1002/JCP.20757.
51. Trendelenburg, A.U.; Meyer, A.; Rohner, D.; Boyle, J.; Hatakeyama, S.; Glass, D.J. Myostatin Reduces Akt/TORC1/P70S6K Signaling, Inhibiting Myoblast Differentiation and Myotube Size. *Am J Physiol Cell Physiol* **2009**, *296*, doi:10.1152/AJPCELL.00105.2009.
52. Lokireddy, S.; McFarlane, C.; Ge, X.; Zhang, H.; Sze, S.K.; Sharma, M.; Kambadur, R. Myostatin Induces Degradation of Sarcomeric Proteins through a Smad3 Signaling Mechanism during Skeletal Muscle Wasting. *Mol Endocrinol* **2011**, *25*, 1936–1949, doi:10.1210/ME.2011-1124.
53. Tando, T.; Hirayama, A.; Furukawa, M.; Sato, Y.; Kobayashi, T.; Funayama, A.; Kanaji, A.; Hao, W.; Watanabe, R.; Morita, M.; et al. Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *J Biol Chem* **2016**, *291*, 12184, doi:10.1074/JBC.M115.680579.
54. Liu, D.; Kang, J.S.; Derynck, R. TGF-Beta-Activated Smad3 Represses MEF2-Dependent Transcription in Myogenic Differentiation. *EMBO J* **2004**, *23*, 1557–1566, doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600179.
55. Potthoff, M.J.; Arnold, M.A.; McAnally, J.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. Regulation of Skeletal Muscle Sarcomere Integrity and Postnatal Muscle Function by Mef2c. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 8143–8151, doi:10.1128/MCB.01187-07.

56. Meyer, G.A.; Lieber, R.L. Elucidation of Extracellular Matrix Mechanics from Muscle Fibers and Fiber Bundles. *J Biomech* **2011**, *44*, 771, doi: 10.1016/J.JBIOMECH.2010.10.044.
57. M, C.; M, M.; M, K.; M, T.; R, C.-E. Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by Mechanical Stress. *Biochem Cell Biol* **1996**, *74*, 737–744, doi:10.1139/O96-080.
58. Shi, X.; Garry, D.J. Muscle Stem Cells in Development, Regeneration, and Disease. *Genes Dev* **2006**, *20*, 1692–1708, doi:10.1101/GAD.1419406.
59. Sleboda, D.A.; Stover, K.K.; Roberts, T.J. Diversity of Extracellular Matrix Morphology in Vertebrate Skeletal Muscle. *J Morphol* **2020**, *281*, 160, doi:10.1002/JMOR.21088.
60. Kannus, P.; Jozsa, L.; Järvinen, T.A.H.; Järvinen, T.L.N.; Kvist, M.; Natri, A.; Järvinen, M. Location and Distribution of Non-Collagenous Matrix Proteins in Musculoskeletal Tissues of Rat. *Histochem J* **1998**, *30*, 799–810, doi:10.1023/A:1003448106673.
61. Hantaï, D.; Labat-Robert, J.; Grimaud, J.A.; Fardeau, M. Fibronectin, Laminin, Type I, III and IV Collagens in Duchenne’s Muscular Dystrophy, Congenital Muscular Dystrophies and Congenital Myopathies: An Immunocytochemical Study. *Connect Tissue Res* **1985**, *13*, 273–281, doi:10.3109/03008208509152408.
62. Godfrey, E.W.; Gradall, K.S. Basal Lamina Molecules Are Concentrated in Myogenic Regions of the Mouse Limb Bud. *Anat Embryol (Berl)* **1998**, *198*, 481–486, doi:10.1007/S004290050198.
63. Zhang, W.; Liu, Y.; Zhang, H. Extracellular Matrix: An Important Regulator of Cell Functions and Skeletal Muscle Development. *Cell Biosci* **2021**, *11*, doi:10.1186/S13578-021-00579-4.
64. MacDonald, E.M.; Cohn, R.D. TGF β Signaling: Its Role in Fibrosis Formation and Myopathies. *Curr Opin Rheumatol* **2012**, *24*, 628–634, doi:10.1097/BOR.0B013E328358DF34.
65. Morales, M.G.; Cabello-Verrugio, C.; Santander, C.; Cabrera, D.; Goldschmeding, R.; Brandan, E. CTGF/CCN-2 over-Expression Can Directly Induce Features of Skeletal Muscle Dystrophy. *J Pathol* **2011**, *225*, 490–501, doi:10.1002/PATH.2952.
66. Alexakis, C.; Partridge, T.; Bou-Gharios, G. Implication of the Satellite Cell in Dystrophic Muscle Fibrosis: A Self-Perpetuating Mechanism of Collagen Overproduction. *Am J Physiol Cell Physiol* **2007**, *293*, doi:10.1152/AJPCELL.00061.2007.
67. Vial, C.; Zúñiga, L.M.; Cabello-Verrugio, C.; Cañón, P.; Fadic, R.; Brandan, E. Skeletal Muscle Cells Express the Profibrotic Cytokine Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2), Which Induces Their Dedifferentiation. *J Cell Physiol* **2008**, *215*, 410–421, doi:10.1002/JCP.21324.
68. Brandan, E.; Gutierrez, J. Role of Proteoglycans in the Regulation of the Skeletal Muscle Fibrotic Response. *FEBS J* **2013**, *280*, 4109–4117, doi:10.1111/FEBS.12278.
69. Zhu, J.; Li, Y.; Shen, W.; Qiao, C.; Ambrosio, F.; Lavasani, M.; Nozaki, M.; Branca, M.F.; Huard, J. Relationships between Transforming Growth Factor-Beta1, Myostatin, and Decorin: Implications for Skeletal Muscle Fibrosis. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 25852–25863, doi:10.1074/JBC.M704146200.

70. Brandan, E.; Cabello-Verrugio, C.; Vial, C. Novel Regulatory Mechanisms for the Proteoglycans Decorin and Biglycan during Muscle Formation and Muscular Dystrophy. *Matrix Biol* **2008**, *27*, 700–708, doi: 10.1016/J.MATBIO.2008.07.004.
71. Pasternak, B.; Aspenberg, P. Metalloproteinases and Their Inhibitors-Diagnostic and Therapeutic Opportunities in Orthopedics. *Acta Orthop* **2009**, *80*, 693–703, doi:10.3109/17453670903448257.
72. Ohtake, Y.; Tojo, H.; Seiki, M. Multifunctional Roles of MT1-MMP in Myofiber Formation and Morphostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *J Cell Sci* **2006**, *119*, 3822–3832, doi:10.1242/JCS.03158.
73. Carmeli, E.; Haimovitch, T.G. The Expression of MMP-2 Following Immobilization and High-Intensity Running in Plantaris Muscle Fiber in Rats. *ScientificWorldJournal* **2006**, *6*, 542–550, doi:10.1100/TSW.2006.107.
74. Zimowska, M.; Brzoska, E.; Swierczynska, M.; Streminska, W.; Moraczewski, J. Distinct Patterns of MMP-9 and MMP-2 Activity in Slow and Fast Twitch Skeletal Muscle Regeneration in Vivo. *International Journal of Developmental Biology* **2008**, *52*, 307–314, doi:10.1387/ijdb.072331mz.
75. Christensen, S.; Purslow, P.P. The Role of Matrix Metalloproteinases in Muscle and Adipose Tissue Development and Meat Quality: A Review. *Meat Sci* **2016**, *119*, 138–146, doi: 10.1016/J.MEATSCI.2016.04.025.
76. Baum, O.; Ganster, M.; Baumgartner, I.; Nieselt, K.; Djonov, V. Basement Membrane Remodeling in Skeletal Muscles of Patients with Limb Ischemia Involves Regulation of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases. *J Vasc Res* **2007**, *44*, 202–213, doi:10.1159/000100376.
77. Lacraz, G.; Rouleau, A.J.; Couture, V.; Söller, T.; Drouin, G.; Veillette, N.; Grandbois, M.; Grenier, G. Increased Stiffness in Aged Skeletal Muscle Impairs Muscle Progenitor Cell Proliferative Activity. *PLoS One* **2015**, *10*, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0136217.
78. Mackey, A.L.; Brandstetter, S.; Schjerling, P.; Bojsen-Moller, J.; Qvortrup, K.; Pedersen, M.M.; Doessing, S.; Kjaer, M.; Magnusson, S.P.; Langberg, H. Sequenced Response of Extracellular Matrix Adhesion and Fibrotic Regulators after Muscle Damage Is Involved in Protection against Future Injury in Human Skeletal Muscle. *The FASEB Journal* **2011**, *25*, 1943, doi:10.1096/FJ.10-176487.
79. Osses, N.; Brandan, E. ECM Is Required for Skeletal Muscle Differentiation Independently of Muscle Regulatory Factor Expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **2002**, *282*, doi:10.1152/AJPCELL.00322.2001.
80. Kim, H.; Kim, M.C.; Asada, H.H. Extracellular Matrix Remodelling Induced by Alternating Electrical and Mechanical Stimulations Increases the Contraction of Engineered Skeletal Muscle Tissues. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/S41598-019-39522-6.
81. Chen, X.K.; Walters, T.J. Muscle-Derived Decellularised Extracellular Matrix Improves Functional Recovery in a Rat Latissimus Dorsi Muscle Defect Model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **2013**, *66*, 1750–1758, doi: 10.1016/J.BJPS.2013.07.037.

82. Hirunsai, M.; Srikuea, R.; Yimlamai, T. Heat Stress Promotes Extracellular Matrix Remodelling via TGF-B1 and MMP-2/TIMP-2 Modulation in Tenotomised Soleus and Plantaris Muscles. *Int J Hyperthermia* **2015**, *31*, 336–348, doi:10.3109/02656736.2014.1002019.
83. Salimena, M.C.; Lagrota-Candido, J.; Quírico-Santos, T. Gender Dimorphism Influences Extracellular Matrix Expression and Regeneration of Muscular Tissue in Mdx Dystrophic Mice. *Histochem Cell Biol* **2004**, *122*, 435–444, doi:10.1007/S00418-004-0707-8.
84. Carberry, S.; Zweyer, M.; Swandulla, D.; Ohlendieck, K. Proteomics Reveals Drastic Increase of Extracellular Matrix Proteins Collagen and Dermatotopontin in the Aged Mdx Diaphragm Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Med* **2012**, *30*, 229, doi:10.3892/IJMM.2012.1006.
85. Stearns-Reider, K.M.; D’Amore, A.; Beezhold, K.; Rothrauff, B.; Cavalli, L.; Wagner, W.R.; Vorp, D.A.; Tsamis, A.; Shinde, S.; Zhang, C.; et al. Aging of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix Drives a Stem Cell Fibrogenic Conversion. *Aging Cell* **2017**, *16*, 518, doi:10.1111/ACEL.12578.
86. Enwemeka, C.S. Inflammation, Cellularity, and Fibrillogenesis in Regenerating Tendon: Implications for Tendon Rehabilitation. *Phys Ther* **1989**, *69*, 816–825, doi:10.1093/PTJ/69.10.816.
87. Wall, M.E.; Otey, C.; Qi, J.; Banes, A.J. Connexin 43 Is Localized with Actin in Tenocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* **2007**, *64*, 121–130, doi:10.1002/CM.20170.
88. Franchi, M.; Trirè, A.; Quaranta, M.; Orsini, E.; Ottani, V. Collagen Structure of Tendon Relates to Function. *ScientificWorldJournal* **2007**, *7*, 404–420, doi:10.1100/TSW.2007.92.
89. Mead, M.P.; Gumucio, J.P.; Awan, T.M.; Mendias, C.L.; Sugg, K.B. Pathogenesis and Management of Tendinopathies in Sports Medicine. *Transl Sports Med* **2018**, *1*, 5–13, doi:10.1002/TSM2.6.
90. Kim, W.; Gwon, Y.; Kim, Y.K.; Park, S.; Kang, S.J.; Park, H.K.; Kim, M.S.; Kim, J. Plasma-Assisted Multiscale Topographic Scaffolds for Soft and Hard Tissue Regeneration. *NPJ Regen Med* **2021**, *6*, doi:10.1038/S41536-021-00162-Y.
91. Komi, P. v. Relevance of in Vivo Force Measurements to Human Biomechanics. *J Biomech* **1990**, *23 Suppl 1*, doi:10.1016/0021-9290(90)90038-5.
92. Escriche-Escuder, A.; Cuesta-Vargas, A.I.; Casaña, J. Modelling and in Vivo Evaluation of Tendon Forces and Strain in Dynamic Rehabilitation Exercises: A Scoping Review. *BMJ Open* **2022**, *12*, doi:10.1136/BMJOPEN-2021-057605.
93. Kannus, P. Structure of the Tendon Connective Tissue. *Scand J Med Sci Sports* **2000**, *10*, 312–320, doi:10.1034/J.1600-0838.2000.010006312. X.
94. Franchi, M.; Fini, M.; Quaranta, M.; de Pasquale, V.; Raspanti, M.; Giavaresi, G.; Ottani, V.; Ruggeri, A. Crimp Morphology in Relaxed and Stretched Rat Achilles Tendon. *J Anat* **2007**, *210*, 1–7, doi:10.1111/j.1469-7580.2006.00666. x.
95. Andarawis-Puri, N.; Flatow, E.L.; Soslowsky, L.J. Tendon Basic Science: Development, Repair, Regeneration, and Healing. *J Orthop Res* **2015**, *33*, 780–784, doi:10.1002/JOR.22869.

96. Sasaki, N.; Odajima, S. Elongation Mechanism of Collagen Fibrils and Force-Strain Relations of Tendon at Each Level of Structural Hierarchy. *J Biomech* **1996**, *29*, 1131–1136, doi:10.1016/0021-9290(96)00024-3.
97. Ji, X.L.; Zhang, H.H.; Han, S.Y. A Piecewise Constitutive Model for Collagen Fiber Tissues. *J Mater Sci Mater Med* **2022**, *33*, doi:10.1007/S10856-022-06660-9.
98. Charles, J.; Kissane, R.; Hoehfurner, T.; Bates, K.T. From Fibre to Function: Are We Accurately Representing Muscle Architecture and Performance? *Biol Rev Camb Philos Soc* **2022**, *97*, 1640–1676, doi:10.1111/BRV.12856.
99. Knudsen, A.B.; Larsen, M.; Mackey, A.L.; Hjort, M.; Hansen, K.K.; Qvortrup, K.; Kjær, M.; Krosgaard, M.R. The Human Myotendinous Junction: An Ultrastructural and 3D Analysis Study. *Scand J Med Sci Sports* **2015**, *25*, e116–e123, doi:10.1111/SMS.12221.
100. Huijing, P.A. Muscle as a Collagen Fiber Reinforced Composite: A Review of Force Transmission in Muscle and Whole Limb. *J Biomech* **1999**, *32*, 329–345, doi:10.1016/S0021-9290(98)00186-9.
101. Hijikata, T.; Wakisaka, H.; Niida, S. Functional Combination of Tapering Profiles and Overlapping Arrangements in Nonspanning Skeletal Muscle Fibers Terminating Intrafascicularly. *Anat Rec* **1993**, *236*, 602–610, doi:10.1002/AR.1092360403.
102. Jorgenson, K.W.; Phillips, S.M.; Hornberger, T.A. Identifying the Structural Adaptations That Drive the Mechanical Load-Induced Growth of Skeletal Muscle: A Scoping Review. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/CELLS9071658.
103. Ameye, L.; Aria, D.; Jepsen, K.; Oldberg, A.; Xu, T.; Young, M.F. Abnormal Collagen Fibrils in Tendons of Biglycan/Fibromodulin-Deficient Mice Lead to Gait Impairment, Ectopic Ossification, and Osteoarthritis. *FASEB J* **2002**, *16*, 673–680, doi: 10.1096/FJ.01-0848COM.
104. Street, S.F. Lateral Transmission of Tension in Frog Myofibers: A Myofibrillar Network and Transverse Cytoskeletal Connections Are Possible Transmitters. *J Cell Physiol* **1983**, *114*, 346–364, doi:10.1002/JCP.1041140314.
105. Zhang, C.; Gao, Y. Effects of Aging on the Lateral Transmission of Force in Rat Skeletal Muscle. *J Biomech* **2014**, *47*, 944, doi: 10.1016/J.JBIOMECH.2014.01.026.
106. Monti, R.J.; Roy, R.R.; Hodgson, J.A.; Reggie Edgerton, V. Transmission of Forces within Mammalian Skeletal Muscles. *J Biomech* **1999**, *32*, 371–380, doi:10.1016/S0021-9290(98)00189-4.
107. Sleboda, D.A.; Wold, E.S.; Roberts, T.J. Passive Muscle Tension Increases in Proportion to Intramuscular Fluid Volume. *J Exp Biol* **2019**, *222*, doi:10.1242/JEB.209668.
108. Azizi, E.; Deslauriers, A.R.; Holt, N.C.; Eaton, C.E. Resistance to Radial Expansion Limits Muscle Strain and Work. *Biomech Model Mechanobiol* **2017**, *16*, 1633, doi:10.1007/S10237-017-0909-3.
109. Mienaltowski, M.J.; Gonzales, N.L.; Beall, J.M.; Pechanec, M.Y. Basic Structure, Physiology, and Biochemistry of Connective Tissues and Extracellular Matrix Collagens. *Adv Exp Med Biol* **2021**, *1348*, 5–43, doi:10.1007/978-3-030-80614-9_2.

110. Scott, J.E. Elasticity in Extracellular Matrix “shape Modules” of Tendon, Cartilage, Etc. A Sliding Proteoglycan-Filament Model. *J Physiol* **2003**, *553*, 335–343, doi:10.1113/JPHYSIOL.2003.050179.
111. Dunkman, A.A.; Buckley, M.R.; Mienaltowski, M.J.; Adams, S.M.; Thomas, S.J.; Satchell, L.; Kumar, A.; Pathmanathan, L.; Beason, D.P.; Iozzo, R. v.; et al. The Tendon Injury Response Is Influenced by Decorin and Biglycan. *Ann Biomed Eng* **2014**, *42*, 619–630, doi:10.1007/S10439-013-0915-2.
112. Silver, F.H.; Kelkar, N.; Deshmukh, T. Molecular Basis for Mechanical Properties of ECMs: Proposed Role of Fibrillar Collagen and Proteoglycans in Tissue Biomechanics. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/BIOM11071018.
113. Tonniges, J.R.; Clark, D.L.; Velleman, S.G. The Effect of the Wooden Breast Fibrotic Myopathy in Broilers on Fibrillar Collagen Organization and Decorin-Collagen Binding. *Avian Dis* **2019**, *63*, 48, doi:10.1637/11985-102218-REG.1.
114. Nakamura, N.; Hart, D.A.; Boorman, R.S.; Kaneda, Y.; Shrive, N.G.; Marchuk, L.L.; Shino, K.; Ochi, T.; Frank, C.B. Decorin Antisense Gene Therapy Improves Functional Healing of Early Rabbit Ligament Scar with Enhanced Collagen Fibrillogenesis in Vivo. *J Orthop Res* **2000**, *18*, 517–523, doi:10.1002/JOR.1100180402.
115. Svensson, L.; Aszódi, A.; Reinholt, F.P.; Fässler, R.; Heinegård, D.; Oldberg, Å. Fibromodulin-Null Mice Have Abnormal Collagen Fibrils, Tissue Organization, and Altered Lumican Deposition in Tendon. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 9636–9647, doi:10.1074/JBC.274.14.9636.
116. Fässler, R.; Schnegelsberg, P.N.J.; Dausman, J.; Shinya, T.; Muragaki, Y.; Mccarthy, M.T.; Olsen, B.R.; Jaenisch, R. Mice Lacking Alpha 1 (IX) Collagen Develop Noninflammatory Degenerative Joint Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 5070–5074, doi:10.1073/PNAS.91.11.5070.
117. Li, S.W.; Prockop, D.J.; Helminen, H.; Fässler, R.; Lapveteläinen, T.; Kiraly, K.; Peltarri, A.; Arokoski, J.; Lui, H.; Arita, M.; et al. Transgenic Mice with Targeted Inactivation of the Col2 Alpha 1 Gene for Collagen II Develop a Skeleton with Membranous and Periosteal Bone but No Endochondral Bone. *Genes Dev* **1995**, *9*, 2821–2830, doi:10.1101/GAD.9.22.2821.
118. Barin, F.R.; de Sousa Neto, I.V.; Vieira Ramos, G.; Szojka, A.; Ruivo, A.L.; Anflor, C.T.M.; Agualimpia, J.D.H.; Domingues, A.C.; Franco, O.L.; Adesida, A.B.; et al. Calcaneal Tendon Plasticity Following Gastrocnemius Muscle Injury in Rat. *Front Physiol* **2019**, *10*, 1098, doi:10.3389/FPHYS.2019.01098.
119. Maffulli, N.; Longo, U.G.; Franceschi, F.; Rabitti, C.; Denaro, V. Movin and Bonar Scores Assess the Same Characteristics of Tendon Histology. *Clin Orthop Relat Res* **2008**, *466*, 1605–1611, doi:10.1007/S11999-008-0261-0.
120. O’Brien, M. Structure and Metabolism of Tendons. *Scand J Med Sci Sports* **1997**, *7*, 55–61, doi:10.1111/J.1600-0838.1997.TB00119.X.
121. Canty, E.G.; Kadler, K.E. Procollagen Trafficking, Processing and Fibrillogenesis. *J Cell Sci* **2005**, *118*, 1341–1353, doi:10.1242/JCS.01731.

122. Abate, M.; Gravare Silbernagel, K.; Siljeholm, C.; di Iorio, A.; de Amicis, D.; Salini, V.; Werner, S.; Paganelli, R. Pathogenesis of Tendinopathies: Inflammation or Degeneration? *Arthritis Res Ther* **2009**, *11*, 235, doi:10.1186/AR2723.
123. Backman, L.J.; Fong, G.; Andersson, G.; Scott, A.; Danielson, P. Substance P Is a Mechanoresponsive, Autocrine Regulator of Human Tenocyte Proliferation. *PLoS One* **2011**, *6*, e27209, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0027209.
124. Russo, V.; el Khatib, M.; Prencipe, G.; Citeroni, M.R.; Faydaver, M.; Mauro, A.; Berardinelli, P.; Cerveró-Varona, A.; Haidar-Montes, A.A.; Turriani, M.; et al. Tendon Immune Regeneration: Insights on the Synergetic Role of Stem and Immune Cells during Tendon Regeneration. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/CELLS11030434.
125. Murphy, P.G.; Loitz, B.J.; Frank, C.B.; Hart, D.A. Influence of Exogenous Growth Factors on the Synthesis and Secretion of Collagen Types I and III by Explants of Normal and Healing Rabbit Ligaments. *Biochem Cell Biol* **1994**, *72*, 403–409, doi:10.1139/O94-054.
126. Molloy, T.; Wang, Y.; Murrell, G.A.C. The Roles of Growth Factors in Tendon and Ligament Healing. *Sports Med* **2003**, *33*, 381–394, doi:10.2165/00007256-200333050-00004.
127. Korcari, A.; Muscat, S.; McGinn, E.; Buckley, M.R.; Loissele, A.E. Depletion of Scleraxis-Lineage Cells during Tendon Healing Transiently Impairs Multi-Scale Restoration of Tendon Structure during Early Healing. *PLoS One* **2022**, *17*, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0274227.
128. Gulotta, L. v.; Rodeo, S.A. Growth Factors for Rotator Cuff Repair. *Clin Sports Med* **2009**, *28*, 13–23, doi: 10.1016/J.CSM.2008.09.002.
129. Cool, S.M.; Snyman, C.P.; Nurcombe, V.; Forwood, M. Temporal Expression of Fibroblast Growth Factor Receptors during Primary Ligament Repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **2004**, *12*, 490–496, doi:10.1007/S00167-003-0444-X.
130. Sharma, P.; Maffulli, N. Tendon Injury and Tendinopathy: Healing and Repair. *J Bone Joint Surg Am* **2005**, *87*, 187–202, doi:10.2106/JBJS.D.01850.
131. Docheva, D.; Müller, S.A.; Majewski, M.; Evans, C.H. Biologics for Tendon Repair. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *84*, 222–239, doi: 10.1016/J.ADDR.2014.11.015.
132. Yang, G.; Rothrauff, B.B.; Tuan, R.S. Tendon and Ligament Regeneration and Repair: Clinical Relevance and Developmental Paradigm. *Birth Defects Res C Embryo Today* **2013**, *99*, 203–222, doi:10.1002/BDRC.21041.
133. James, R.; Kesturu, G.; Balian, G.; Chhabra, A.B. Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. *J Hand Surg Am* **2008**, *33*, 102–112, doi: 10.1016/J.JHSA.2007.09.007.
134. Xu, K.; Kuntz, L.A.; Foehr, P.; Kuempel, K.; Wagner, A.; Tuebel, J.; Deimling, C. v.; Burgkart, R.H. Efficient Decellularization for Tissue Engineering of the Tendon-Bone Interface with Preservation of Biomechanics. *PLoS One* **2017**, *12*, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0171577.

135. Maffulli, N.; Longo, U.G.; Franceschi, F.; Rabitti, C.; Denaro, V. Movin and Bonar Scores Assess the Same Characteristics of Tendon Histology. *Clin Orthop Relat Res* **2008**, *466*, 1605–1611, doi:10.1007/S11999-008-0261-0.
136. Yee Lui, P.P. Stem Cell Technology for Tendon Regeneration: Current Status, Challenges, and Future Research Directions. *Stem Cells Cloning* **2015**, *8*, 163–174, doi:10.2147/SCCAA.S60832.
137. Gerber, C.; Schneeberger, A.G.; Hoppeler, H.; Meyer, D.C. Correlation of Atrophy and Fatty Infiltration on Strength and Integrity of Rotator Cuff Repairs: A Study in Thirteen Patients. *J Shoulder Elbow Surg* **2007**, *16*, 691–696, doi: 10.1016/j.jse.2007.02.122.
138. Jozsa, L.; Kannus, P.; Thoring, J.; Reffy, A.; Jarvinen, M.; Kvist, M. The Effect of Tenotomy and Immobilisation on Intramuscular Connective Tissue. A Morphometric and Microscopic Study in Rat Calf Muscles. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* **1990**, *72*, 293–297, doi:10.1302/0301-620X.72B2.2312572.
139. Yuri, T.; Mura, N.; Hoshikawa, K.; Giambini, H.; Fujii, H.; Kiyoshige, Y. Influence of Fat Infiltration, Tear Size, and Post-Operative Tendon Integrity on Muscle Contractility of Repaired Supraspinatus Muscle. *Eur J Orthop Surg Traumatol* **2022**, *32*, 837–843, doi:10.1007/S00590-021-03020-1.
140. Kubo, K.; Akima, H.; Ushiyama, J.; Tabata, I.; Fukuoka, H.; Kanehisa, H. Effects of 20 Days of Bed Rest on the Viscoelastic Properties of Tendon Structures in Lower Limb Muscles. *Br J Sports Med* **2004**, *38*, 324–330, doi:10.1136/bjism.2003.005595.
141. Yamamoto, M.; Sakiyama, K.; Kitamura, K.; Yamamoto, Y.; Takagi, T.; Sekiya, S.; Watanabe, G.; Taniguchi, S.; Ogawa, Y.; Ishizuka, S.; et al. Development and Regeneration of Muscle, Tendon, and Myotendinous Junctions in Striated Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/IJMS23063006.
142. Galloway, M.T.; Lalley, A.L.; Shearn, J.T. The Role of Mechanical Loading in Tendon Development, Maintenance, Injury, and Repair. *J Bone Joint Surg Am* **2013**, *95*, 1620, doi:10.2106/JBJS.L.01004.
143. Kjær, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev* **2004**, *84*, 649–698, doi:10.1152/PHYSREV.00031.2003.
144. Lucke, L.D.; Bortolazzo, F.O.; Theodoro, V.; Fujii, L.; Bombeiro, A.L.; Felonato, M.; Dalia, R.A.; Carneiro, G.D.; Cartarozzi, L.P.; Vicente, C.P.; et al. Low-Level Laser and Adipose-Derived Stem Cells Altered Remodelling Genes Expression and Improved Collagen Reorganization during Tendon Repair. *Cell Prolif* **2019**, *52*, doi:10.1111/cpr.12580.
145. Cleutjens, J.P.M.; Kandala, J.C.; Guarda, E.; Guntaka, R. V.; Weber, K.T. Regulation of Collagen Degradation in the Rat Myocardium after Infarction. *J Mol Cell Cardiol* **1995**, *27*, 1281–1292, doi:10.1016/S0022-2828(05)82390-9.
146. Brisson, B.K.; Stewart, D.C.; Burgwin, C.; Chenoweth, D.; Wells, R.G.; Adams, S.L.; Volk, S.W. Cysteine-Rich Domain of Type III Collagen N-Propeptide Inhibits Fibroblast Activation by Attenuating TGF β Signaling. *Matrix Biol* **2022**, *109*, 19–33, doi: 10.1016/J.MATBIO.2022.03.004.

147. Mackey, A.L.; Heinemeier, K.M.; Koskinen, S.O.A.; Kjaer, M. Dynamic Adaptation of Tendon and Muscle Connective Tissue to Mechanical Loading. *Connect Tissue Res* **2008**, *49*, 165–168, doi:10.1080/03008200802151672.
148. Kothapalli, D.; Hayashi, N.; Grotendorst, G.R. Inhibition of TGF- β -stimulated CTGF Gene Expression and Anchorage-independent Growth by CAMP Identifies a CTGF-dependent Restriction Point in the Cell Cycle. *The FASEB Journal* **1998**, *12*, 1151–1161, doi:10.1096/fasebj.12.12.1151.
149. Arsic, N.; Zacchigna, S.; Zentilin, L.; Ramirez-Correa, G.; Pattarini, L.; Salvi, A.; Sinagra, G.; Giacca, M. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Skeletal Muscle Regeneration in Vivo. *Mol Ther* **2004**, *10*, 844–854, doi:10.1016/J.YMTHE.2004.08.007.
150. Schiaffino, S.; Dyar, K.A.; Ciciliot, S.; Blaauw, B.; Sandri, M. Mechanisms Regulating Skeletal Muscle Growth and Atrophy. *FEBS J* **2013**, *280*, 4294–4314, doi:10.1111/FEBS.12253.
151. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 1097–1105, doi:10.1177/1947601911423031/
152. Chen, L.; Bai, J.; Li, Y. MiR-29 Mediates Exercise-induced Skeletal Muscle Angiogenesis by Targeting VEGFA, COL4A1 and COL4A2 via the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Mol Med Rep* **2020**, *22*, 661–670, doi:10.3892/MMR.2020.11164.
153. Yang, G.; Rothrauff, B.B.; Tuan, R.S. Tendon and Ligament Regeneration and Repair: Clinical Relevance and Developmental Paradigm. *Birth Defects Res C Embryo Today* **2013**, *99*, 203, doi:10.1002/BDRC.21041.
154. Chen, C.; Xu, Y.; Song, Y. IGF-1 Gene-Modified Muscle-Derived Stem Cells Are Resistant to Oxidative Stress via Enhanced Activation of IGF-1R/PI3K/AKT Signaling and Secretion of VEGF. *Mol Cell Biochem* **2014**, *386*, 167–175, doi:10.1007/s11010-013-1855-8.
155. Mohammadhosayni, M.; Sadat Mohammadi, F.; Ezzatifar, F.; Mahdavi Gorabi, A.; Khosrojerdi, A.; Aslani, S.; Hemmatzadeh, M.; Yazdani, S.; Arabi, M.; Marofi, F.; et al. Matrix Metalloproteinases Are Involved in the Development of Neurological Complications in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Int Immunopharmacol* **2021**, *100*, doi: 10.1016/J.INTIMP.2021.108076.
156. Hao, Y.; Baker, D.; Dijke, P. Ten TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/IJMS20112767.
157. Lechner, B.E.; Lim, J.H.; Mercado, M.L.; Fallon, J.R. Developmental Regulation of Biglycan Expression in Muscle and Tendon. *Muscle Nerve* **2006**, *34*, 347–355, doi:10.1002/MUS.20596.
158. Casar, J.C.; McKechnie, B.A.; Fallon, J.R.; Young, M.F.; Brandan, E. Transient Up-Regulation of Biglycan during Skeletal Muscle Regeneration: Delayed Fiber Growth along with Decorin Increase in Biglycan-Deficient Mice. *Dev Biol* **2004**, *268*, 358–371, doi: 10.1016/J.YDBIO.2003.12.025.
159. Schultz, G.S.; Wysocki, A. Interactions between Extracellular Matrix and Growth Factors in Wound Healing. *Wound Repair Regen* **2009**, *17*, 153–162, doi:10.1111/J.1524-475X.2009.00466. X.

160. Bi, Y.; Ehirchiou, D.; Kilts, T.M.; Inkson, C.A.; Embree, M.C.; Sonoyama, W.; Li, L.; Leet, A.I.; Seo, B.M.; Zhang, L.; et al. Identification of Tendon Stem/Progenitor Cells and the Role of the Extracellular Matrix in Their Niche. *Nat Med* **2007**, *13*, 1219–1227, doi:10.1038/NM1630.
161. Narayanan, N.; Calve, S. Extracellular Matrix at the Muscle – Tendon Interface: Functional Roles, Techniques to Explore and Implications for Regenerative Medicine. *Connect Tissue Res* **2021**, *62*, 53, doi:10.1080/03008207.2020.1814263.
162. Saclier, M.; Yacoub-Youssef, H.; Mackey, A.L.; Arnold, L.; Ardjoune, H.; Magnan, M.; Sailhan, F.; Chelly, J.; Pavlath, G.K.; Mounier, R.; et al. Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate during Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells* **2013**, *31*, 384–396, doi:10.1002/STEM.1288.
163. Li, Y.; Liu, X.; Liu, X.; Peng, Y.; Zhu, B.; Guo, S.; Wang, C.; Wang, D.; Li, S. Transforming Growth Factor- β Signalling Pathway in Tendon Healing. *Growth Factors* **2022**, *40*, 98–107, doi:10.1080/08977194.2022.2082294.
164. Kumar, L.; Bisen, M.; Khan, A.; Kumar, P.; Patel, S.K.S. Role of Matrix Metalloproteinases in Musculoskeletal Diseases. *Biomedicines* **2022**, *10*, doi:10.3390/BIOMEDICINES10102477.
165. Boesen, A.P.; Dideriksen, K.; Couppé, C.; Magnusson, S.P.; Schjerling, P.; Boesen, M.; Kjaer, M.; Langberg, H. Tendon and Skeletal Muscle Matrix Gene Expression and Functional Responses to Immobilisation and Rehabilitation in Young Males: Effect of Growth Hormone Administration. *Journal of Physiology* **2013**, *591*, 6039–6052, doi:10.1113/jphysiol.2013.261263.
166. Petrosino, J.M.; Leask, A.; Accornero, F. Genetic Manipulation of CCN2/CTGF Unveils Cell-Specific ECM-Remodeling Effects in Injured Skeletal Muscle. *FASEB Journal* **2019**, *33*, 2047–2057, doi:10.1096/fj.201800622RR.
167. Rebolledo, D.L.; González, D.; Faundez-Contreras, J.; Contreras, O.; Vio, C.P.; Murphy-Ullrich, J.E.; Lipson, K.E.; Brandan, E. Denervation-Induced Skeletal Muscle Fibrosis Is Mediated by CTGF/CCN2 Independently of TGF- β . *Matrix Biology* **2019**, *82*, 20–37, doi:10.1016/j.matbio.2019.01.002.
168. Boppart, M.D.; Mahmassani, Z.S. THEME New and Emerging Roles of the Cytoskeleton in Striated Muscle Integrin Signaling: Linking Mechanical Stimulation to Skeletal Muscle Hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **2019**, *317*, 629–641, doi:10.1152/ajpcell.00009.2019.-The.
169. Graham, Z.A.; Gallagher, P.M.; Cardozo, C.P. Focal Adhesion Kinase and Its Role in Skeletal Muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **2015**, *36*, 305–315.
170. Sartori, R.; Romanello, V.; Sandri, M. Mechanisms of Muscle Atrophy and Hypertrophy: Implications in Health and Disease. *Nat Commun* **2021**, *12*.
171. Csapo, R.; Gumpenberger, M.; Wessner, B. Skeletal Muscle Extracellular Matrix - What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Front Physiol* **2020**, *11*, doi:10.3389/FPHYS.2020.00253.

172. Karlsen, A.; Couppé, C.; Andersen, J.L.; Mikkelsen, U.R.; Nielsen, R.H.; Magnusson, S.P.; Kjaer, M.; Mackey, A.L. Matters of Fiber Size and Myonuclear Domain: Does Size Matter More than Age? *Muscle Nerve* **2015**, *52*, 1040–1046, doi:10.1002/MUS.24669.
173. Han, W.M.; Jang, Y.C.; García, A.J. Engineered Matrices for Skeletal Muscle Satellite Cell Engraftment and Function. *Matrix Biology* 2017, *60–61*, 96–109.
174. Shahriyari, M.; Islam, M.R.; Sakib, S.M.; Rinn, M.; Rika, A.; Krüger, D.; Kaurani, L.; Gisa, V.; Winterhoff, M.; Anandakumar, H.; et al. Engineered Skeletal Muscle Recapitulates Human Muscle Development, Regeneration and Dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2022**, *13*, 3106–3121, doi:10.1002/jcsm.13094.
175. Sincennes, M.C.; Brun, C.E.; Lin, A.Y.T.; Rosembert, T.; Datzkiw, D.; Saber, J.; Ming, H.; Kawabe, Y. ichi; Rudnicki, M.A. Acetylation of PAX7 Controls Muscle Stem Cell Self-Renewal and Differentiation Potential in Mice. *Nat Commun* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-23577-z.
176. Uemichi, K.; Shirai, T.; Takemasa, T. Combined Effects of Functional Overload and Denervation on Skeletal Muscle Mass and Its Regulatory Proteins in Mice. *Physiol Rep* **2023**, *11*, doi:10.14814/phy2.15689.
177. Yoshida, T.; Delafontaine, P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells* 2020, *9*.
178. Wang, R.; Chen, F.; Chen, Q.; Wan, X.; Shi, M.; Chen, A.K.; Ma, Z.; Li, G.; Wang, M.; Ying, Y.; et al. MyoD Is a 3D Genome Structure Organizer for Muscle Cell Identity. *Nat Commun* **2022**, *13*, doi:10.1038/s41467-021-27865-6.
179. Milewska, M.; Domoradzki, T.; Majewska, A.; Błaszczyk, M.; Gajewska, M.; Hulanicka, M.; Ciecierska, A.; Grzelkowska-Kowalczyk, K. Interleukin-8 Enhances Myocilin Expression, Akt-FoxO3 Signaling and Myogenic Differentiation in Rat Skeletal Muscle Cells. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 19675–19690, doi:10.1002/jcp.28568.
180. Zhang, S.; Ju, W.; Chen, X.; Zhao, Y.; Feng, L.; Yin, Z.; Chen, X. Hierarchical Ultrastructure: An Overview of What Is Known about Tendons and Future Perspective for Tendon Engineering. *Bioact Mater* **2022**, *8*, 124–139, doi:10.1016/J.BIOACTMAT.2021.06.007.

2. MANUSCRITO- SUBMETIDO

ADAPTIVE MOLECULAR AND STRUCTURAL SKELETAL MUSCLE RESPONSES TO PARTIAL CALCANEAL TENDON INJURY: INSIGHTS INTO REMODELING AND PLASTICITY

Victoria Assis¹, Rosangela Vieira², Ivo Vieira de Sousa Neto³, Fabrício Reichert Barin⁴, Graciele Vieira Ramos⁵, Octávio Luiz Franco^{2,7}, Otavio Nobrega⁸, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari^{9,10}, Tainá Caroline dos Santos Malavazzi^{9,10}, Bernardo Petriz², João Luiz Quaglioti Durigan¹, Rita de Cassia Marqueti¹

¹ Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Laboratory of Molecular Analysis, Faculty of Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

² Graduate Program in Genomics Science and Biotechnology, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil,

³ School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

⁴ Orthopedic Hospital and Specialized Medicine, Brasília, Brazil.⁵ Universidade Paulista (UNIP) – Campus Brasília; IPE (Research and Teaching Institute – HOME Hospital)

⁷ S-Inova Biotech, Postgraduate in Biotechnology, Dom Bosco Catholic University, Campo Grande, Brazil

⁸ Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília

⁵ Institute of Health Sciences – Universidade Paulista, São Paulo, Brazil

⁶ Graduate Program of Sciences and Technology of Health, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil,

⁷ S-Inova Biotech, Graduate Program in Biotechnology, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

⁸ Graduate Program of Medical Sciences, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

⁹ Graduate Program in Medicine Biophotonics and Rehabilitation Sciences, São Paulo, Brazil.

¹⁰ Postgraduate in Rehabilitation Sciences, UNINOVE, São Paulo, Brazil.

* **Corresponding author:** Marqueti, RC (marqueti@unb.br) and Assis, V (vicass.assis@gmail.com)

Campus Universitário, Centro Metropolitano 1, Conjunto A, Universidade de Brasília, UnB – Zip Code 72220-900

ABSTRACT

Skeletal muscle is a highly adaptive tissue, capable of responding to different physiological and functional demands, even in situations that may cause instability. Objectives: This study aims to evaluate the effects of partial injury to the calcaneal tendon (CT) on the gastrocnemius muscle remodeling and plasticity, at different times after injury. Methods: The study was carried out with Wistar mice randomly divided into five groups. The control group consists of animals that were not subjected to partial calcaneal tendon damage and the remaining four groups of animals were subjected to partial calcaneal tendon damage and subdivided according to the time of euthanasia: 3, 14, 28, and 55 days after injury. The gastrocnemius muscle was prepared for gene expression analysis, zymography, flow cytometry, and morphology. The calcaneal tendon was analyzed only to verify the presence of the partial injury. Results: We observed a rapid reaction to injury through up-regulation of *Col3a1*, *Ctgf*, *Timp-2*, and *Bgn* mRNA levels, and MMP-2 activity after 3 days. Conversely, we found early (3D and 14D) down-regulation of *Vegf*, *Mstn*, and *Akt* mRNA levels, suggesting complex interactions between different signaling pathways. Moreover, there was a delayed response in genes related to synthesis processes, such as *Pax7*, *P70s6k*, and *Myod-1*. Finally, the 55D group exhibited increased CSA and diameter in muscle fibers, which was accompanied by up-regulation of IL-8 levels. Conclusion: Our findings suggest that partial injury can negatively affect the intracellular signaling and degradation pathways, disturbing the muscular extracellular matrix regulatory mechanisms and communication with the tendon.

Keywords: skeletal muscle remodeling, gene expression, intracellular signaling, tendon lesion

European Journal of Applied Physiology
**ADAPTIVE MOLECULAR AND STRUCTURAL SKELETAL MUSCLE RESPONSES
 TO PARTIAL CALCANEAL TENDON INJURY: INSIGHTS INTO REMODELING AND
 PLASTICITY**
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	ADAPTIVE MOLECULAR AND STRUCTURAL SKELETAL MUSCLE RESPONSES TO PARTIAL CALCANEAL TENDON INJURY: INSIGHTS INTO REMODELING AND PLASTICITY
Article Type:	Original Article
Keywords:	skeletal muscle remodeling; gene expression; intracellular signaling; tendon lesion
Corresponding Author:	Victoria Lyssa Assis, MD Universidade de Brasília: Universidade de Brasília Ceilandia, Brasilia BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Brasília: Universidade de Brasília
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Victoria Lyssa Assis, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Victoria Lyssa Assis, MD Rosangela Vieira, PhD Ivo Vieira de Sousa Neto Fabrício Reichert Barin Graciele Vieira Ramos Octávio Luiz Franco Otavio Nobrega Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari Tainá Caroline dos Santos Malavazzi Bernardo Petriz João Luiz Quaglioti Durigan Rita de Cassia Marqueti

3. ANEXOS

I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**LESÕES MÚSCULO-TENDÍNEA E SUA RELAÇÃO COM A REGENERAÇÃO TECIDUAL E REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR**”, registrada com o nº **(012/19)**, sob a responsabilidade de **Rita de Cássia Marqueti Durigan** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UCB) da Universidade Católica de Brasília, em reunião de 21/10/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro de 2021.
Espécie / linhagem/ raça	<i>Rattus Novergicus</i> – Wistar.
Nº de Animais	70
Peso / Idade	200g / 2 Meses
Sexo	Macho
Origem	Laboratório de estudos em educação física e saúde - LEEFS

Brasília, 05 de novembro de 2019.

II. Produto de Impacto Sociocultural

Apresentei as atividades desenvolvidas no Laboratório de Análises Moleculares (LAM), situado na UnB, Campus de Ceilândia, para os alunos do Centro de Ensino Médio 3, localizado em Taguatinga, DF. O objetivo foi proporcionar uma demonstração clara, lúdica e acessível do trabalho realizado no laboratório. A intenção por trás dessa iniciativa foi destacar que a ciência é um espaço democrático e acessível, aberto a diversos tipos de formação. A apresentação teve como propósito mostrar que a pesquisa científica pode ser compreendida de maneira envolvente e que todos, independentemente de sua formação, têm a capacidade de se envolver e compreender o fascinante mundo da ciência.



Imagem 1. Foto retirada após a apresentação do Laboratório de Análises Moleculares (LAM) para a turma 3º ano B do Centro de Ensino Médio 3 em Taguatinga- DF.

III. Apresentação de trabalho no evento proporcionado pela FESBE.

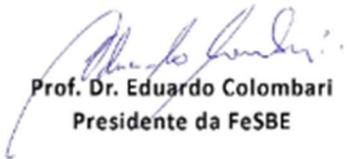


Certificado

Certificamos que o resumo intitulado

01.016 - ADAPTATION OF THE GASTROCNEMUS MUSCLE AFTER A PARTIAL INJURY OF THE CALCANEAL TENDON IN RATS. - Assis VL, Neto IVS, Andrade RV, Barin F, Franco OL, Petriz B, Marqueti C R, Laboratório de Análises Moleculares - UnB Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - UCB

foi apresentado em forma de Painel durante a XXXVII Reunião Anual da FeSBE realizada no período 27 a 30 de agosto de 2023, no Hotel Atlântico Búzios, em Búzios, RJ.


Prof. Dr. Eduardo Colombari
Presidente da FeSBE

Patrocinador



Apoio



IV. Participação no Fórum Discente da ABRAPG-FT



V. Apresentação de trabalho no III Encontro Online do PPGMCF.

Verifique o código de autenticidade 2930117.0616178.5.8.598661846461737 em <https://www.even3.com.br/documentos>



Certificamos que Victoria Lyssa Assis, Rita de Cassia Marqueti Durigan, Ivo Vieira de Sousa Neto apresentaram o trabalho intitulado "**A plasticidade do músculo gastrocnêmio após lesão parcial do tendão calcâneo de ratos**" n o evento **III Encontro Online do PPGMCF.**

12/04/2023 a 14/04/2023

Rita de Cássia Menegati Dornelles
Coordenadora do Programa Multicêntrico

**Liliani Aparecida Sereno
Fontes de Medeiros**
Representante Discente Geral

Alice Santos Cruz Veras
Representante Discente Geral

VI. IMPACTOS PRÁTICAS DOS ACHADOS PARA A SOCIEDADE

O estudo avaliou os impactos da lesão parcial do tendão calcâneo no adjacente apresenta implicações significativas e práticas para a sociedade. Visto a gama de resultados obtidos nesta pesquisa, em conjunto com informações já disponíveis na literatura, é possível que os mesmos são capazes de influenciar em diferentes setores, além disto, é capaz de proporcionar insights valiosos para profissionais de saúde e a comunidade em geral.

Os achados podem contribuir para o desenvolvimento de protocolos de reabilitação mais eficazes e personalizados para indivíduos com lesões parciais tendíneas quanto musculares. Ao compreender a interconexão entre essas estruturas e a influência mútua na homeostase, os profissionais de saúde podem desenvolver protocolos de reabilitação mais eficazes e personalizados. Essa compreensão aprimorada permite uma melhor gestão das lesões, resultando em recuperação mais rápida para os pacientes e redução dos impactos a longo prazo, promovendo não apenas a saúde individual, mas também contribuindo para a otimização dos recursos no sistema de saúde e na qualidade de vida da sociedade como um todo.

Em síntese, a presente dissertação apresenta as seguintes características:

Abrangência: Internacional. Os dados desta pesquisa podem ser utilizados em qualquer país, por se tratar de um estudo com animais, neste caso ratos Wistar, disponíveis em diversos laboratórios do mundo.

Aplicabilidade: Alta. Todos os métodos utilizados nesta pesquisa estão muito bem descritos, e estão baseados em protocolos bem reconhecidos já disponíveis na literatura.

Complexidade: Média. Apesar de ser um estudo tenham atributos inovadores e com informações pertinentes para a literatura internacional. Tem a limitação de algumas análises mais robustas que poderiam acrescentar ainda mais o projeto.

Inovação: Média. Apesar de ser um estudo que contribuiu com dados sobre a interface musculotendínea, o mesmo foi baseado em conhecimentos prévios da literatura científica. Contudo, ainda é um estudo que trás informações relevantes e inovadoras na área.

VII. PRODUTOS DESENVOLVIDOS NO PERÍODO DO MESTRADO

PRODUTO CIENTÍFICO	QUANTIDADE	ESPECIFICAÇÕES
<i>Artigos científicos publicados</i>	3	Assis V, de Sousa Neto IV, Ribeiro FM, et al. The Emerging Role of the Aging Process and Exercise Training on the Crosstalk between Gut Microbiota and Telomere Length. <i>Int J Environ Res Public Health</i> . 2022;19(13):7810. Published 2022 Jun 25. doi:10.3390/ijerph19137810
		Salomão R, Assis V, de Sousa Neto IV, et al. Involvement of Matrix Metalloproteinases in COVID-19: Molecular Targets, Mechanisms, and Insights for Therapeutic Interventions. <i>Biology (Basel)</i> . 2023;12(6):843. Published 2023 Jun 10. doi:10.3390/biology12060843
		Ribeiro FM, Silva MA, Lyssa V, et al. The molecular signaling of exercise and obesity in the microbiota-gut-brain axis. <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i> . 2022;13:927170. Published 2022 Jul 28. doi:10.3389/fendo.2022.927170
<i>Apresentação de trabalho em evento científico com publicação em anais de evento</i>	1	Assis, Victoria et al. ADAPTATION OF THE GASTROCNEMUS MUSCLE AFTER A PARTIAL INJURY OF THE CALCANEAL TENDON IN RATS. In: ANAIS DA XXXVII REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 2023, Búzios. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2023. Disponível em: < https://proceedings.science/fesbe-2023/trabalhos/adaptation-of-the-gastrocnemus-muscle-before-a-partial-injury-of-the-calc-nea-te?lang=pt-br > Acesso em: 16 jan. 2024.
<i>Apresentação de trabalho em evento científico sem publicação em anais de evento</i>	2	Victoria Assis, Ivo Vieira de Souza Neto, Bernardo Petriz, Rita Marqueti. A PLASTICIDADE DO MÚSCULO ESQUELÉTICO APÓS LESÃO PARCIAL DO TENDÃO CALCÂNEO EM RATOS. I FÓRUM DISCENTE DA ABRAPG-FT
		Victoria Assis, Rita de Cassia Marqueti, Ivo Vieira de Souza Neto." A plasticidade do músculo gastrocnêmio após lesão parcial do tendão calcâneo de rato" no evento III Encontro Online do PPGMCF.