



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO  
HUMANO E TECNOLOGIAS**

**ÁREA DE TECNOLOGIAS E DESEMPENHO HUMANO**

Juliana Cristina Barbosa

**PLASTICIDADE TECIDUAL NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DO TIBIAL  
ANTERIOR E SÓLEO DE RATOS WISTAR IMOBILIZADOS E  
SUBMETIDOS À REABILITAÇÃO ARTICULAR AQUÁTICA:  
ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS**

Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA

**Rio Claro – SP  
2019**

**JULIANA CRISTINA BARBOSA**

**PLASTICIDADE TECIDUAL NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DO TIBIAL  
ANTERIOR E SÓLEO DE RATOS WISTAR IMOBILIZADOS E  
SUBMETIDOS À REABILITAÇÃO ARTICULAR AQUÁTICA:  
ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Humano e Tecnologias do Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP – Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena**

**RIO CLARO – SP  
2019**

B238p      Barbosa, Juliana Cristina  
             PLASTICIDADE TECIDUAL NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DO TIBIAL  
             ANTERIOR E SÓLEO DE RATOS WISTAR IMOBILIZADOS E SUBMETIDOS  
             À REABILITAÇÃO ARTICULAR AQUÁTICA: ANÁLISES MORFOLÓGICAS E  
             MORFOMÉTRICAS / Juliana Cristina Barbosa. -- Rio Claro, 2019  
             93 f.

             Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto  
             de Biociências, Rio Claro

             Orientador: Adriano Polican Ciena

             1. Imobilização. 2. Remobilização Aquática. 3. Junção Miotendínea. 4.  
             Microscopia de Luz. 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Plasticidade tecidual na junção miotendínea do tibial anterior e sóleo de ratos Wistar imobilizados e submetidos à reabilitação articular aquática: análises morfológicas e morfométricas

**AUTORA: JULIANA CRISTINA BARBOSA**

**ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em DESENVOLVIMENTO HUMANO E TECNOLOGIAS, área: Tecnologias nas Dinâmicas Corporais pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA

Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. II-SEI WATANABE

Departamento de Anatomia - Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo - SP

Prof. Dr. VITOR ENGRÁCIA VALENTI

Departamento de Fonoaudiologia e Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia / UNESP - Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília - SP

Rio Claro, 19 de fevereiro de 2019

*À Deus por me fortalecer neste caminho de amor ao próximo.  
Aos meus pais Lucia Cristina Barbosa e João Carlos Barbosa,  
pelo amor incondicional e pela vida, por serem meu exemplo.*

*Aos meus pacientes que me ensinam diariamente a  
superar qualquer dificuldade e que vale a pena viver.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, primeiramente pela vida e por ter me sustentado até aqui. Por guiar meus caminhos com tanto carinho e amor, que encontro sempre com meus amigos. Sei que Deus cuidou de mim nesses anos de maneira muito especial, e me presenteou com esta oportunidade de realizar um sonho.

Agradeço ao meu pai João Carlos Barbosa, por ter me apoiado em todos os momentos. Seu exemplo e suas palavras me trouxeram muita coragem diante das dificuldades que me deparei. Por toda a sua dedicação durante todos esses anos, em que fez de tudo por mim para que eu realizasse meus sonhos. Você é uma pessoa formidável, exemplo como pai, profissional, amigo. Te admiro muito e tento seguir seus ensinamentos em minha vida. Amo você.

Agradeço à minha mãe Lucia Cristina Barbosa por todo o incentivo e paciência. Seu exemplo como professora me inspirou nessa jornada, e seu apoio nos momentos de dificuldades fez toda a diferença. Obrigada por tudo mãe. Amo você.

Agradeço à Guilherme Florenzano Rizatto, serei eternamente grata por toda paciência, ajuda e incentivo durante essa jornada. Me inspiro em você para continuar a pesquisar, por ser tão dedicado e feliz nesse caminho. Obrigada por tanto carinho, por ser meu porto seguro nos momentos de dificuldade. Contigo tudo se tornou mais leve e feliz!

Agradeço ao meu irmão João Paulo Barbosa, pelo apoio nessa jornada, e mais uma vez me ajudando nas mudanças de cidade.

Agradeço à minha avó Benedita Ramos Barbosa por todo apoio e orações. Deus me abençoou com minha intercessora.

Agradeço à minha avó Maria Rita Novoletti de Lima, por todo apoio e carinho sempre. Obrigada por ser meu anjo na Terra.

Agradeço à minha tia Vera Aparecida Ramos por ter me apoiado e aconselhado durante esse percurso, além de ter me encorajado a lutar pelo meu sonho. Parece que foi ontem que estávamos conversando sobre os planos de estudos e trabalho e como isso era importante para a realização pessoal. Lembro daquele dia em que fui na sua casa para conversarmos, como todos os finais de semana, mas aquele foi diferente pois precisava de suas orientações. Me fez enxergar que quando uma porta se fecha, outras se escancaram, pois para cada sonho que não der certo, outros

surgirão. O que não sabíamos era que uma semana depois você estaria internada, e por uma mensagem me contando que estava muito doente, mas não sabia ainda o que era. Daquele dia, em outubro de 2017 tudo mudou, pois foi diagnosticada com câncer nos pulmões e nos ossos da coluna vertebral. E então começou o dolorido tratamento, passando pela quimioterapia e radioterapia. Aos finais de semana eu a visitava, e nos últimos 4 meses em que precisou de cuidados mais intensos pois estive acamada, eu estive ajudando a cuidar também. Dias que foram doloridos, porém de muita resiliência. Enquanto ajudava nos cuidados, também estava terminando de escrever as páginas dessa dissertação. Não podemos fechar os olhos para o que acontece ao nosso redor: nossa família, amigos. A vida é muito breve, a vida é um sopro, então eu escolhi viver olhando ao meu redor, tendo empatia e ajudando quem necessitar. Dessa lição que a vida me deu, hoje fica a saudade, e a gratidão à alguém que sempre acreditou em mim.

Agradeço à minha tia Milena Barbosa de Lima por sempre ter incentivado os meus estudos, além de ser minha grande amiga. Obrigada por ser exemplo de dedicação, ética profissional, além de me encorajar por este caminho do mestrado. Seu apoio foi essencial na realização deste sonho, saiba me espelho em você.

Agradeço a todos meus amigos, por toda a motivação desde o início e em todas as etapas. Foram vocês que me levantaram quando eu caí, e comemoraram comigo todas as minhas vitórias! Só tenho a agradecer por ter grandes amigos ao meu lado, os quais posso confiar! Em especial à Isabelle Louise Perim, Leandro Casella, Everton Davanzo, Maurício Puppim, Danilo Spironello Carraro, Marielly Carraro, e Amanda Gadotti.

Agradeço à minha amiga Fabiane Maximo, por estar sempre por perto apesar da distância. Por todas nossas conversas e conselhos, e por poder contar com você. Agradeço à minha amiga Mariana Fernanda, pelos momentos de alegria que compartilhamos juntas nesses últimos anos e durante o mestrado, por ouvir meus desabaços e me apoiar em tudo.

Agradeço aos meus familiares que me apoiaram nessa jornada.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento Humano e Tecnologias pela oportunidade de realizar o mestrado, e em especial ao Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira (coordenador) e Profa. Dra. Fernanda Moreto Impolcetto (vice-coordenadora).

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Polican Ciena pela oportunidade de realizar esse mestrado, pelos ensinamentos acadêmicos e profissionais.

Agradeço ao professor Il-Sei Watanabe por participar da banca e contribuir para a construção deste trabalho.

Agradeço em especial ao professor Vitor Engrácia Valenti por ter aceitado o convite para ser banca desse trabalho, e trazer suas contribuições para o mesmo. Também agradeço por desde o meu primeiro ano de faculdade acreditar em mim e no meu trabalho, me incentivar a estudar inglês e me apresentar o mundo científico. Paralelo a isso tenho um grande amigo e irmão de sangue unespiano, o qual me inspira a ser uma pessoa melhor e perseguir meus sonhos para contribuir para o bem das pessoas ao meu redor. Saiba que o admiro, respeito, e me espelho em seus passos. Por fim, destaco que venho cultivando “paz e amor no coração”, e aprendendo que tolerância é o caminho da paz. Muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Morfologia e Atividade Física, os quais me auxiliaram nessa jornada, e dividiram dias repletos de anatomia e morfologia, desde a elaboração de projetos, monitoria nas aulas de anatomia, protocolos práticos, limpeza de biotério e dissecações, cursos, congressos e simpósios, bem como em momentos felizes de confraternização. Obrigada por me acompanharem neste caminho: Lara, Bruna, Carolina, Gabriel, Gabriela, Giovana, Gustavo, Jurandyr, Luana, Marcela, Vinícius. Sou muito grata por tudo!

Agradeço aos técnicos dos laboratórios de anatomia e morfologia pelo auxílio prestado para a realização deste trabalho.

Em especial à Luan e Nátali, que iniciaram essa jornada do mestrado ao meu lado, porém cada um por seus motivos particulares não continuaram. Saibam que agradeço por tudo o que vivemos juntos, e torço muito por vocês!

Agradeço às minhas colegas de trabalho do Centro Especializado em Reabilitação de Cosmópolis.

Aos animais de experimentação, que sem saber, acrescentam diariamente valores inestimáveis à ciência.



### *Epígrafe*

*” Você nasceu no lar que precisava nascer, vestiu o corpo físico que merecia, mora onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com o teu adiantamento. Você possui os recursos financeiros coerentes com tuas necessidades...Nem mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.*

*Seu ambiente de trabalho é o que você elegeu espontaneamente para a sua realização. Teus parentes e amigos são as almas que você mesmo atraiu, com tua própria afinidade.*

*Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle. Você escolhe, recolhe, elege, atrai, busca, expulsa, modifica tudo aquilo que te rodeia a existência. Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes. São as fontes de atração e repulsão na jornada da tua vivência.*

*Não reclame, nem se faça de vítima. Antes de tudo, analisa e observa. A mudança está em tuas mãos. Reprograma tua meta, busca o bem e você viverá melhor. Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim. ”*

Chico Xavier

## RESUMO

A junção miotendínea (JMT) é a principal área anatômica do aparelho locomotor, uma interface entre o músculo e o tendão delimitada pelo sarcolema, que corresponde a principal área de transmissão de força atuante no posicionamento e estabilização articular. No entanto, a imobilização de um segmento é um recurso clínico no tratamento de lesões musculoesqueléticas, que resulta em atrofia muscular, o que poderia indicar possíveis alterações na JMT. Em contrapartida, o exercício aeróbio tem a capacidade de modificar a morfologia da JMT e possui aplicabilidade em situações patológicas específicas com caráter preventivo e de reabilitação. O objetivo do presente estudo consistiu em analisar as possíveis alterações das características morfológicas da JMT do tibial anterior e sóleo de ratos Wistar adultos submetidos à imobilização e remobilização por protocolo de natação, empregando os métodos de Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Foram utilizados 35 ratos machos, com idade de 90 dias, que foram alocados em 5 diferentes grupos (n=7): Grupo Sedentário; Grupo Treinado; Grupo Imobilizado; Grupo Imobilizado/Não Treinado; Grupo Imobilizado/Treinado. Os animais de todos os grupos foram anestesiados e as amostras da JMT dissecadas. Estas amostras foram processadas para análises morfológicas por meio de técnicas de Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão. As características morfológicas do grupo Sedentário demonstraram na região da JMT as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas que apresentaram formatos irregulares, e intercomunicações dispostas nesta região de interface paralelamente entre os feixes de miofilamentos em proximidade às linhas Z dos sarcômeros distais; No grupo Treinado foram observados na região da JMT invaginações sarcoplasmáticas espessas e amplas dispostas em contato com as evaginações; No grupo Imobilizado foi evidenciado na região da JMT aspectos característicos de atrofia do tecido muscular devido à ampla desorganização tecidual das células musculares; No grupo Imobilizado/ Não Treinado foi observado discreto remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de delgadas fibras colágenas; No grupo Imobilizado/ Treinado foi evidenciado na área da JMT, a presença de longas fibras colágenas. Na região distal da célula muscular, foram observados a presença de sarcômeros em séries realinhados em relação ao eixo longitudinal da JMT. No músculo Tibial Anterior, os sarcômeros proximais do Grupo I/NT apresentaram comprimento maior em relação ao Grupo I e respectivamente ao Grupo I/T. Os sarcômeros distais do Grupo T apresentaram comprimento reduzido em relação ao Grupo S, e o Grupo I também evidenciou comprimento reduzido em relação ao Grupo S. No músculo Sóleo, os sarcômeros proximais e distais do Grupo T apresentaram comprimento reduzido em relação ao Grupo S, e o Grupo I também apresentou comprimento reduzido em relação ao Grupo S. A área da JMT apresentou amplas adaptações nas interdigitações provenientes do tecido tendíneo e uma maior área de contato quando submetida ao protocolo de treinamento de natação, em contrapartida houve redução da área de contato perante o protocolo de imobilização; a reabilitação articular pelo treinamento no grupo Imobilizado/ Treinado demonstrou uma reorganização maior dos sarcômeros em séries e reestabeleceu a área de contato entre o tecido tendíneo e o músculo esquelético, pela reestruturação das invaginações e evaginações, enquanto que o grupo Imobilizado/ Não Treinado evidenciou um discreto remodelamento.

Palavras-chave: Imobilização. Remobilização Aquática. Junção Miotendínea. Microscopia de Luz. Microscopia Eletrônica de Transmissão.

## ABSTRACT

The myotendinous junction (MTJ) is the main anatomical area of the locomotor apparatus, an interface between the muscle and the tendon delimited by the sarcolemma, which corresponds to the main area of force transmission acting on joint positioning and stabilization. However, the immobilization of a segment is a clinical feature in the treatment of musculoskeletal injuries, which results in muscle atrophy, which could indicate possible changes in MTJ. In contrast, aerobic exercise has the capacity to modify MTJ morphology and has applicability in specific pathological situations with a preventive and rehabilitation profile. The objective of the present study was to analyze the possible alterations of the MTJ morphological characteristics of the tibialis anterior and soleus of adult *Wistar* rats submitted to immobilization and remobilization by swimming protocol, using Light Microscopy methods and Transmission Electron Microscopy. Thirty-five male rats, aged 90 days, were allocated to 5 different groups (n = 7): Sedentary Group; Trained Group; Immobilized Group; Immobilized / Untrained Group; Immobilized / Trained Group. Animals of all groups were anesthetized and JMT samples were dissected. These samples were processed for morphological analysis using light microscopy and transmission electron microscopy techniques. The morphological characteristics of the Sedentary group demonstrated in the MTJ region the invaginations and sarcoplasmic evaginations that presented irregular and intercommunicated forms arranged in this region of interface parallel between the myofilament bundles in proximity to the Z lines of the distal sarcomeres; In the Trained group, thick and broad sarcoplasmic invaginations were observed in the MTJ region, arranged in contact with the evaginations; In the Immobilized group, characteristic features of muscle tissue atrophy were evidenced in the MTJ region due to the extensive tissue disorganization of muscle cells; In the Immobilized / Untrained group, discrete remodeling and reorganization in the MTJ area was observed due to the presence of thin collagen fibers; In the Immobilized / Trained group, the presence of long collagen fibers was evidenced in the MTJ area. In the distal region of the muscular cell, the presence of sarcomeres in series realigned in relation to the longitudinal axis of the MTJ were observed. In the tibialis anterior muscle, the proximal sarcomeres of Group I / NT presented a longer length in relation to Group I and respectively to Group I / T. The distal sarcomer of Group T presented reduced length in relation to Group S, and Group I also showed reduced length in relation to Group S. In the soleus muscle, the proximal and distal sarcomeres of Group T presented reduced length in relation to Group S, and Group I also presented reduced length in relation to Group S. The MTJ area showed large adaptations in the interdigitations from the tendinous tissue and a larger contact area when submitted to the swimming training protocol; in contrast, there was a reduction of the contact area before the immobilization protocol; joint rehabilitation by training in the Fixed / Trained group demonstrated a major reorganization of the sarcomeres in series and reestablished the contact area between the tendon tissue and the skeletal muscle, by the restructuring of invaginations and evagination, while the Immobilized / Untrained group evidenced a discreet remodeling.

**Keywords:** Immobilization. Water Remobilization. Myotendinous junction. Light Microscopy. Transmission Electron Microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Organograma dos grupos experimentais.....	34
<b>Figura 2</b> - Protocolo de imobilização do membro posterior direito.....	36
<b>Figura 3</b> - Protocolo de treinamento – natação.....	38
<b>Figura 4</b> - Microscopia de Luz do ventre muscular do Tibial Anterior de ratos <i>Wistar</i> ..	45
<b>Figura 5</b> - Microscopia de Luz da junção miotendínea do Tibial Anterior.....	48
<b>Figura 6</b> - Microscopia de Luz do ventre muscular do Sóleo.....	50
<b>Figura 7</b> - Microscopia de Luz da junção miotendínea do músculo Sóleo.....	53
<b>Figura 8</b> - Microscopia Eletrônica de Transmissão da JMT do Tibial Anterior e Sóleo.....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Média e desvio padrão da massa corporal (g) dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T em períodos distintos ( $p < 0,05$ ) *I/NT $\neq$ I/T; # S $\neq$ I, I/NT, I/T; e ( $p < 0,001$ ) $\infty$ T $\neq$ I/NT.....	42
<b>Tabela 2</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos das Fibras Tipo I e Tipo II do Tibial Anterior. ....	55
<b>Tabela 3</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos das Fibras Tipo I e Tipo II do Sóleo. ....	56
<b>Tabela 4</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos Sarcômeros Proximais e Distais do Tibial Anterior.....	61
<b>Tabela 5</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos Sarcômeros Proximais e Distais do Sóleo. ....	63
<b>Tabela 6</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos dos Comprimentos de Invaginações e Evaginações do Tibial Anterior. ....	65
<b>Tabela 7</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos da Espessura de Invaginações e Evaginações do Tibial Anterior. ....	66
<b>Tabela 8</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos de Comprimento de Invaginações e Evaginações do Sóleo. ....	68
<b>Tabela 9</b> - Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos da Espessura de Invaginações e Evaginações do Sóleo.....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Média e desvio padrão da área de secção transversa do ventre muscular ( $\mu\text{m}$ ) das fibras tipo I e tipo II dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.....54
- Gráfico 2** - Média e desvio padrão da área de secção transversa do ventre muscular ( $\mu\text{m}$ ) das fibras tipo I e tipo II dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.....55
- Gráfico 3** - Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) dos sarcômeros proximais e distais dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.....61
- Gráfico 4** - Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) dos sarcômeros proximais e distais dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Sóleo.....62
- Gráfico 5** - Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.....64
- Gráfico 6** - Média e desvio padrão da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.....66
- Gráfico 7** - Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Sóleo.....67
- Gráfico 8** - Média e desvio padrão da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Sóleo.....69

## LISTA DE SIGLAS

%	porcentagem
°C	graus Ceulsius
µm	micrômetros
ATP	Adenosina Trifosfato
Cm	centímetros
I	Imobilizado
I/NT	Imobilizado/Não Treinado
I/T	Imobilizado/Treinado
JMT	Junção miotendínea
MEC	matriz extracelular
Mg	miligramas
mL	mililitros
Mm	milímetros
MyoD	Fatores Regulatórios Miogênicos – MRFs
S	Sedentário
T	Treinado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Músculo Estriado Esquelético .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Sarcômero.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Tendão.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Junção Miotendínea .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Imobilização Articular .....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Reabilitação Física - Natação .....</b>	<b>30</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>4 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>33</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Animais .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Imobilização Articular - Protocolo .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 Reabilitação Física - Protocolo De Natação.....</b>	<b>37</b>
<b>5.4 Massa Corporal .....</b>	<b>38</b>
<b>5.5 Microscopia de Luz .....</b>	<b>39</b>
<b>5.5.1 ATPase Miofibrilar .....</b>	<b>39</b>
<b>5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....</b>	<b>40</b>
<b>5.7 Análise Morfométrica .....</b>	<b>40</b>
<b>5.8 Análise Estatística.....</b>	<b>41</b>
<b>6 RESULTADOS PARCIAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>6.1 Massa Corporal .....</b>	<b>42</b>
<b>6.2 Microscopia de Luz .....</b>	<b>43</b>
<b>6.2.1 Músculo - Tibial Anterior.....</b>	<b>43</b>
<b>6.2.2 Músculo - Sóleo.....</b>	<b>49</b>
<b>6.3 Análise Morfométrica da ATPase.....</b>	<b>54</b>
<b>6.3.1 Tibial Anterior .....</b>	<b>54</b>
<b>6.3.2 Sóleo.....</b>	<b>55</b>
<b>6.4 Ultraestrutura.....</b>	<b>56</b>
<b>6.4.1 Tibial Anterior - JMT .....</b>	<b>56</b>
<b>6.4.2 Sóleo - JMT .....</b>	<b>57</b>
<b>6.5 Análise Morfométrica dos Sarcômeros .....</b>	<b>60</b>



<b>6.5.1 Tibial Anterior</b> .....	<b>60</b>
<b>6.5.2 Sóleo</b> .....	<b>62</b>
<b>6.6 Análise Morfométrica das Invaginações e Evaginações Sarcoplasmáticas</b>	<b>63</b>
6.6.1 Tibial Anterior .....	63
6.6.2 Sóleo .....	67
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>86</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA</b> .....	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A junção miotendínea (JMT), uma interface entre o músculo e o tendão delimitada pelo sarcolema, é a principal área de transmissão de força do sistema locomotor, que atua no posicionamento e estabilização articular (CIENA et al., 2012). Esta é responsável por transmitir a força gerada pelas proteínas contráteis intracelulares para o tecido conjuntivo extracelular presente no tendão (KANNUS et al., 1992). De tal forma esta é a região anatômica com maior predisposição a lesões do aparelho locomotor associadas à prática desportiva (CURZI et al., 2012).

A imobilização de um segmento é utilizada clinicamente no tratamento de lesões musculares, tendíneas, ligamentares e osteo-articulares. Esta, por sua vez, acarreta em atrofia das fibras musculares seguido por fibrose intramuscular, perda de extensibilidade e contractilidade, que por consequência ocasiona a diminuição da geração e transmissão da força muscular. Com isso, as propriedades de tração dos músculos imobilizados diminuem acentuadamente durante o período de desuso, o que poderia indicar possíveis alterações na JMT (CURZI et al., 2013; JÄRVINEN et al., 1977).

Recentemente, pesquisas têm demonstrado adaptações na JMT mediante ao envelhecimento, e ao exercício físico. Dentre elas, o exercício aeróbio tem a capacidade de promover alterações morfológicas benéficas e possui aplicabilidade para prevenção e também reabilitação de algumas disfunções musculo-esqueléticas (CURZI et al., 2016). Entretanto, as consequências do comprometimento da área da JMT, induzida pela atrofia por desuso, ainda não estão claras na literatura. Bem como a reabilitação articular por meio da natação, que possivelmente seria benéfica para a principal estrutura do aparelho locomotor, e possivelmente seria capaz de reverter os efeitos deletérios da imobilização articular (CURZI et al., 2013). O que foi demonstrado por meio da análise das alterações morfológicas mediante a imobilização e remobilização articular através do exercício físico na JMT dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar*, com finalidade futura de atuações na prevenção de lesões e em aplicações de novos protocolos de reabilitação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Músculo Estriado Esquelético

O tecido muscular é o mais abundante do corpo humano e compreende cerca de 40 a 60% do peso corporal. Ele é altamente especializado na aplicação de força necessária para o movimento, através da energia contida nas moléculas de ATP. Assim, ele pode ser dividido em três tipos: músculo estriado esquelético, estriado cardíaco e liso; diferenciados de acordo com suas características morfológicas e funcionais (HENDERSON et al., 2017).

O músculo estriado esquelético é constituído por células com características poligonais e multinucleadas, que variam de 10 a 100 micrômetros de diâmetro e até 30 cm de comprimento, o qual cada célula é denominada fibra muscular. A localização dos seus núcleos é periférica, adjacente à membrana plasmática, região conhecida como sarcolema. A região compreendida entre o sarcolema e o sarcoplasma é onde as fibras musculares estão interligadas pelo tecido conjuntivo essencial, constituído por um conjunto de proteínas especializado para transmissão das forças geradas pelas miofibrilas à matriz extracelular (MEC) e, vice-versa (HERRMANN et al., 2007). O seu citoplasma é preenchido por filamentos proteicos dispostos longitudinalmente, denominados miofibrilas. Essas, por sua vez, são formadas principalmente por proteínas denominadas actina e miosina, as quais conferem capacidade contrátil ao músculo. Com esta propriedade contrátil dos músculos estriados esqueléticos estão relacionadas a diversas funções do organismo, como a mobilidade do esqueleto axial e apendicular, manutenção da postura devido a sua fixação nos ossos, movimentação do globo ocular, respiração, reserva protéica e termogênese (GAYRAUD-MOREL et al., 2009).

Uma vez organizado estruturalmente no interior do músculo para fortalecer, proteger, e agrupar as fibras musculares em feixes ligados aos músculos, a MEC é classificado em três tipos, de acordo com sua relação com as fibras: endomísio (tecido conjuntivo mais organizado internamente, envolve com uma bainha fina as fibras individuais do músculo esquelético, as miofibrilas), perimísio (onde as miofibrilas são agrupadas em feixes, sendo este conjunto denominado de fascículo), e epimísio (ao redor do músculo representa a camada mais externa de tecido conjuntivo, revestindo

toda a sua superfície). Adicionalmente, nervos motores penetram pelo músculo e inervam por meio de axônios terminais, cada uma das miofibrilas. Estes nervos sensoriais penetram nos fusos musculares enviando e recebendo informações do estado de ação muscular. Além destes constituintes, o músculo esquelético é altamente vascularizado, fornecendo nutrientes essenciais para a função muscular (TAJBAKHSH et al., 2009).

Os músculos esqueléticos são constituídos por diferentes tipos de fibras que conferem a este tecido uma ampla diversidade estrutural, metabólica e funcional que pode sofrer alterações durante a vida (OKAMOTO et al., 2011). As fibras musculares estão divididas em três categorias: 1- fibras oxidativas, resistentes à fadiga e de contração lenta (tipo I), 2- fibras oxidativas/glicolíticas, resistentes à fadiga e de contração rápida (tipo IIA) e 3- fibras glicolíticas, relativamente resistentes à fadiga e de contração rápida (GREFTE et al., 2007; CIENA et al., 2011), classificadas de acordo com o padrão de coloração histoquímica para a reação da ATPase (SUETTA et al., 2012).

Em análise histoquímica e ultraestrutural do músculo esternomastóide de ratos adultos e idosos, através da reação enzimática NADH-TR e microscopia eletrônica de transmissão, observou-se durante o processo de envelhecimento diminuição na densidade das fibras musculares, o que caracteriza o processo de atrofia muscular. A proporção do tipo de fibras nas regiões analisadas foi modificada, com diminuição de fibras oxidativas-glicolíticas e aumento das fibras oxidativas. Ultraestruturalmente, foram observadas as características do esternomastóide do grupo adulto, através de cortes transversais e longitudinais foram revelados os arranjos dos feixes de miofibrilas, destacando-se o padrão repetitivo de sarcômeros em séries. Entre os feixes miofibrilares, foram observados os arranjos paralelos de mitocôndrias esféricas, ao formar colunas alinhadas próximos às bandas A e I. No entanto, o esternomastóide do grupo idoso mostrou inconsistência, com espaçamento entre os feixes de miofibrilas, com características de atrofia muscular, mitocôndrias com diâmetros e formas reduzidas, e ausência destas próximos das bandas A e I, adjacente à linha Z. Concluiu-se que existe maior proporção de fibras glicolíticas na região superficial e fibras oxidativas na região profunda (CIENA et al., 2011).

De modo que o músculo esquelético possui capacidade de alterar suas propriedades estruturais e funcionais conforme os estímulos recebidos, esta propriedade é denominada plasticidade muscular (SCOTT; STEVENS; BINDER-

MACLEOD, 2001; BALDWIN; HADDAD, 2002; OLIVEIRA et al., 2014). Por isso, o tecido muscular mantém um elevado grau de plasticidade fenotípica durante o tempo de vida de um indivíduo, permitindo adaptações a diferentes tipos de treinamento físico e cargas de trabalho impostas, sendo estas oriundas de esportes, reabilitação física, cirurgia e no trauma, corroborando com a ideia de que o músculo esquelético é um dos tecidos mais adaptáveis do corpo, é facilmente comprovada (FLANN et al., 2011). Isto é, sua composição por diferentes tipos de fibras musculares que contribuem para sua plasticidade, possibilita um aumento na síntese e/ou degradação de proteínas miofibrilares, dependendo do estímulo (PETTE et. al., 1997).

As alterações no *turnover* proteico são controladas por diversos fatores moleculares que regulam a massa muscular. Uma das principais características da plasticidade muscular é a regulação intrínseca da transcrição de genes músculo-específicos que promovem o aumento ou redução da síntese proteica (GLASS et. al., 2005).

O conteúdo de proteínas miofibrilares representa aproximadamente 85% do volume da fibra muscular (HOPPELER, 1986), o que acarreta em aumento (hipertrofia) ou redução da massa muscular (atrofia) em consequência de qualquer situação que altere o *turnover*. Os exercícios físicos provocam uma variedade de mudanças adaptativas na síntese de proteínas, estas que resultam da influência de indutores específicos geneticamente e nos mecanismos de síntese de proteínas, podendo modular o grau de síntese e degradação das proteínas miofibrilares. (CAMPOS et. al., 2001; KADI et. al., 2005). Por outro lado, situações de desuso promovem a redução da atividade muscular, como a imobilização, suspensão do membro posterior, denervação, microgravidade, repouso no leito ou processos fisiológicos (como o envelhecimento) e patológicos (como o câncer, doenças neuromusculares, doenças cardíacas e insuficiência respiratória) podem conduzir a severa perda da massa muscular (MACHIDA et al., 2004; DEGENS et al., 2006).

Em modelos experimentais de hipoatividade muscular, é observado que através da diminuição da ação da gravidade, e em músculos idosos ocorre plasticidade muscular, ao revelar diminuição da área de secção transversa (IYOMASA et al., 2009), e subseqüentemente, no volume total do músculo, o que compromete a eficácia contráctil, caracterizando a atrofia muscular. Ainda, Goldspink (1999) frisa que as alterações no comprimento da fibra muscular são decorrentes da diminuição dos sarcômeros em séries.

Assim, considerando que ambos os músculos, tibial anterior e sóleo possuem uma grande relevância funcional na marcha, entende-se a importância de desenvolver estudos que busquem compreender as alterações morfológicas que ocorrem mediante a imobilização articular tíbio-társica e a sua reabilitação por novos protocolos de treinamento. O músculo tibial anterior está localizado na região anterior da tíbia e tem seu ponto fixo no côndilo lateral da tíbia, parte superior da face lateral da tíbia, membrana interóssea e fáscia da perna, seu ponto móvel no osso cuneiforme e no primeiro metatarso, realiza a ação de dorsiflexão através da articulação talocrural, e a ação de inversão plantar, através da articulação talocalcaneonavicular (LIBERANO, 2002). O músculo sóleo, tem a forma plana em sua espessura (SCHAFER; SYMINGTON; BRYCE, 1923), é um músculo largo, grande e achatado, com origem na região superior da fíbula, septo intermuscular e na linha solear da tíbia. Apresenta um papel postural devido a elevada constituição por fibras musculares do Tipo I, responsável pela flexão plantar, que tem atuação no salto, marcha e flexão da perna (STANDRING et al., 2005; MCCRAW; ARNOLD, 1987; MACEDO-FILHO et al., 1995).

O treinamento aplicado em protocolo de reabilitação de lesões e seus potenciais benefícios na JMT, perante a atrofia ocasionada pelo desuso, bem como suas importantes contribuições não foram investigadas, além da possível relação dessas adaptações estarem diretamente influenciando na ativação de células satélites, respectivamente através da proliferação e diferenciação de mioblastos nesta região, o que também está relacionado com adaptações nos comprimentos dos sarcômeros em séries na região da JMT. Em contrapartida, a presença de tenócitos nessa região tem sido amplamente documentada, principalmente em consequência de protocolos de exercícios físicos que tem a capacidade de remodelamento do tecido tendíneo (CURZI et al., 2016).

Durante o processo de miogênese embrionária, que ocorre mediante células precursoras miogênicas dos somitos a partir do mesoderma, formando as fibras musculares, uma população de células precursoras miogênicas não se diferencia, permanecendo quiescente, e se torna responsável pelo crescimento pós-natal, pela adaptação muscular e pelos processos de regeneração após danos musculares (BENTZINGER et al., 2012). Essas células foram identificadas e descritas primeiramente por Mauro (1961), e subsequente denominadas de células satélites devido à sua localização periférica ao sarcolema, entre a membrana basal e a membrana plasmática.

O músculo esquelético apresenta células-satélites em estado quiescente (repouso) quando não responde a lesões. Em contrapartida, quando este tecido responde a estímulos como crescimento, e remodelação ou trauma, as células satélites são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores da linhagem miogênica. Neste estado, também denominadas mioblastos, essas células se fundem a fibras musculares já existentes ou se fundem a células-satélites vizinhas para gerar novas fibras musculares (YABLONKA-REUVENI, 1994).

No músculo esquelético, o fator de transcrição Pax-7 é expresso pelas células satélites e utilizado para designar células comprometidas com a miogênese, o qual é um marcador expresso em células satélites quiescentes e continua expresso em células musculares quando os marcadores Myf5 ou MyoD estão ativados (QAHAR et al., 2016).

Os fatores transcricionais da família MyoD (fatores reguladores miogênicos - MRFs) como a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4, estão presentes na região regulatória de genes músculo específico, o que inclui os estruturais e os envolvidos com a formação das proteínas dos sarcômeros (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). Os MRFs têm papel importante, pois modulam a síntese proteica. Os MRFs também estão ligados à proliferação e a diferenciação das células satélites, que quando ativadas proliferam-se, diferenciam-se e fundem-se às fibras musculares existentes e promovem a regeneração muscular. A MyoD é mais expressa durante a proliferação (BELL et al., 2016).

Algumas patologias, ocasionam uma diminuição no número de células satélites e sua proliferação, resultando em dificuldades na regeneração ou seu retardo, devido à atrofia muscular. Esta se caracteriza pela fraqueza muscular, que pode ser resultado de uma diminuição no tamanho das miofibrilas. Vários distúrbios, incluindo sarcopenia, diabetes, câncer, caquexia e sepse, podem levar a uma redução do tamanho das miofibrilas (FUKADA et al., 2018).

Existem vários modelos usados para indução de atrofia muscular em roedores. Usando um modelo de suspensão de membros posteriores, foi relatado que o número de células satélites no músculo esquelético foi reduzido após duas semanas desse protocolo (MITCHELL et al., 2004).

Em contrapartida, o exercício resistido induz à hipertrofia, caracterizada pelo aumento no tamanho das fibras musculares, além da ativação e proliferação de células satélites. Ocorreu a proliferação de células satélites, que em sequência são

finalmente incorporadas entre as miofibrilas que podem aumentar em quantidade. Usando camundongos com depleção de células satélites, foi demonstrado que o aumento do número de miofibrilas depende totalmente da presença das células satélites (McCARTHY et al., 2011).

## 2.2 Sarcômero

As miofibrilas, estruturas que preenchem a fibra muscular, são observadas devido a repetições de unidades iguais, cilíndricas e longitudinais, denominadas de sarcômeros, que por sua vez apresentam uma arquitetura extremamente consistente e importante papel na transdução de sinal químico em energia mecânica contrátil (mecanotransdução). Uma vez em observação ao microscópio óptico, observa-se alternância de estrias transversais, claras e escuras. A faixa escura e anisotrópica recebe o nome de Banda A, que é composta por uma matriz de filamentos grossos denominados miosina. Esta é dividida por uma zona menos densa devido à ausência de sobreposição de filamentos finos quando há alongamento do sarcômero, denominada Zona H, na qual encontra-se uma estreita faixa denominada linha M. A faixa clara e isotrópica recebe o nome de Banda I, que é composta por uma matriz de filamentos finos denominados de actina, entretanto no centro da Banda I aparece uma linha transversal escura, a Linha Z. Os sarcômeros são as menores unidades funcionais da contração muscular, delimitadas em cada extremidade pela linha escura e estreita conhecida como Linha Z (FERREIRA, 2005; RIGOARD et al., 2009).

A Linha Z é a principal condutora da geração de força pela contração e atua como ponto de ancoragem para filamentos de actina bem como para a titina e a nebulina. Esta Linha está envolvida com a estabilização do sarcômero contra as forças laterais de cisalhamento, bem como a transmissão de forças axiais que percorrem as fibras muscular. A Banda M tem papel na regulação dos filamentos de miosina (ERTBJERG et al., 2017).

Os sarcômeros são compostos basicamente por filamentos finos e grossos chamados miofilamentos, dentre os quais o miofilamento fino é composto em destaque pela proteína actina, enquanto o grosso pela proteína miosina. A interação desses dois miofilamentos é essencial na contração muscular. O miofilamento fino composto por dois filamentos de actina, um enrolado no outro, onde moléculas de



proteína globular, chamadas de troponina, são encontradas nos sítios de ligação entre os dois filamentos, e a proteína tropomiosina liga-se em cada molécula de troponina. A troponina e tropomiosina possuem ativação cálcio dependentes, sendo componentes essenciais para regulação da ação muscular (CLARK et al., 2002).

No que se diz a respeito do miofilamento grosso, este é composto por grandes moléculas de miosina, organizadas para formar um filamento longo. Cada molécula tem um alargamento, chamado de cabeça. As cabeças da miosina são capazes de mover-se e ligar-se aos sítios da actina, gerando assim a ponte cruzada, imprescindível para a ação muscular (LEVITSKY, 2004).

Os componentes dos filamentos de actina se associam com as estruturas da Linha Z quando as miofibrilas são formadas. A troponina e a tropomiosina tem a função conjunta de regular a interação entre os filamentos de miosina e actina durante a geração de força. Enquanto isso, a titina tem um componente elástico na região da banda I que conecta o final do filamento de miosina à linha Z. A titina é conhecida por definir o comprimento do sarcômero em repouso e por manter os filamentos de miosina no centro do sarcômero. A nebulina é incorporada aos filamentos de actina, e ajuda na organização da estrutura do sarcômero (ERTBJERG et al., 2017).

A microgravidade induz o músculo esquelético a transformações em condição de atrofia, gerada pelo desuso, principalmente na região dos sarcômeros distais na região da JMT, como por exemplo, sarcômeros desalinhados, mitocôndrias com alteração em seus formatos e as tríades localizadas em diferentes locais em relação às condições não patológicas. Desorganização de miofilamentos, distorção ou ausência de linhas Z também são observados nessas condições (CURZI et al., 2013).

### **2.3 Tendão**

Os tendões são estruturas anatomicamente macroscópicas, localizados entre os músculos e os ossos. A sua função básica é transmitir a força gerada pelas proteínas contráteis presentes no ventre muscular para o tecido ósseo e assim, gerar os movimentos articulares (KANNUS, 2000; BENJAMIN; RALPHS, 1998; BENJAMIN et al., 2000). Além disso, atuam na homeostasia do organismo por meio de ações biológicas e biomecânicas fundamentais, como por exemplo na estabilidade

ligamentar (BUTLER; JUNCOSA; DRESSLER, 2004; KJÆR et al., 2004). Os tendões apresentam-se com coloração branca, reluzente e textura fibro-elástica, conferindo-lhes grande resistência às cargas mecânicas, podendo variar no formato e disposição, como são fixados aos ossos, como também, na largura e espessura de tendões cilíndricos, em forma de "leque" e "fita" (KJÆR et al., 2004).

Uma vez que os músculos esqueléticos estão ancorados ao esqueleto por extensões do endomísio, perimísio e epimísio, estes tecidos conjuntivos continuam para além da extremidade do músculo e se fixam no perióstio do osso pela forte conexão fibrosa, o tendão, que se torna contínuo com o perióstio do osso. A região de união entre o músculo e o tendão é denominada de JMT, e a região de inserção do tendão ao tecido ósseo é chamada de junção osteotendínea ou entese. Às fixações de ambas as extremidades de um músculo esquelético são dados nomes específicos. A origem é a extremidade menos móvel e geralmente é proximal, enquanto que a inserção é a extremidade mais móvel e é distal (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011; BENJAMIN; RALPHS, 1998).

Os tendões são revestidos externamente por tecido conjuntivo areolar frouxo denominado paratendão. Este tecido é forrado em sua superfície interior por células sinoviais, e os seus principais componentes são as fibras de colágeno tipo I e tipo III, além das fibras elásticas. Sob o paratendão, o tendão é revestido por uma delgada bainha de tecido conjuntivo chamado de epitendão (KANNUS, 2000). Revestindo o fascículo de fibras colágenas encontra-se o endotendão, que reveste cada fibra tendínea e liga as fibras individuais, e em unidades menores de fibras, em conjunto, com uma delgada rede reticular de espessura variada e que atua como importante conduto para vasos sanguíneos e nervos, o que permite aos fascículos alguma independência de movimento (KANNUS et al., 2000; BENJAMIN, RALPHS, 2000).

Os tendões são constituídos de 55-70% de água, uma parte substancial está associada a proteoglicanos propagadas por intermédio de uma MEC, e 60-85% de seu peso corresponde de colágenos (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004). Existem diversos tipos de colágenos no tecido tendíneo, dentre ele, o colágeno tipo I se caracteriza por suas fibras resistentes a tração (KJÆR et al., 2004). Além disso, o colágeno tipo I tem uma relação com o colágeno tipo V em regular o diâmetro da fibrila durante a maturação e envelhecimento. Em contrapartida, o colágeno do Tipo III

diminui conforme a síntese do colágeno tipo I, e compõe menos de 10% da quantidade de colágeno existente (AMIEL et al., 1984; NIYIBIZI et al., 2000; AMIEL et al., 1991; CHANG et al., 2012). Além disso, o colágeno tipo I está organizado em fibrilas agrupadas paralelamente e constitui organizados em feixes, em contrapartida o tipo III é quase completamente restrito ao endotendão (CHANG et al., 2012).

As células tendíneas, conhecidas como tenoblastos e tenócitos, ao nível microscópico representam cerca de 90-95% dos elementos do tendão, e são constituídas por fibroblastos e fibrócitos alongados que estão presentes entre as fibras de colágeno, organizados em um esquema hierárquico complexo para formar o tendão. Além disso, essas células são responsáveis por produzir os elementos da MEC (KANNUS et al., 2000; DORAL et al., 2010). Os demais elementos celulares presentes no tecido tendíneo são os condrócitos, presentes principalmente na região de inserção muscular, e as células sinoviais provenientes das bainhas tendíneas (DORAL et al., 2010).

As células do tecido conjuntivo são capazes de distinguir e transduzir diferentes estímulos mecânicos, como forças compressivas, tenseis e cisalhantes. Essas forças são propagadas por meio da mecanotransdução. Este mecanismo é responsável pela sobrevivência e crescimento da célula, pois estímulos mecânicos são transformados em estímulos químicos influenciando diretamente na morfologia, bioquímica e arquitetura do músculo esquelético. Assim, o aumento ou a redução da atividade física podem influenciar na síntese e diferenciação dos componentes da MEC e nas proteínas do costâmero (KJÆR et al., 2004).

Em relação à síntese de colágenos, alterações dos níveis de atividade físicas podem comprometer a síntese dos mesmos. Uma vez que o músculo esquelético é conhecido por responder a exercícios físicos, como por exemplo o exercício aeróbio, que contribui para o aumento da síntese de colágeno (TAKALA; VIRTANEN, 2000). Em contrapartida, situações de desuso, induzidas por procedimento de imobilização, mostraram redução da atividade enzimática na síntese do colágeno (AHTIKOSKI, et al., 2001). Além disso foi observado redução dos níveis de mRNA, nos músculos sóleo e plantar, e dos colágenos tipos I e III após sete dias de imobilização do membro posterior direito de ratos. Por outro lado, Järvinen et al. (2002) constataram aumento no colágeno I e III nos músculos sóleo e gastrocnêmio após 3 semanas de

imobilização. Portanto, possivelmente ocorrem adaptações na área da JMT de acordo o nível de atividades físicas e perante a imobilização articular, remodelando os tecidos muscular e tendíneo, o que sugere novos estudos para esclarecer os efeitos da atrofia induzida por desuso e da reabilitação articular por exercícios físicos.

Investigações sobre a adição de sarcômero induzida por alongamento, evidenciou que esta adaptação também é dependente da existência de células satélites. O posicionamento do membro inferior em dorsiflexão estimulou a sarcomerogênese no músculo alongado, e o músculo em posição de encurtamento apresentou drástica redução da área das miofibrilas, e a presença de núcleos centralizados nas células musculares, que indicam o reparo e a regeneração das miofibrilas. O mesmo não ocorreu no grupo em que foram utilizados ratos com depleção destas células (LIEBER et al., 2016).

Em contraste, não foram elucidados nesses estudos o comportamento das células satélites na região da JMT, bem como suas funções no seu remodelamento perante a imobilização e exercícios físicos. Em contrapartida, a presença de tenócitos nessa região tem sido amplamente documentada, principalmente em consequência de protocolos de exercícios físicos que tem a capacidade de remodelamento do tecido tendíneo (CURZI et al., 2016).

### **2.3 Junção Miotendínea**

A JMT é uma região de interface entre os músculos e os tendões que transmite a força contrátil gerada pelas proteínas contráteis presentes nas miofibrilas e a força elástica armazenada no tecido conjuntivo durante o movimento (CIENA et al., 2012). Sua principal função é transmitir as forças geradas nas ações musculares pelas proteínas contráteis para as proteínas do tecido conjuntivo do tendão, agir na força motriz, estabilidade e posicionamento das articulações, auxiliar o controle dos movimentos, armazena e liberar energia elástica (KANNUS et al., 1992; TROTTER et al., 2002), além de ser caracterizada como a principal região de predisposição à lesões durante esforços excessivos e contrações excêntricas (TIDBALL; SALEM; ZERNICKE et al., 1993).

Em nível morfológico, a JMT apresenta interdigitações, conhecidas também como profundas invaginações sarcoplasmáticas que penetram nas membranas das células musculares, e também evaginações, paralelamente à direção miofibrilar em músculos fusiformes. Sua presença aumenta a superfície de contato entre os tecidos muscular e tendíneo, o que colabora para a JMT ser resistente às forças contráteis do músculo-esquelético (KOJIMA et al., 2008). Essas interdigitações são oriundas de MEC, com uma grande quantidade de pequenas fibrilas de colágeno com diâmetro menor que 100nm (WATANABE et al., 2007).

No lado do tecido muscular, os filamentos de miosina dos sarcômeros terminais, próximos da interface, ligam a membrana celular da fibra muscular, o sarcolema, que por sua vez é separado do tecido tendíneo por uma membrana basal. Este último tem um papel chave na ancoragem entre tecidos e, como visto por microscopia eletrônica de transmissão, é dividido em duas camadas, a lâmina lucida e a lâmina densa (LAW et al., 1993). No tecido tendíneo, não é observada presença de células precursoras do tendão, por outro lado, é presente uma grande quantidade de fibroblastos (tenócitos) próximo à JMT (CURZI et al., 2016).

O período de desenvolvimento da JMT é caracterizado por formação gradual e contínua em resposta às forças geradas pelas contrações musculares nos períodos embrionários finais e neonatais iniciais (BENJAMIN; RALPHS, 2000; YAMASHITA et al., 2007; KOSTROMINOVA et al., 2009; CIENA et al., 2012). O seu desenvolvimento ocorre por meio das ligações entre os músculos esqueléticos e os elementos da MEC (RODRIGUEZ-GUZMAN et al., 2007; TIDBALL; SALEM; ZERNICKE, 1993).

Em músculos compostos predominantemente por fibras lentas ou rápidas, a JMT possui características morfológicas diferentes, como apresentadas em peixes. Particularmente, fibras lentas e rápidas diferem no tipo de membrana junto às dobras presentes na JMT. Esta estrutura em fibras lentas tem interdigitações caracterizadas por sua grande extensão, enquanto fibras rápidas apresentam maior número de interdigitações, porém menores nos processos tendíneos (SPIERTS et al., 1996).

Em contrapartida, em um estudo com modelo de microgravidade, com redução da carga imposta aos músculos, é observado que isto produz diminuição considerável da interface entre o músculo-tendão de ratos, bem como um aumento do número de

ribossomos e mitocôndrias (TIDBALL et al., 1992; ZAMORA et al., 1995). Correlato acerca de indivíduos que apresentam amputação de membro inferior, a perda de massa muscular que evidencia a atrofia está acompanhada com a perda de contato entre o músculo e o tendão (DE PALMA et al., 2011).

Foram encontradas alterações na JMT do músculo esternocleidomastoideo de ratos *Wistar* idosos, e características de atrofia muscular, além de mudanças na disposição e formato das invaginações sarcoplasmáticas e conseqüentemente nas evaginações sarcoplasmáticas com aumento de depósito de colágeno nesta região (CIENA et al., 2012). Estas alterações morfológicas são semelhantes às encontradas por meio da análise das características ultra-estruturais da JMT do músculo pterigoideo medial, que evidencia um remodelamento dessa área com o envelhecimento, em que a membrana sarcoplasmática e fibras colágenas estão apresentadas com suas áreas de interface comprometidas, devido à inatividade muscular que é resultado da atrofia muscular, e presumivelmente podem contribuir com rigidez e lesões musculares (CIENA et al., 2010).

Conquanto, o aumento dos níveis de atividade físicas podem causar alterações nessas estruturas, como relata CURZI et al. (2012) em estudo que analisa as alterações na JMT de ratos submetidos à corrida de intensidade moderada em esteira. O exercício aeróbio induz ao aumento da quantidade de interdigitações, e aumento da área de contato entre o tendão e o músculo, portanto uma melhor resistência à tensão. Além disso, alterações morfológicas dos componentes da lâmina basal com exercício sugerem uma reorganização da arquitetura proteica presente na JMT, que pode assim adaptar-se às forças de cisalhamento, se necessário aumentando a quantidade de invaginações e evaginações, suas distribuições e estruturas, que também é constatado em estudo que seguiu um protocolo de exercício aeróbio moderado. Entre o músculo esquelético e tendão está presente uma lâmina basal que não é encontrada em ratos sedentários, ocorrendo uma alteração da síntese de proteínas como talina e vinculina, além de colágeno IV na JMT dos músculos gastrocnêmio e sóleo (CURZI et al., 2015).

Modificações na estrutura dos músculos-esqueléticos e na síntese de proteínas que estão restritas à JMT foram encontradas em um estudo que sugere que alterações dos níveis de atividade física podem gerar grandes e rápidas mudanças na massa muscular e também em alterações morfológicas na JMT. Isto ocorre similarmente em situações de diminuição de força da JMT que são funcionalmente importantes, o que

indica que fatores que regulam alterações da massa muscular também podem regular a complexidade estrutural da JMT, e mudanças na síntese de proteínas podem desencadear desenvolvimento de patologias neurológicas como a *distrofia muscular de Duchenne*. Mudanças rápidas na massa muscular que caracterizam a atrofia e evidenciam alterações na JMT ocorrem em diversas condições como doenças crônicas, envelhecimento, imobilização de membros, ou repouso prolongado devido a lesões ou trauma (WELSER et al., 2009).

São observadas mudanças da JMT de ratos durante suspensão de membro posterior e induzidos à atrofia muscular comparados com aqueles submetidos ao exercício aeróbio moderado. A JMT do músculo plantar quando submetida à um treinamento de *endurance* durante o protocolo de suspensão, revela uma morfologia similar à do grupo controle, demonstra o potencial do exercício aeróbio na prevenção dos efeitos da atrofia na JMT (CURZI et al., 2016).

O exercício aeróbio tem a capacidade de provocar alterações morfológicas na JMT, e a sua aplicabilidade em situações patológicas específicas confirma tanto seu caráter preventivo quanto de reabilitação (CURZI et al., 2016). Entretanto, as consequências da diminuição da área da JMT induzida pela atrofia pela via do desuso não estão claras na literatura, porém é coerente prever que uma maior área de contato e interação entre os tecidos permite uma maior transferência de força contrátil, e pode prevenir o trauma muscular e promover recuperação da sua funcionalidade. Compreender como a plasticidade da JMT está correlacionada com os diferentes tipos de fibra muscular, exercício físico como o treinamento aeróbio, pode contribuir para o esclarecimento da localização da lesão muscular neste nível, bem como ocorrem adaptações. Não há estudos que abordem o tempo necessário para induzir estas alterações, nem os tempos de imobilização e seus efeitos deletérios nesta estrutura.

## **2.4 Imobilização Articular**

Historicamente, por volta de 2700 a.C., no Egito, talas com tecidos ou mesmo fatias de papiro eram utilizadas para realizar a imobilização de membros fraturados, e assim facilitar a cicatrização óssea. No século XII, os acadêmicos da Escola Médica de Salerno (Itália) utilizavam bandagens de pano para imobilizar feridos. No século XX, durante a Primeira Guerra Mundial, existem relatos sobre a medicina na busca de

alternativas para se contrapor ao caos gerados pela guerra, principalmente devido à alta taxa de mortalidade associada à fraturas comunitivas de fêmur, resultando em mortes associadas à sepse. Diante desse cenário, o cirurgião ortopedista Robert Jones (1857-1933), membro do serviço médico britânico, instituiu a utilização de talas para imobilização imediata de fraturas, com o intuito de reduzir as lesões e a hemorragia consequentes ao movimento dos fragmentos ósseos instáveis. A partir desses protocolos de imobilização, que foram efetivos para redução de mortes em campos de batalha, bem como na recuperação após fraturas, foram estabelecidos serviços ortopédicos especializados para o tratamento de lesões do aparelho locomotor, bem como houve a necessidade de pesquisas nesta área (ORLANDO et al., 2016).

A imobilização de algum segmento corporal é muitas vezes indicada como forma de tratamento conservador de lesões musculoesqueléticas, quando não há indicação cirúrgica ou como medida auxiliar pós-cirúrgica. A imobilização articular é uma opção benéfica para os pacientes, pois diminui a dor, previne danos futuros e mantém a saúde de estruturas previamente lesadas. Entretanto, a manutenção da citoarquitetura do músculo esquelético requer uma mínima quantidade de carga repetitiva. Situações de hipocinesia como acamamento ou imobilização, podem conduzir a musculatura às alterações citoarquiteturais importantes, tais como atrofia induzida pelo desuso, redução da extensibilidade, da força e da resistência, resultando em aumento da fibrose intramuscular (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1983; KANNUS et al., 1998). É possível observar transtornos circulatórios e edema, em resposta à redução da densidade capilar (MCNULTY et al., 1992; KVIST et al., 1995), e também alterações nos ligamentos e aumento da rigidez articular (LOITZ et al., 1989). Modelos de desuso em trabalhos experimentais também observaram as alterações no músculo-esquelético quando submetido à imobilização gessada (AOKI et al., 2004; COUTINHO et al., 2002), desnervação, e transecção da medula espinal (ARRUDA et al., 2006; PATTERSON; STEPHENSON; STEPHENSON, 2006).

Os efeitos da imobilização na JMT após 3 semanas, demonstraram que a interface entre as células musculares e fibrilas colágenas foi reduzida em cerca de 50% em fibras tipo I e tipo II. Pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi identificado redução no comprimento das invaginações do músculo com predominância de fibras tipo I (como por exemplo o sóleo). Em contrapartida o músculo com fibras tipo II predominantes apresentou invaginações ainda mais curtas.



A lâmina basal ficou mais espessa durante o período de imobilização (KANNUS et al., 1992).

Alterações morfológicas geradas pela atrofia muscular em condição de microgravidade foram observadas em outro estudo pela suspensão da pata traseira de ratos, que observou também a região da JMT. No grupo sedentário longas e diversas interdigitações do tendão penetram no tecido muscular, paralelamente à orientação dos miofilamentos, enquanto que após a suspensão as invaginações e evaginações diminuíram em quantidade e se tornaram curtas. Perto da JMT, foram observados sarcômeros desalinhados, mitocôndrias e as tríades perdem sua localização natural. Desorganização de miofilamentos, distorção ou ausência de linhas Z são observáveis (CURZI et al., 2013).

Estudos sobre as alterações causadas na JMT submetida à modelos experimentais de atrofia muscular induzida pelo desuso com modelo de imobilização são escassas na literatura, o que demonstra a importância desse estudo para investigar as consequências da imobilização na JMT dos músculos sóleo e tibial anterior, o que poderá contribuir para esclarecer o que ocorre em nível morfológico e funcional nessa região, analisando os possíveis efeitos de um protocolo de reabilitação por natação.

## **2.5 Reabilitação Física - Natação**

Diferentes protocolos de reabilitação têm sido estudados na tentativa de reverter os danos provocados pela imobilização sobre os músculos esqueléticos. Dentre eles, o ultrassom terapêutico, estimulação elétrica neuromuscular (CUNHA et al., 2012), alongamento passivo (MENON et al., 2007; ROCHA et al., 2010), remobilização livre (POLIZELLO et al., 2011), e a natação (DEL CARLO et al., 2007, GALVÃO et al., 2006).

A reabilitação de disfunções músculo-esqueléticas pelo exercício aquático tem demonstrado ser efetiva, além de prevenir diversas patologias. Os efeitos desta intervenção são variados e dependentes de fatores extrínsecos como duração, tipo e intensidade do exercício de acordo com a especificidade do indivíduo. Em consequência desses fatores, apresentam-se diversos efeitos fisiológicos capazes de promover um reparo tecidual devido ao aumento da circulação periférica e

consequentemente um aumento no suprimento de nutrientes do músculo ativo (DEGANI, 1998; MEDEIROS et al., 2004).

Na natação, a resistência e carga impostas ao movimento são adequadas de acordo com a viscosidade da água, juntamente com as propriedades de flutuação do animal (SKINNER; THOMPSON, 1988). Além disso, a natação é um exercício físico que proporciona a redução do estresse sobre as articulações devido à pressão hidrostática, aumento da força muscular e redução da gordura corporal, e pode ser utilizado como instrumento terapêutico por seu caráter relaxante proporcionado pelo ambiente aquático e temperatura adequada da água, ocasiona desse modo o bem estar físico e mental, além de reduzir dores e edemas (CAMPION, 1990; BANZ et al., 2003; DEGANI, 1998).

### 3 JUSTIFICATIVA

A JMT é uma interface entre o músculo e o tendão delimitada pelo sarcolema, é a principal área responsável pela transmissão de força, e conseqüentemente com maior suscetibilidade à lesões desportivas do aparelho locomotor. A imobilização de um segmento é utilizada clinicamente no tratamento de lesões musculares, tendíneas, ligamentares, osteo-articulares que acarreta em atrofia das células musculares seguido por fibrose intramuscular, perda de extensibilidade e contractilidade, conseqüentemente diminuição na geração de transmissão da força muscular. Estudos experimentais de atrofia induzida pelo desuso utilizaram-se de modelos de microgravidade, amputação de membros, envelhecimento, e imobilização de segmentos articulares, que acarretaram em alterações morfo-funcionais. No entanto, não são conhecidas as adaptações morfológicas e funcionais que acometem a JMT em decorrência da imobilização articular, o que é de extrema importância mediante as possíveis alterações que podem ocorrer nesta área, pois é a principal área anatômica do aparelho locomotor e, além disso, a região com maior predisposição a lesões. Dentre as modalidades terapêuticas mais indicadas na reabilitação e tratamento de lesões, o exercício físico é muito utilizado, porém nota-se a ausência deste para amenizar os efeitos deletérios potencializados e associados à atrofia muscular induzida pelo desuso. Portanto, os resultados desse projeto têm por finalidade descrever os efeitos deletérios ocasionados pela imobilização articular na JMT, e contribuir na reabilitação após imobilização articular por exercício mediante a um protocolo de natação, com a hipótese de que este promoverá benefícios como o aumento da área de contato e eficácia para uma melhor funcionalidade músculo esquelética reestabelecendo os padrões de origem da JMT.

## 4 OBJETIVO GERAL

O presente estudo consistiu em analisar as possíveis alterações das características morfológicas na junção miotendínea do tibial anterior e sóleo de ratos *Wistar* adultos submetidos à imobilização e remobilização por protocolo de natação.

### 4.1 Objetivos Específicos

- ✓ Descrever os aspectos estruturais da JMT, empregando os métodos de Microscopia de luz; através das colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picro-sírius;
- ✓ Diferenciar os tipos de fibras musculares e realizar análises morfométricas da área de secção transversal, através da ATPase miofibrilar;
- ✓ Caracterizar os aspectos ultraestruturais dos feixes das células musculares e feixes de miofilamentos;
- ✓ Descrever as características ultraestruturais da JMT, empregando o método de microscopia eletrônica de transmissão;
- ✓ Mensurar os comprimentos do penúltimo e último sarcômeros na área da JMT, e descrever a disposição e organização das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas;
- ✓ Mensurar os comprimentos e espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas.

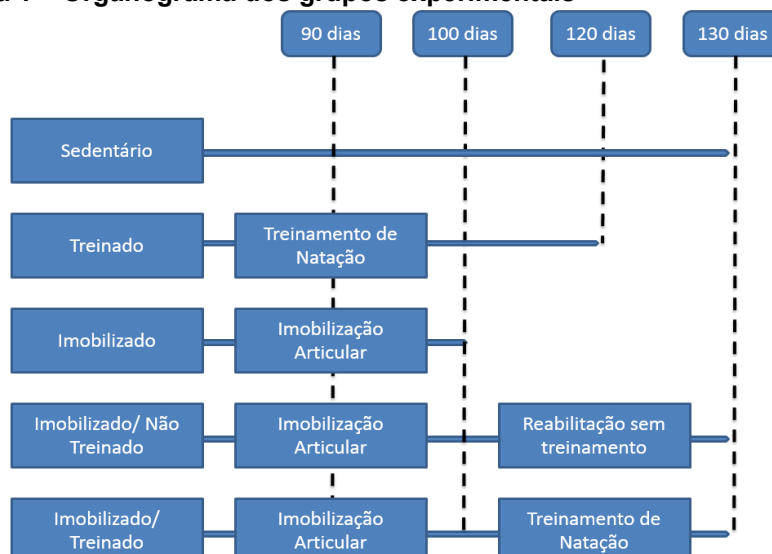
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados 35 ratos *Wistar* machos adultos, com idade de 90 dias, alocados em 5 diferentes Grupos (n=7), sendo que todos os grupos começaram o seu protocolo respectivo com 90 dias:

- ✓ **Grupo Sedentário:** animais não submetidos à imobilização e ao treinamento de natação – eutanásia com 90 dias;
- ✓ **Grupo Treinado:** animais submetidos ao treinamento de natação por 30 dias – eutanásia com 120 dias;
- ✓ **Grupo Imobilizado:** animais submetidos à imobilização por 10 dias – eutanásia com 100 dias;
- ✓ **Grupo Imobilizado/Não Treinado:** animais submetidos à imobilização por 10 dias e remobilização não treinado - sem treinamento após imobilização por 30 dias – eutanásia com 130 dias;
- ✓ **Grupo Imobilizado/Treinado:** animais submetidos à imobilização por 10 dias e remobilização - treinamento de natação por 30 dias – eutanásia com 130 dias;

Figura 1 – Organograma dos grupos experimentais



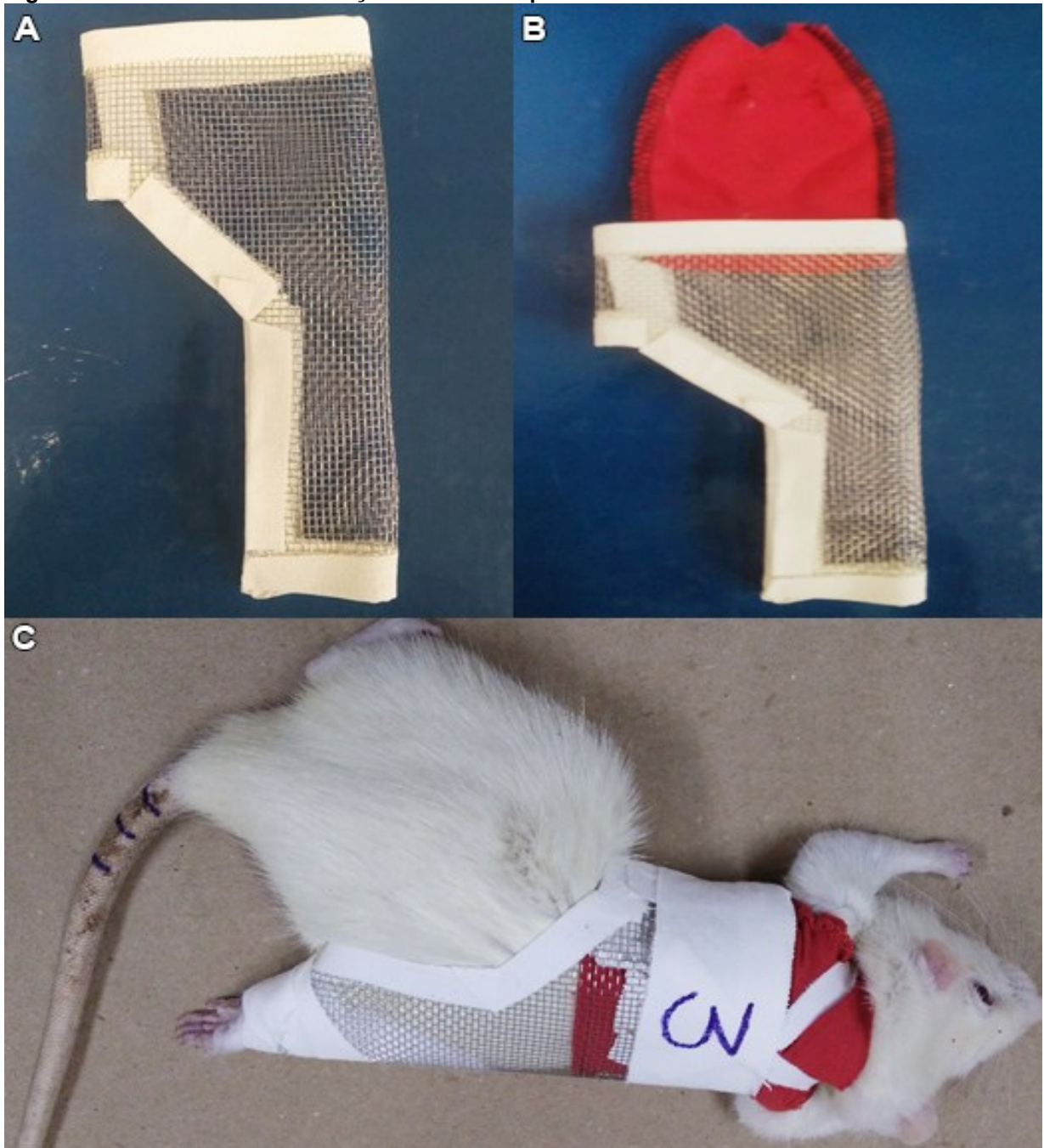
Fonte: Elaborado pelo autor

Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu – SP. Os animais permaneceram alojados em gaiolas coletivas no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Rio Claro. Os animais receberam ração balanceada padrão (Purina®) e água “*ad libitum*” via bebedouro, alocados 5 animais por gaiola, com temperatura ambiente controlada  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , mantidos em foto período claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Rio Claro – SP (nº 3132).

## **5.2 Imobilização Articular - Protocolo**

Os animais dos Grupos Imobilizado, Imobilizado/Não Treinado e Imobilizado/Treinado foram previamente anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg) intraperitoneal, e imobilizados na articulação tíbio-társica em flexão plantar máxima, com auxílio de fita adesiva. O modelo de imobilização do membro posterior direito foi realizado de acordo com o modelo de Coutinho et al. (2002). Este procedimento é constituído por duas partes: parte superior, similar a uma camiseta de algodão, que permite o animal movimentar livremente a cabeça e os membros superiores; e o dispositivo de imobilização, que é colocado no corpo e no membro inferior direito do animal, dividida em face dorsal e rostral, composta por uma malha de aço inoxidável com suas bordas envolvidas com fita adesiva para prevenir lesões no corpo do animal. A face rostral do dispositivo de imobilização é revestida de algodão, bem com a dorsal, e foram unidas internamente por meio de esparadrapo. Para manter a qualidade e a posição do dispositivo, uma faixa de esparadrapo foi fixado em torno do abdome do animal entre a camiseta e a malha de aço inoxidável. Além disso, duas tiras de 0,5 cm foram colocadas na parte superior de ambos os ombros para atuarem como suspensórios. Anteriormente à aplicação da técnica de imobilização nos animais dos grupos que passariam pelo treinamento de natação, estes foram submetidos a um processo de adaptação ao meio líquido.

Figura 2 - Protocolo de imobilização do membro posterior direito.



Fonte: Elaborado pelo autor. **(A)** A parte inferior, de malha de aço inoxidável revestido com fita adesiva (13cmX8cm). **(B)** Parte superior (suspensório) e dispositivo de imobilização. **(C)** Suspensório e o dispositivo de imobilização.

### **5.3 Reabilitação Física - Protocolo De Natação**

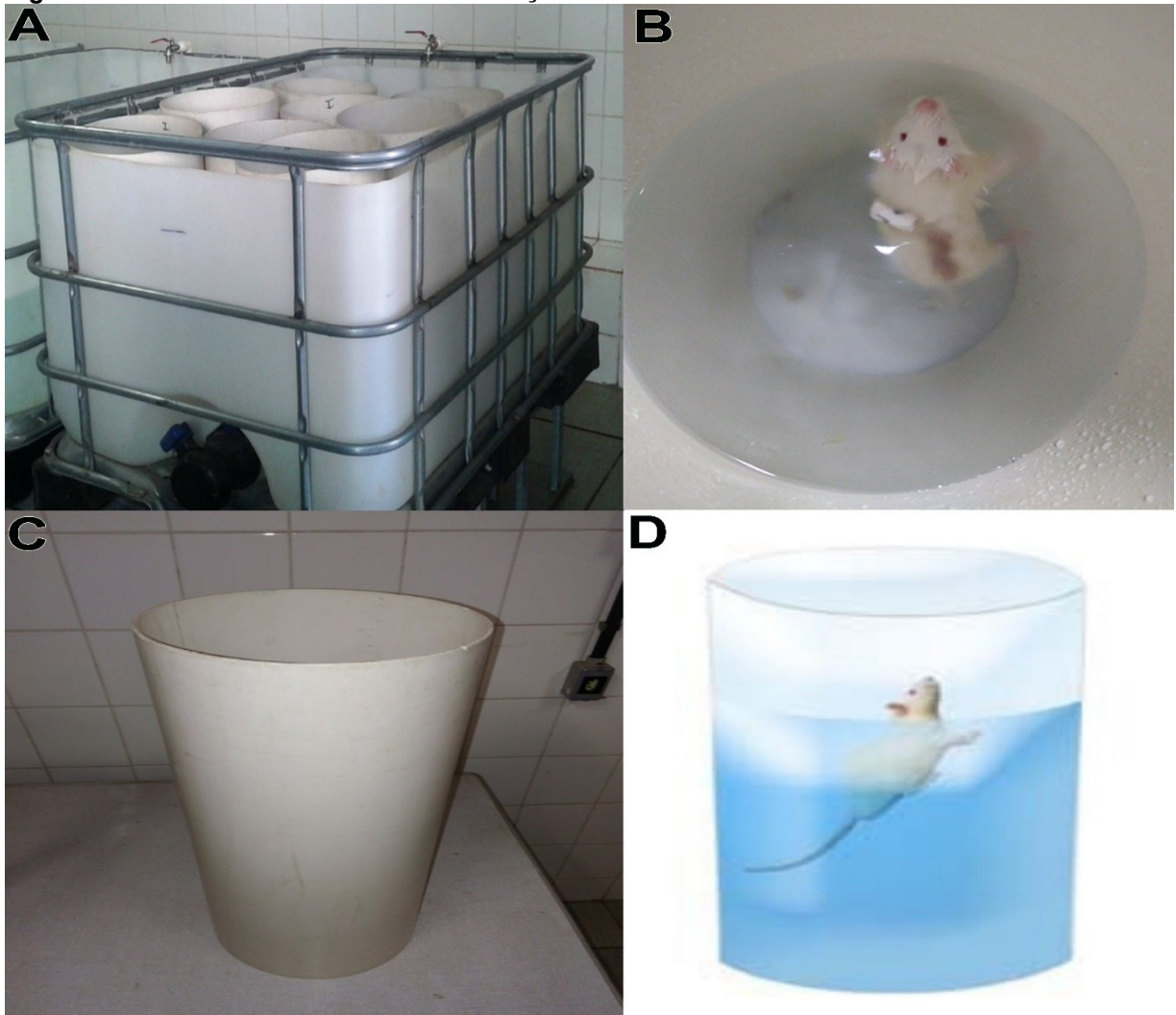
Foram submetidos ao protocolo de treinamento de natação os animais dos Grupos Treinado e Imobilizado/Treinado. O treinamento ocorreu em tanques retangulares durante 60 minutos, para que não houvesse aglomeração e dispersão, separados individualmente por tubos cilíndricos (24X50mm) com 60cm de comprimento, imersos à 40 cm em água aquecida a 31°C (PESTANA et al., 2012). Foram utilizados pesos de chumbo para evitar que os animais boiassem.

Previamente ao protocolo de natação ocorreu a Adaptação dos Grupos que seriam submetidos ao protocolo. A adaptação ocorreu individualmente em tubos cilíndricos com (24X50mm) cm de comprimento, imersos à 40 cm de água aquecida a 31°C. Os animais foram colocados neste tanque permanecendo 15 minutos/dia, sendo aumentado o tempo em 5 minutos por sessão, por 10 dias consecutivos. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do exercício físico.

Para o treinamento foram realizadas 5 sessões semanais de 60 minutos, durante 4 semanas, no total de 20 sessões de treinamento (CIABATTARI; DAL PAI e DAL PAI, 2005).



**Figura 3 – Protocolo de treinamento – natação.**



Fonte: Elaborado pelo autor. **(A)** Centro de treinamento com os tanques utilizados. **(B)** Execução do protocolo de treinamento. **(C)** Tubo de PVC utilizado para individualização. **(D)** Ilustração do protocolo de treinamento.

#### 5.4 Massa Corporal

A massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente em uma balança semi-analítica (Marte LC1). Foram selecionados 3 períodos: 1º período, inicial; 2º período, pós imobilização, que antecedeu o início do protocolo de treinamento; 3º período, final, ao término do protocolo de treinamento. Para a obtenção das médias e desvio padrão dos 3 períodos foi utilizado o programa Microsoft Office Excel, e realizado o tratamento estatístico através da análise de variância ANOVA two way, pós teste de Bonferroni com auxílio do software Graph Pad 5.0, o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 5.5 Microscopia de Luz

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, eutanasiados (overdose de anestésico – Ketamina 100mg/Kg, via intraperitoneal). Em seguida foram dissecadas amostras do ventre muscular e da junção miotendínea do sóleo e tibial anterior, criofixados em nitrogênio líquido, através da alocação das amostras sobre a superfície de cortiça estabilizadas com cola biológica e untadas em talco neutro (Tragacanth, SIGMA) para prevenir artefatos, e em seguida armazenadas no Freezer -80°C. Foram realizados cortes longitudinais (JMT) e transversais (ventre muscular) de 10 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM), ambos os cortes corados com a coloração de Hematoxilina-Eosina para destaque dos componentes celulares e Picro-sírius para identificação do tecido conjuntivo associado (JUNQUEIRA; BIGNOLAS e BRENTANI, 1979). A aquisição das imagens foi obtida através do microscópio de luz (Carl Zeiss Microimaging, Axiokop 40, Göttingen, Germany).

### 5.5.1 ATPase Miofibrilar

As amostras do sóleo e tibial anterior (ventres musculares) foram devidamente posicionadas e realizadas cortes transversais de 10 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM), os cortes histológicos foram então incubados durante 30 min a 37°C em solução contendo 10mg de ATP dissolvidos em 2 gotas de água destilada adicionadas em conjunto com 10ml de glicina / tampão NaCl, CaCl<sub>2</sub> atingindo o pH 9,4 adicionado com DDT. Os cortes foram lavados em água destilada e incubados por 2 minutos em cloreto de cobalto a 2% o processo de lavagem e incubação repetido 3 vezes. Em seguida uma nova lavagem das amostras em água destilada e o procedimento de desidratação em séries ascendentes de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%) e finalizar em passagem no xilol. Para o método de pH 9,4, as seções foram pré incubadas em solução tampão de acetato de sódio 0,1M com EDTA 10 mM durante 10 minutos a 4°C, as amostras foram posteriormente lavadas com água destilada e incubadas durante 2 minutos em 2% cloreto de cobalto processo este repetido 3 vezes. Mais uma vez as amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas em séries ascendentes de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%), finalizado

com xilol antes da montagem das lâminulas com Entellan® (KRAUSE et al., 2017). A aquisição das imagens foi obtida através do microscópio de luz (Carl Zeiss Microimaging, Axiokop 40, Göttingen, Germany).

## 5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados 2 animais de cada grupo experimental. Os animais foram anestesiados com Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, perfundidos com a solução fixadora de *Karnovsky* modificada contendo glutaraldeído à 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio à 0,1M e pH= 7,3 (WATANABE; YAMADA, 1983; DURO et. al., 2012). As junções miotendíneas do sóleo e tibial anterior foram dissecadas e fixadas na mesma solução durante 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas com a solução de tampão fosfato de sódio e pós-fixadas com a solução de tetróxido de ósmio à 1% durante 2 horas à 4°C. Foram incluídas em resina Spurr® e posteriormente, foram obtidos cortes ultrafinos de 90 nanômetros, coletados em telas de cobre de 200 “mesh” (Sigma®) e contrastados com a solução de acetato de uranila à 4%, por 3 minutos (BOLINA et al., 2013) e com a solução aquosa de citrato de chumbo à 0,4% por 3 minutos, lavando em seguida com água destilada (CIENA et al., 2012). As telas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol, 1010, NAP/MEPA-ESALQ, USP, Piracicaba-SP.

## 5.7 Análise Morfométrica

Para análise morfométrica foram mensuradas as áreas de secção transversa das fibras musculares tipo I e tipo II obtidas pelo método de ATPase. Também serão analisadas as imagens obtidas pela MET, e serão mensuradas as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, além dos sarcômeros proximais e distais à JMT. Para obtenção dos dados será utilizado o software ImageJ®. Após definir o tamanho da barra em pixels com a ferramenta “Straight Line”, será determinada a escala da imagem na opção “Analyze” posteriormente “Set Escale” e então será substituído o valor na caixa “Know Distance” para o valor na barra, unidade de escala em nm “Unit

of Length” (SIERRA et al., 2018).

## **5.8 Análise Estatística**

Após obtidas as mensurações, foram realizadas as médias e desvio padrão com o software Excel™ e realizado o tratamento estatístico através do software Graph Pad Prism 5.0. Todos os dados foram paramétricos, desta maneira, para verificar a diferença entre os grupos foi realizada a análise de variância ANOVA Two-Way com pós teste de BonFerroni. Foram consideradas diferenças significantes para  $p \leq 0,05$ . Esta análise também será utilizada para os dados dos sarcômeros distais e proximais, além das invaginações e evaginações. Será realizado o tamanho do efeito utilizado para mensurar a magnitude das diferenças, e incluído o valor de d de Cohen para cada comparação obtida. Para resultados entre 0,5 e 0,25 a magnitude é pequena, entre 0,8 e 0,5 é média, e acima de 0,8 é grande (QUINTANA, 2017).

## 6 RESULTADOS

Os resultados parciais dos métodos de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão foram descritos nos tópicos a seguir, bem como as estatísticas da massa corporal e das medidas das áreas das fibras musculares de todos os grupos experimentais.

### 6.1 Massa Corporal

Os resultados da mensuração da massa corpórea dos animais estão representados respectivamente na Tabela 1.

**Tabela 1.** Média e desvio Padrão da massa corporal (g) dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T em períodos distintos ( $p < 0,05$ ) \*I/NT  $\neq$  I/T; # S  $\neq$  I, I/NT, I/T; e ( $p < 0,001$ )  $\infty$  T  $\neq$  I/NT.

#### MASSA CORPORAL

GRUPOS	PERÍODOS		
	1°	2°	3°
<b>Sedentário</b>	398.16±35.88	406.00±31.4 #	
<b>Treinado</b>	325.00±15.97		367.07±20.13 $\infty$
<b>Imobilizado</b>	377.61±39.25	309±33,98	
<b>Imobilizado/ Não Treinado</b>	398.72±29.14	344.27±27.37	442.55±33.14 *
<b>Imobilizado/ Treinado</b>	402.38±35.03	341.23±32.91	401.53±35.51

Fonte: Dados da pesquisa

A tabela 1 apresenta as médias e desvio padrão da massa corporal dos 5 grupos em 3 períodos específicos; primeiro período (pré imobilização), segundo período (pós imobilização e pré treinamento) e terceiro período (final – pós treinamento ou não treinado). Foi possível estabelecer diferenças entre as massas corporais dos grupos em cada período. No Grupo S não houve diferença da massa corporal no 1° e 2° períodos, o que mostra a sua eficácia como grupo controle

na relação de futuros parâmetros; No Grupo T observa-se uma disparidade entre o 1º e 3º períodos nas médias de massa corporal, houve um aumento de 12,94% respectivamente; No Grupo I observa-se uma redução nos valores de massa corporal entre o 1º e 2º períodos de 18,16% devido à realização do processo de imobilização articular; No Grupo I/NT observa-se uma redução nos valores de massa corporal entre o 1º e 2º períodos de 13,65% devido à realização do processo de imobilização articular, e entre o 2º e 3º períodos houve aumento de 22,20%, enquanto que entre o 1º e o 3º períodos houve um aumento de 10,99%; No Grupo I/T observa-se uma redução nos valores de massa corporal entre o 1º e 2º períodos de 15,19%, enquanto que entre o 2º e o 3º houve um aumento de 15,01% da massa corporal. No terceiro período o Grupo I/T apresenta massa corporal 10,21% menor em comparação com o grupo I/NT. No primeiro período não houve diferença estatística entre os grupos. No segundo período (pós imobilização e pré treinamento) foi observado diferença estatística, pois houve um decréscimo da massa corporal nos Grupos I, I/NT e I/T em relação ao Grupo S. No terceiro período (final – pós treinamento ou livre) houve diferença estatística na massa corporal entre os Grupos T e I/NT, em que o grupo T apresentou menor valor, e entre os Grupos I/NT e I/T, em que o grupo I/T também apresentou menor valor.

## **6.2 Microscopia de Luz**

As descrições morfológicas do ventre muscular e junção miotendínea dos músculos: tibial anterior e sóleo foram descritas nos tópicos a seguir.

### **6.2.1 Músculo - Tibial Anterior**

O ventre muscular do músculo tibial anterior das amostras dos 5 Grupos, Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado/ Não Treinado (I/NT), Imobilizado/Treinado (I/T) foi descrito a seguir.

No Grupo S (Fig.4A) foi observado o perímio delgado envolvendo as fibras musculares, e tenócitos no endomíio. No Grupo S (Fig.4F) foi observado o perímio delgado alaranjado envolvendo as fibras musculares na tonalidade amarelada.

No Grupo T (Fig.4B) foi notado o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares, envolvendo as fibras musculares. Foi observado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo T (Fig.4G) foi observado o perimísio alaranjado, e este envolvendo as fibras musculares na tonalidade amarelada.

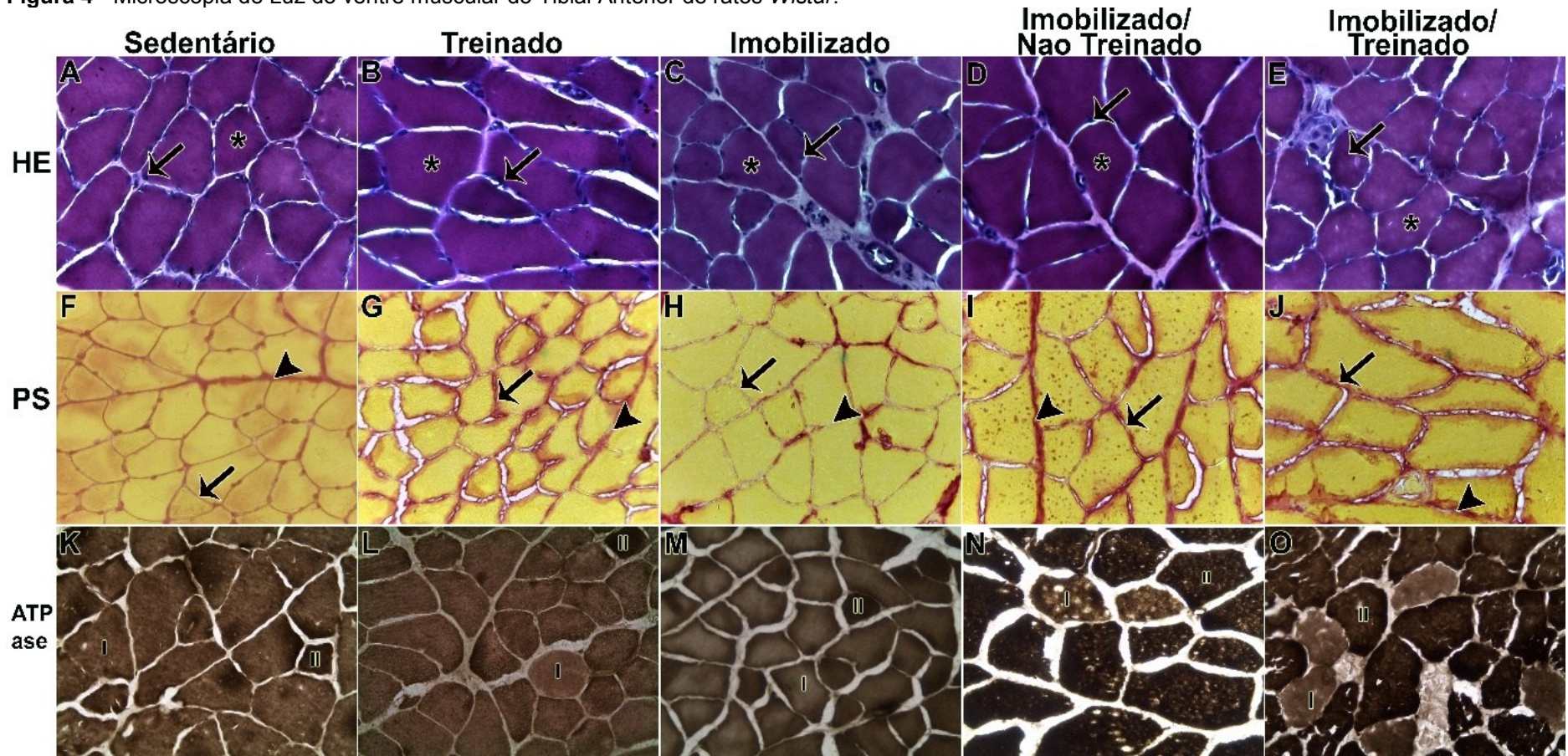
No Grupo I (Fig.4C) foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares, capilares e macrófagos, e este envolvendo as fibras musculares que apresentaram sinais de atrofia devido ao tamanho reduzido de suas áreas. Foi observado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo I (Fig.4H) foi observado o perimísio espesso alaranjado, com ampla área de tecido conjuntivo, e este envolvendo as fibras musculares amareladas.

No Grupo I/NT (Fig.4D) foi observado o perimísio espesso, além da presença de macrófagos, e o perimísio envolvendo as fibras musculares. Foi constatado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo I/NT (Fig.4I) o perimísio na tonalidade alaranjada e espesso pelo aumento no tecido conjuntivo, além da presença de macrófagos, e o perimísio envolvendo as fibras musculares.

No Grupo I/T (Fig.4E) foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares e macrófagos, e o perimísio envolvendo as fibras musculares. Foi observado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo I/T (Fig.4J) foi notado o perimísio alaranjado, e o perimísio envolvendo as fibras musculares.



Figura 4 - Microscopia de Luz do ventre muscular do Tibial Anterior de ratos *Wistar*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Revelam os feixes de fibras musculares (\*), com os respectivos núcleos celulares (seta). Figs. A, B, C, D e E (Coloração: HE). Notam-se o arranjo dos feixes de fibras colágenas - Perimísio (cabeça de seta) e endomísio (seta) Figs. F, G, H, I e J (Coloração: PS). Diferenciação dos diferentes Tipos de Fibras musculares -Tipo I (I) e II (II) Figs. K, L, M, N e O (ATP-ase miofibrilar). No Grupo S (Fig.4A) foi observado o perimísio delgado envolvendo as fibras musculares, e tenócitos no endomísio. No Grupo T (Fig.4B) foi notado o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares, envolvendo as fibras musculares. No Grupo I (Fig.4C) foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares, capilares e macrófagos, e este envolvendo as fibras musculares que apresentaram sinais de atrofia devido ao tamanho reduzido de suas áreas. No Grupo I/NT (Fig.4D) foi observado o perimísio espesso, além da presença de macrófagos, e o perimísio envolvendo as fibras musculares. No Grupo I/NT (Fig.4D) foi observado o perimísio espesso, além da presença de macrófagos, e o perimísio envolvendo as fibras musculares. Ampliação 400X.



Os cortes histológicos longitudinais evidenciaram a região de interface entre as fibras musculares e os feixes de fibras do tecido tendíneo, conhecida como junçãomiotendínea.

No Grupo Sedentário (Fig.5A), no tecido tendíneo foi evidenciado a presença de tenócitos com formatos oval e fusiforme e ampla área de fibras colágenas na extremidade do tendão, onde faz a interface com o tecido muscular, região da JMT. Nesta região foram revelados a presença de núcleos centralizados de células das fibras musculares com formato fusiforme. Foram evidenciados na região distal das fibras musculares núcleos celulares periféricamente, bem como dispostos paralelamente, apresentando também formato fusiforme.

No Grupo Sedentário (Fig.5F), foram notadas fibras colágenas do tecido tendíneo dispostas lateral e desordenadamente em relação ao tecido muscular, na região da JMT.

No Grupo Treinado (Fig.5B), no tecido tendíneo foram revelados a presença de alta densidade de tenócitos com formatos fusiformes distribuídos e organizados. Foram observados ampla área de tecido colágeno na região em que o tecido tendíneo faz contato com as fibras do tecido muscular na JMT, além de maior presença de núcleos centralizados com formato oval e fusiforme dispostos paralelamente ao eixo longitudinal da fibra muscular. Foram evidenciados na região distal das fibras musculares núcleos celulares presentes em sua periferia e também alguns nas fibras musculares com formato fusiforme.

No Grupo Treinado (Fig.5G), as fibras colágenas do tecido tendíneo provenientes da matriz extracelular foram apresentadas com projeções alongadas em relação às fibras do tecido muscular na interface destes, conhecida como JMT. Foram observadas estas projeções de forma ordenada lateralmente. O tecido muscular foi observado com as fibras musculares distais mais organizadas, e foram observados núcleos com formato fusiforme nesta região, marcados na cor alaranjada.

No Grupo Imobilizado (Fig.5C), foi apontado grande quantidade de fibras colágenas e tecido conjuntivo, pela maior projeção do tecido tendíneo em relação às fibras do tecido muscular. Na interface entre as fibras do tecido tendíneo e as fibras do tecido muscular, na JMT, foram notados numerosos núcleos centralizados com formato oval. No tecido muscular foram observados núcleos com formato fusiforme intercalados periféricamente na região distal das fibras do tecido muscular, e núcleos com formato oval presentes nas fibras musculares. No Grupo Imobilizado (Fig.5H),

foram observados ampla área de tecido conjuntivo no tecido tendíneo, que projetou-se em relação ao tecido muscular desordenada e lateralmente. Também foram notadas nas fibras musculares o depósito de tecido conjuntivo.

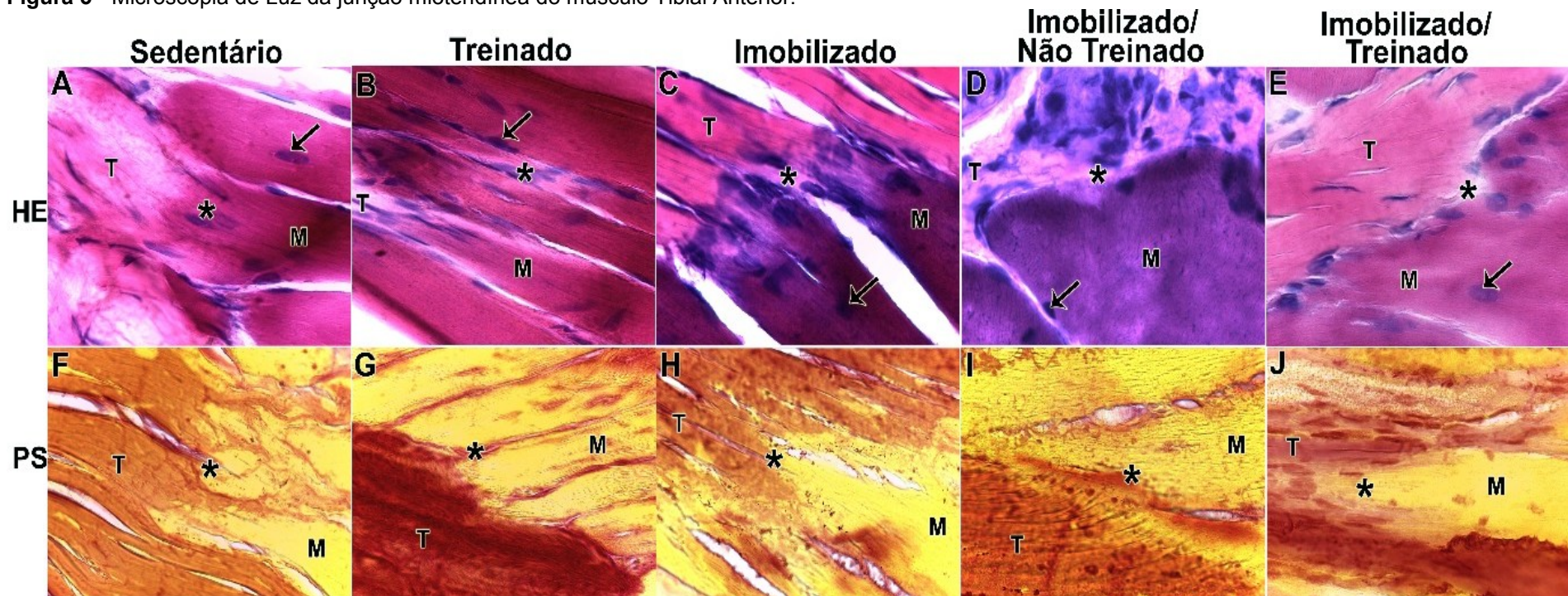
No Grupo Imobilizado/ Não Treinado (Fig.5D), foram evidenciados no tecido tendíneo ampla área de fibras colágenas e tecido conjuntivo, além da presença de núcleos com formato oval, conhecidos como tenócitos. Na área de interface com o tecido muscular, na região da JMT, foram observados núcleos centralizados com formato oval. Foram evidenciados na região distal das fibras musculares núcleos celulares periféricamente, apresentando formato fusiforme.

No Grupo Imobilizado/Não Treinado (Fig.5I) foi observado ampla área de tecido conjuntivo no tecido tendíneo, que projetou-se em relação ao tecido muscular desordenado e lateralmente.

No Grupo Imobilizado/ Treinado (Fig.5E), foram observados a presença no tecido tendíneo de tenócitos com formato fusiforme. Na região de interface entre o tecido tendíneo e o tecido muscular, região da JMT foram verificados núcleos centralizados com formato oval e fusiforme. Foram evidenciados núcleos celulares intercalados periféricamente na região distal das fibras musculares, com formato fusiforme, e também núcleos com formato oval.

No Grupo Imobilizado/ Treinado (Fig.5J) as fibras colágenas do tecido tendíneo foram apresentados com maiores projeções em relação às fibras do tecido muscular na interface destes, na região da JMT. Foram observadas estas projeções de forma ordenada lateralmente. Nesta região da JMT, observam-se a presença de numerosos núcleos com formato fusiforme, na tonalidade alaranjada. Foram observados no tecido muscular fibras musculares organizadas, e a presença de núcleos com formato fusiforme e tonalidade alaranjada nas fibras do tecido muscular.

**Figura 5** - Microscopia de Luz da junção miotendínea do músculo Tibial Anterior.



Fonte: Elaborado pelo autor. A região da junção miotendínea (\*) apresenta a interface entre o tecido muscular (M) e as fibras do tendão (T). Os núcleos estão localizados na região da JMT (Seta). No Grupo Sedentário (Fig.5A), no tecido tendíneo foi evidenciado a presença de tenócitos com formatos oval e fusiforme e ampla área de fibras colágenas na extremidade do tendão. No Grupo Treinado (Fig.5B), no tecido tendíneo foram revelados a presença de alta densidade de tenócitos com formatos fusiformes distribuídos e organizados. No Grupo Imobilizado (Fig.5C), foi apontado grande quantidade de fibras colágenas e tecido conjuntivo. No Grupo Imobilizado/ Não Treinado (Fig.5D), foram evidenciados no tecido tendíneo ampla área de fibras colágenas e tecido conjuntivo, além da presença de núcleos com formato oval. No Grupo Imobilizado/ Treinado (Fig.5E), foram observados a presença no tecido tendíneo de tenócitos com formato fusiforme. Na região de interface entre o tecido tendíneo e o tecido muscular, região da JMT foram verificados núcleos centralizados. Ampliação 400X.

### 6.2.2 Músculo - Sóleo

O ventre muscular das amostras do músculo sóleo dos 5 Grupos, Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado/Treinado (I/T) e Imobilizado/Não Treinado (I/NT) foi descrito a seguir.

No Grupo S (Fig.6A) foi observado o perimísio delgado envolvendo as fibras musculares, e tenócitos no endomísio, além da presença de macrófagos. No Grupo S (Fig.6F) foi observado o perimísio delgado alaranjado envolvendo as fibras musculares na tonalidade amarelada.

No Grupo T (Fig.6B) foi demonstrado o perimísio espesso com a presença de fusos extracelulares, envolvendo as fibras musculares. Foi observado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo T (Fig.6G) foi observado o perimísio alaranjado, e este envolvendo as fibras musculares na tonalidade amarelada.

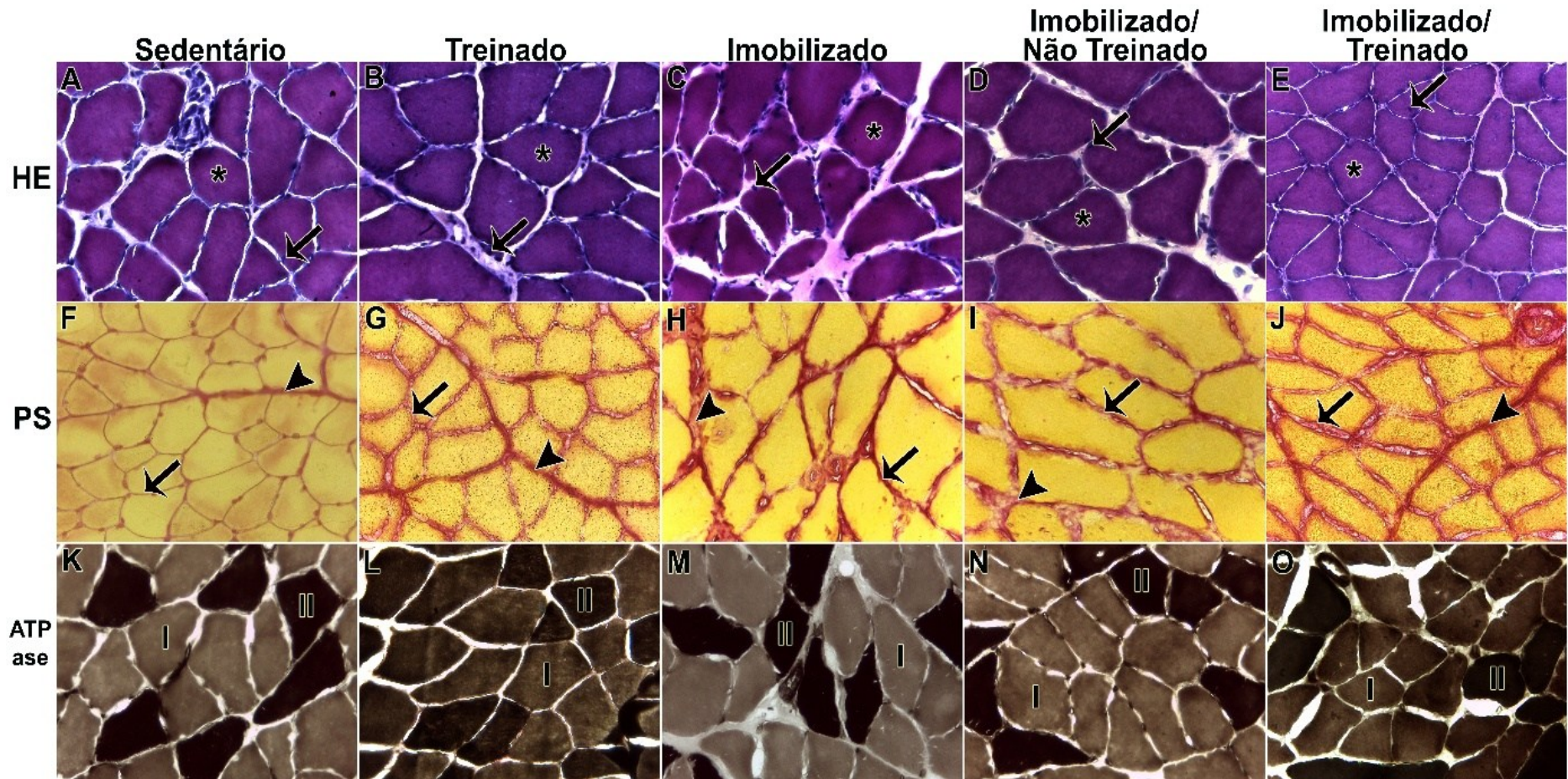
No Grupo I (Fig.6C) foi revelado no perimísio a presença de tecido conjuntivo, e de fusos extracelulares, e este envolvendo as fibras musculares que apresentaram sinais de atrofia devido ao tamanho reduzido de suas áreas. Foi observado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo I (Fig.6H) foi observado o perimísio espesso alaranjado, com ampla área de tecido conjuntivo e a presença de macrófagos, e este envolvendo as fibras musculares amareladas.

No Grupo I/NT (Fig.6D) foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de tecido conjuntivo, e este envolvendo as fibras musculares. Foi observado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo I/NT (Fig.6I) foi notado o perimísio na tonalidade alaranjada e espesso pelo aumento de tecido conjuntivo, além da presença de macrófagos, e o perimísio envolvendo as fibras musculares.

No Grupo I/T (Fig.6E) foi revelado o perimísio envolvendo as fibras musculares. Foi observado no endomísio a presença de tenócitos. No Grupo I/T (Fig.6J) foi apontado o perimísio alaranjado, e o perimísio envolvendo as fibras musculares.



Figura 6 - Microscopia de Luz do ventre muscular do Sóleo de ratos *Wistar*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Revelam os feixes de fibras musculares (\*), com os respectivos núcleos celulares (seta). Figs. A, B, C, D e E (Coloração: HE). Notam-se o arranjo dos feixes de fibras colágenas - Perimísio (cabeça de seta) e endomísio (seta) Figs. F, G, H, I e J (Coloração: PS). Diferenciação dos diferentes Tipos de Fibras musculares -Tipo I (I) e II (II) Figs. K, L, M, N e O (ATP-ase miofibrilar). Ampliação: 400X. No Grupo S (Fig. 6A) foi observado o perimísio delgado envolvendo as fibras musculares, e tenócitos no endomísio, além da presença de macrófagos. No Grupo T (Fig. 6B) foi demonstrado o perimísio espesso com a presença de fusos extracelulares, envolvendo as fibras musculares. No Grupo I (Fig. 6C) foi revelado no perimísio a presença do tecido conjuntivo, e de fusos extracelulares, e este envolvendo as fibras musculares. No Grupo I/NT (Fig. 6D) foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de tecido conjuntivo. No Grupo I/T (Fig. 6E) foi evidenciado o perimísio envolvendo as fibras musculares.

Nas amostras da junção miotendínea do músculo sóleo através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) foi evidenciada a região de interface entre as fibras do tecido muscular e as fibras do tecido tendíneo. As amostras foram coradas pela coloração de Picro-Sírius destacando-se os componentes do tecido conjuntivo com tonalidade vermelho alaranjada, e do tecido muscular.

No Grupo S (Fig. 7A) foram evidenciados os componentes celulares na região da JMT, foram notadas as comunicações celulares através de projeções entre feixes das fibras tendíneas e musculares com a presença de tenócitos com formato fusiforme ao longo do eixo longitudinal da junção. No Grupo S (Fig.7F), as extremidades das fibras tendíneas demonstraram formato arredondado e paralelo, com projeções lateralmente às fibras musculares na tonalidade amarelado.

No Grupo T (Fig.7B) foram observados o aumento da projeção das fibras tendíneas em relação às fibras do tecido muscular, que percorreram o endomísio e projetaram-se lateralmente em relação às fibras. Foram evidenciadas ampla área com tenócitos apresentando formato fusiforme presentes nas fibras do tecido tendíneo, e principalmente na região de interface com o tecido muscular, na região da JMT. Foram evidenciados na região distal das fibras musculares núcleos celulares periféricamente. No Grupo T (Fig.7G), foram notadas as fibras do tecido tendíneo projetadas lateralmente às fibras musculares, com um aumento do tamanho dessas projeções.

No Grupo I (Fig.7C) foram observados ampla área de tecido conjuntivo presente no tecido tendíneo e a presença de tenócitos com formatos oval e fusiforme, principalmente na região de interface com o tecido muscular, na JMT. Periféricamente às fibras distais do tecido muscular foram notados núcleos com formato fusiforme, e entre as fibras musculares estão presentes núcleos com formato oval. No Grupo I (Fig.7H), foram observadas ampla área de tecido conjuntivo e pequenas projeções na interface com as fibras do tecido muscular, na JMT.

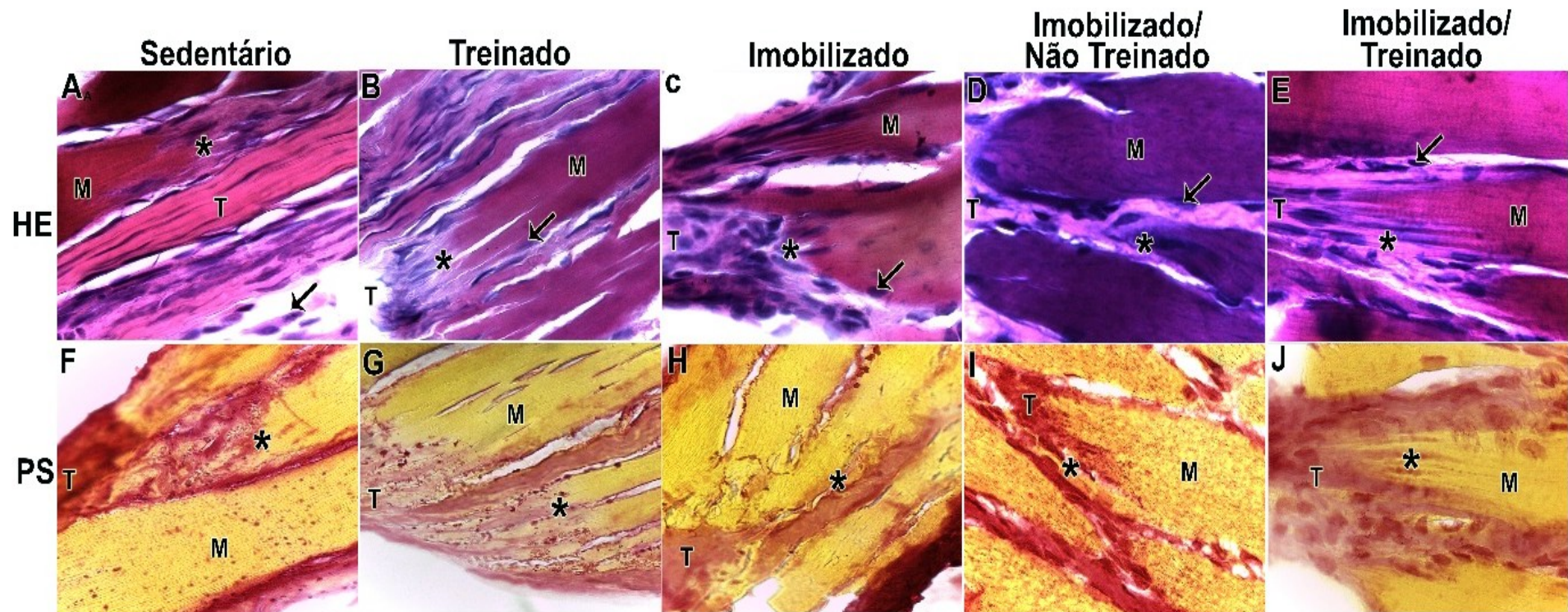
No Grupo I/NT (Fig.7D) foram apontados ampla área de tecido conjuntivo nas fibras tendíneas, além de tenócitos. Entre as fibras do tecido muscular, no endomísio, foi notada ampla área de tecido conjuntivo. No Grupo I/NT (Fig.7I), foram observados maiores projeções das fibras do tecido tendíneo em relação às fibras musculares, na interface conhecida como JMT. Foram constatados a presença de núcleos celulares na região da JMT.

No Grupo I/T (Fig.7E) foi observado o aumento da projeção das fibras tendíneas em relação às fibras do tecido muscular, que percorreram o endomísio e

projetaram-se lateralmente em relação às fibras. Foram observados tenócitos com formato fusiforme e oval presentes nas fibras do tecido tendíneo, e principalmente na região de interface com o tecido muscular, na região da JMT. Foram observados lateralmente às fibras musculares núcleos celulares dispostos intercalados. No Grupo I/T (Fig.7J), foram notadas amplas projeções das fibras do tecido tendíneo em relação às fibras musculares, na região da JMT. Foram notados a presença de núcleos celulares na região de JMT.



Figura 7 - Microscopia de Luz da junção miotendínea do músculo Sóleo.



Fonte: Elaborado pelo autor. A região da junção miotendínea (\*) apresenta a interface entre o tecido muscular (M) e as fibras do tendão (T). Os núcleos estão localizados na região da JMT (Seta). Ampliação 400X. No Grupo S (Fig. 7A) foram evidenciados os componentes celulares na região da JMT, foram notadas as comunicações celulares através de projeções entre feixes das fibras tendíneas e musculares. No Grupo T (Fig. 7B) foram observados o aumento da projeção das fibras tendíneas em relação às fibras do tecido muscular. No Grupo I (Fig. 7C) foram observados ampla área de tecido conjuntivo presente no tecido tendíneo e a presença de tenócitos com formatos oval e fusiforme, principalmente na região de interface com o tecido muscular, na JMT. No Grupo I/NT (Fig. 7D) foram apontados ampla área de tecido conjuntivo nas fibras tendíneas, além de tenócitos. Entre as fibras do tecido muscular, no endomísio, foi notada ampla área de tecido conjuntivo. No Grupo I/T (Fig. 7E) foi observado o aumento da projeção das fibras tendíneas em relação às fibras do tecido muscular, que percorreram o endomísio e projetaram-se lateralmente em relação às fibras.

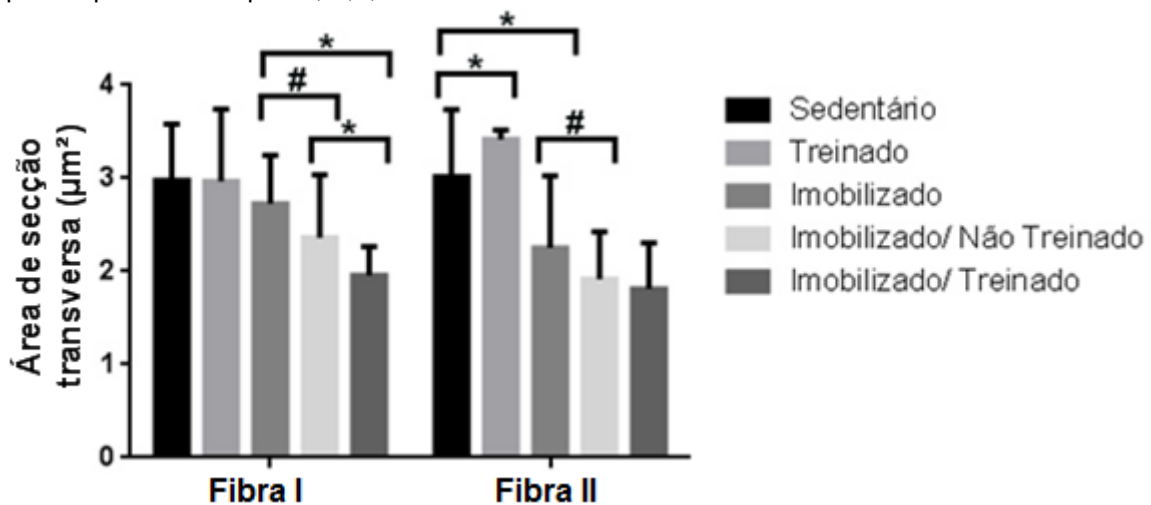


### 6.3 Análise Morfométrica da ATPase

#### 6.3.1 Tibial Anterior

No Gráfico 1 observamos que em relação às áreas de secção transversa das fibras tipo I, o Grupo I apresentou área 17,37% maior em relação ao Grupo I/NT e 28,30% em relação ao Grupo I/T. O Grupo I/T apresentou área 17,37% reduzida em relação ao Grupo I/NT. Notamos que em relação às áreas de secção transversa das fibras tipo II, o Grupo T apresentou área 11,73% maior em relação ao Grupo S, enquanto que o Grupo I apresentou área 25,24% menor em relação ao Grupo S. O Grupo I/NT apresentou área 15,11% menor em relação ao Grupo I.

**Gráfico 1.** Média e desvio Padrão da área de secção transversa do ventre muscular ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras tipo I e tipo II dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.



Fonte: Dados da pesquisa. Sendo considerado estatisticamente significando quando ( $p \leq 0,05$ ) (#) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; ( $p \leq 0,001$ ) (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/T; (\*) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e I.

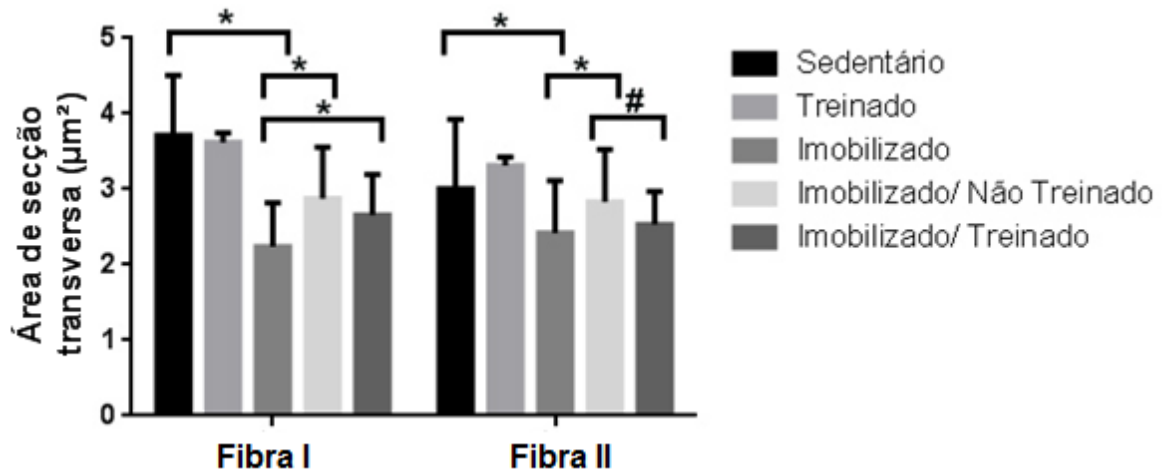
Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de  $d$  de Cohen para cada comparação. Em relação às fibras tipo I, a comparação S vs. T não apresentou magnitude do efeito, S vs. I apresentou magnitude do efeito baixa, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito média, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta. Em relação às fibras tipo II, S vs. T apresentou magnitude do efeito média, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito pequena, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito média.

**Tabela 2.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos das Fibras Tipo I e II do Tibial Anterior.

	<b>Morfometria Fibras</b>	<b>Cohen's <i>d</i></b>
<b>Tipo I</b>	S vs. T	0.02
	S vs. I	0.44
	I vs. I/NT	0.60
	I vs. I/T	1.80
<b>Tipo II</b>	S vs. T	0.77
	S vs. I	1.02
	I vs. I/NT	0.5
	I vs. I/T	0.67

### 6.3.2 Sóleo

Em relação à área de secção transversa das fibras tipo I, o Grupo S apresentou área 19,42% maior em relação ao Grupo I. O Grupo I/NT apresentou área 14,84% maior em relação ao Grupo I, enquanto que o Grupo I/T apresentou área 15,47% maior em relação ao Grupo I. Notamos que em relação às fibras tipo II o Grupo I apresentou área 26,74% menor em relação ao S. O Grupo I/NT apresentou área 14,84% maior em relação ao Grupo I, e 10,60% maior em relação I/T.

**Gráfico 2.** Média e desvio Padrão da área de secção transversa do ventre muscular ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras tipo I e tipo II dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Sóleo.

Fonte: Dados da pesquisa. Sendo considerado estatisticamente significando quando ( $p \leq 0,05$ ). (#) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T; ( $p \leq 0,001$ ); (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/T; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à S e I.

Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de *d* de Cohen para cada comparação. Em relação às fibras tipo I, S vs. T não apresentou magnitude do efeito, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito alta, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito média. Em relação às fibras tipo II, S vs. T apresentou magnitude do efeito pequena, S vs. I apresentou magnitude do efeito média, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito média, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito pequena.

**Tabela 3.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos das Fibras Tipo I e II do Sóleo.

	<b>Morfometria Fibras</b>	<b>Cohen's <i>d</i></b>
<b>Tipo I</b>	S vs. T	0.15
	S vs. I	2.11
	I vs. I/NT	1.00
	I vs. I/T	0.73
<b>Tipo II</b>	S vs. T	0.46
	S vs. I	0.72
	I vs. I/NT	0.59
	I vs. I/T	0.20

## 6.4 Ultraestrutura

### 6.4.1 Tibial Anterior - JMT

No grupo S (Fig.8A) foram observados os aspectos ultraestruturais da região da JMT, interface entre os miofilamentos compondo o tecido muscular e as fibrilas de colágeno constituindo o tecido tendíneo. Foram evidenciados os sarcômeros em séries. Na extremidade da fibra muscular, região da matriz extracelular, foi observado depósito de fibrilas de colágenos, projeções oriundas da membrana plasmática, denominadas de invaginações sarcoplasmáticas, ou também conhecidas como interdigitações, que apresentam intercomunicações dispostas nesta região de interface paralelamente entre os feixes de miofilamentos em proximidade às linhas Z dos sarcômeros distais. As interdigitações delimitam as evaginações

sarcoplasmáticas, conhecidas também como “finger-like process” que apresentam formatos irregulares.

No grupo T (Fig.8B) foram notadas invaginações sarcoplasmáticas espessas e amplas dispostas em contato com as evaginações. Na MEC foram notados grupamentos mitocondriais, fibroblastos e o retículo endoplasmático rugoso. No tecido muscular os sarcômeros em séries estão dispostos organizadamente.

No grupo I (Fig.8C) foram observados na região da JMT aspectos característicos de atrofia do tecido muscular devido à ampla desorganização tecidual das células musculares, com diminuição drástica dos feixes de miofilamentos e ampla desorganização dos sarcômeros em séries residuais. Na região da matriz extracelular foram observados núcleos de tenócitos e maior depósito de fibrilas de colágeno, bem como ampla redução nos comprimentos das invaginações sarcoplasmáticas com redução da área de contato.

No grupo I/NT (Fig.8D) foram observados discreto remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de delgadas fibras colágenas. Na região distal da célula muscular, foram observados a presença de sarcômeros em séries realinhados em relação ao eixo longitudinal da JMT. As invaginações sarcoplasmáticas revelaram-se curtas e ramificadas.

No grupo I/T (Fig.8E) foram observados extenso remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de longas fibras colágenas. Na região distal da célula muscular, foram observados a presença de sarcômeros em séries realinhados em relação ao eixo longitudinal da JMT. As invaginações sarcoplasmáticas revelaram-se espessas e maiores comprimentos, apresentando intercomunicações, e as evaginações delimitados pelo sarcolema, e reestruturação e alinhamento das linhas Z dos sarcômeros adjacentes à JMT.

#### 6.4.2 Sóleo - JMT

No grupo S (Fig.8F) foram observadas os aspectos ultraestruturais da região da JMT, interface entre os miofilamentos que compõe o tecido muscular e as fibrilas de colágeno que compõe o tecido tendíneo. O tecido muscular apresentou-se com sarcômeros distais com maior comprimento, e nesta interface, observou-se a extremidade distal da célula muscular com formato cônico, com os sarcômeros em

série dispostos organizadamente. Adjacente a esta extremidade, na região da matriz extracelular, foi observado maior depósito de fibrilas de colágenos que compõe dobras na membrana plasmática, denominadas invaginações sarcoplasmáticas, ou também conhecidas como interdigitações, que se originam do tecido tendíneo, apresentam algumas intercomunicações e estão dispostas nesta região de interface paralelamente entre os feixes de miofilamentos em proximidade às linhas Z dos sarcômeros distais. As interdigitações provenientes da matriz extracelular delimitam as evaginações sarcoplasmáticas, que apresentam formatos irregulares.

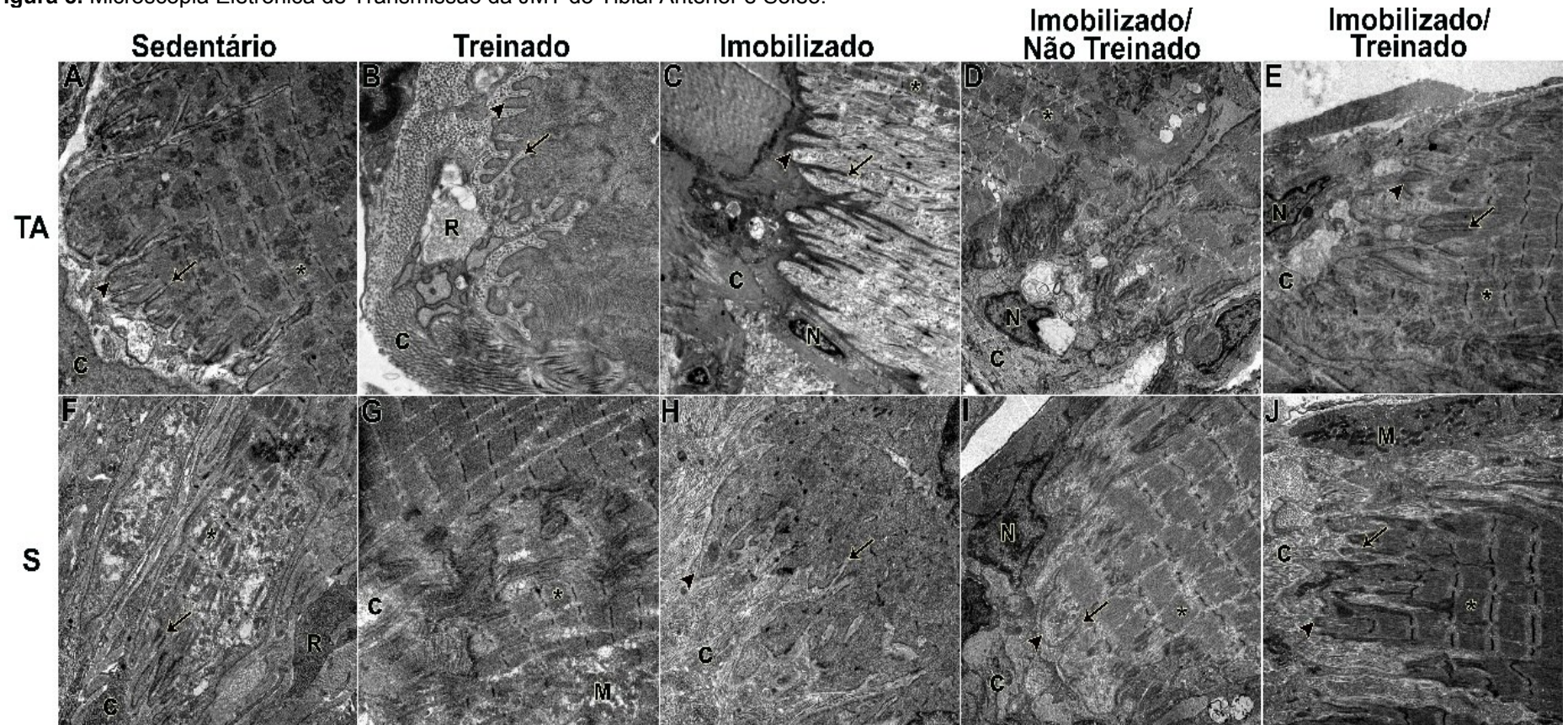
No Grupo Treinado (Fig.8G) foram observados na área da JMT feixes de miofibrilas com sarcômeros organizados paralelamente. Foram apresentadas amplas invaginações sarcoplasmáticas dispostas em contato com as evaginações.

No grupo I (Fig.8H) foram observados na região da JMT aspectos característicos de atrofia do tecido muscular, com diminuição dos feixes de miofilamentos nesta região. Na matriz extracelular foram observados entre os núcleos de tenócito (fibroblastos) um capilar sanguíneo adjacentes ao depósito de fibrilas de colágeno, bem como redução drástica nos comprimentos das invaginações sarcoplasmáticas e em alguns pontos ausência.

No grupo I/NT (Fig.8I) foram observados remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de delgada fibras colágenas e volumosos núcleos dos tenócitos. Na região distal da célula muscular, foram observados formato cônico e a presença de sarcômeros em séries realinhados em relação ao eixo longitudinal da JMT. As invaginações sarcoplasmáticas foram observadas maiores, e as evaginações delimitaram o sarcolema.

No grupo I/T (Fig.8J) foram observados remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de delgada fibras colágenas. Na região distal da célula muscular, foram observados a presença de sarcômeros em séries realinhados em relação ao eixo longitudinal da JMT. Grupamento de mitocôndrias subsarcolemais, com formatos ovais e alongados foram evidenciados perifericamente à célula muscular. As invaginações sarcoplasmáticas foram observadas com comprimento maiores e drasticamente mais espessas, e as evaginações delimitaram o sarcolema.

Figura 8. Microscopia Eletrônica de Transmissão da JMT do Tibial Anterior e Sóleo.



Fonte: Elaborado pelo autor. Grupo S (A, F); Grupo T (B, G); Grupo I (C, H); Grupo I/NT (D, I); Grupo I/T (E, J). Observam-se a disposição da organização dos sarcômeros em séries (\*); feixes de fibras colágenas (c); invaginações sarcoplasmáticas (setas); evaginações sarcoplasmáticas (cabeça de seta); núcleo do tenócito (N); retículo endoplasmático (R); grupamento mitocondrial (M). Ampliações:(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) 5000X.



## **6.5 Análise Morfométrica dos Sarcômeros**

### **6.5.1 Tibial Anterior**

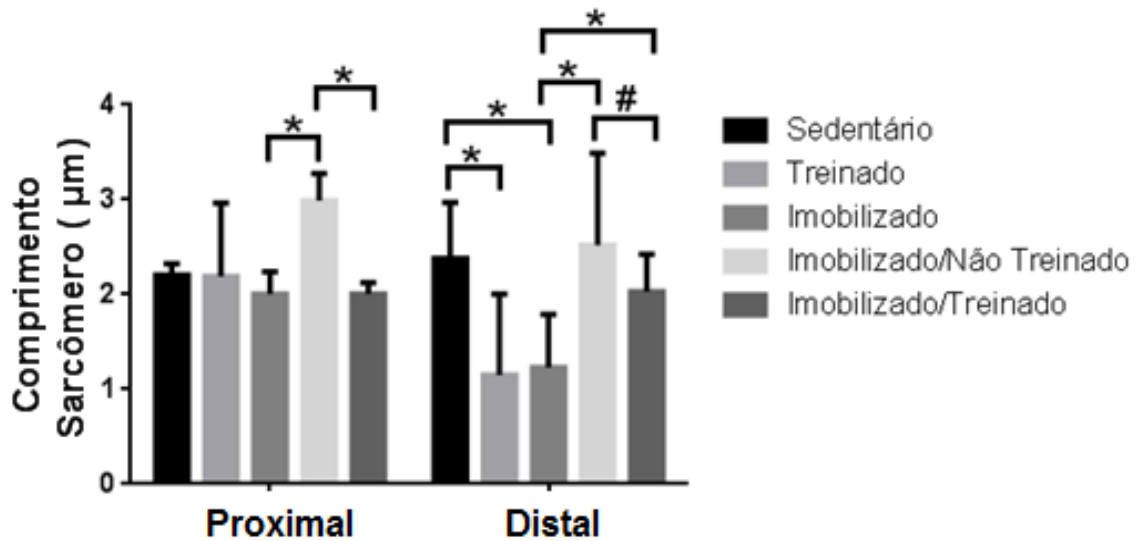
Serão apresentados os resultados dos comprimentos dos sarcômeros proximais e distais do tibial anterior.

#### **6.5.1.1 Sarcômeros Proximais e Distais**

Em relação ao comprimento dos sarcômeros proximais, o Grupo S apresentou comprimento 0,63% maior em relação ao Grupo T. O Grupo S demonstrou em relação ao Grupo I comprimento 9,01% maior.

Dos resultados estatisticamente significantes, o Grupo I/NT apresentou maior comprimento, 32,9% em relação ao Grupo I e I/T. Também evidenciamos que em relação ao comprimento dos sarcômeros distais, o Grupo T apresentou comprimento 51,63% menor respectivamente ao Grupo S, enquanto que o Grupo I apresentou comprimento 48,36% menor em contraste ao Grupo S. O Grupo I/NT apresentou comprimento 51,19% maior em relação ao Grupo I, e 54,36% maior em relação ao Grupo I/T. O Grupo I/T apresentou comprimento 39,40% maior em relação ao Grupo I, em que apresentamos no Gráfico 3.

**Gráfico 3.** Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) dos sarcômeros proximais e distais dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.



Fonte: dados da pesquisa. ( $p \leq 0,05$ ) (#) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T; ( $p \leq 0,0001$ ) (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e I; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/T.

Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de  $d$  de Cohen para cada comparação. Em relação ao sarcômeros proximais, S vs. T não apresentou magnitude do efeito, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito alta, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito baixa. Em relação ao sarcômeros distais, S vs. T apresentou magnitude do efeito alta, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito alta, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta.

**Tabela 4.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos Sarcômeros Proximais e Distais do Tibial Anterior.

	<b>Sarcômeros</b>	<b>Cohen's <math>d</math></b>
<b>Proximais</b>	S vs. T	0.02
	S vs. I	1.07
	I vs. I/NT	3.77
	I vs. I/T	0.03
<b>Distais</b>	S vs. T	1.67
	S vs. I	2.00
	I vs. I/NT	1.63
	I vs. I/T	1.65



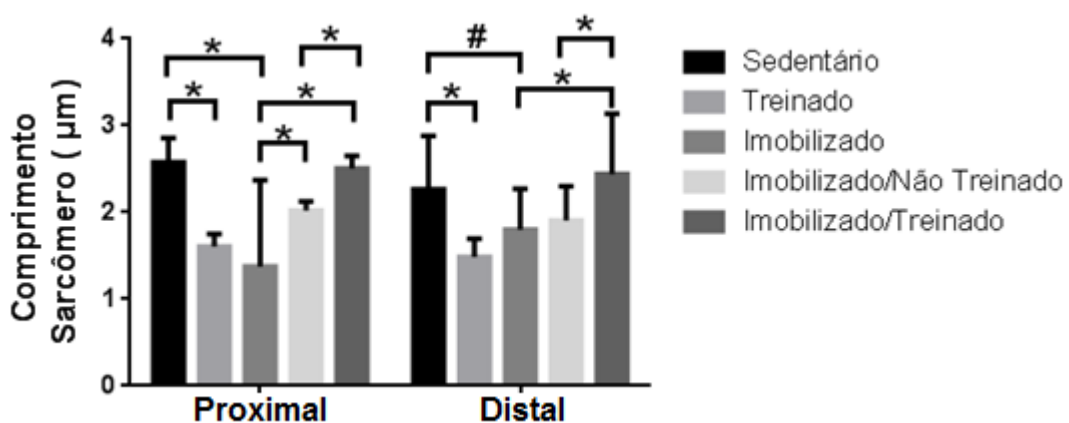
## 6.5.2 Sóleo

Serão apresentados os resultados das análises morfométricas do comprimento dos sarcômeros proximais e distais do Sóleo.

### 6.5.2.1 Sarcômeros Proximais e Distais

O Grupo T apresentou comprimento 37,74% menor em relação ao Grupo S, enquanto que o Grupo I apresentou comprimento 20,35% menor respectivamente ao Grupo S. Além disto, o Grupo I/NT apresentou comprimento 31,68% maior respectivamente ao Grupo I, enquanto que o Grupo I/T apresentou comprimento 44,8% maior em relação ao Grupo I. O Grupo I/T apresentou comprimento 19,2% maior em relação ao Grupo I/NT. Também evidenciamos que em relação aos sarcômeros distais o Grupo T apresentou comprimento 34,51% menor em relação ao Grupo S, e o Grupo I apresentou redução de 20,35% em relação ao Grupo S. O Grupo I/T apresentou comprimento 5,26% maior em relação ao Grupo I, e 22,13% maior respectivamente ao Grupo I/NT, como apresentamos no Gráfico 4.

**Gráfico 4.** Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) dos sarcômeros proximais e distais dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Sóleo.



Fonte: dados da pesquisa. Sendo considerado estatisticamente significativo quando (#) ( $p \leq 0,05$ ) diferença intergrupo em relação à S e I; (#) diferença intergrupo em relação à T e I; ( $p \leq 0,0001$ ) (\*) diferença intergrupo em relação à S e T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e I; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/T; (\*) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T.

Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de *d* de Cohen para cada comparação. Em relação aos sarcômeros proximais, S vs. T apresentou magnitude do efeito alta, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito alta, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta. Em relação aos sarcômeros distais, S vs. T apresentou magnitude do efeito alta, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT não apresentou magnitude do efeito, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta.

**Tabela 5.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos Sarcômeros Proximais e Distais do Sóleo.

	<b>Sarcômeros</b>	<b>Cohen's <i>d</i></b>
<b>Proximais</b>	S vs. T	11.49
	S vs. I	1.64
	I vs. I/NT	0.91
	I vs. I/T	1.59
<b>Distais</b>	S vs. T	4.91
	S vs. I	0.84
	I vs. I/NT	0.24
	I vs. I/T	1.07

## 6.6 Análise Morfométrica das Invaginações e Evaginações Sarcoplasmáticas

### 6.6.1 Tibial Anterior

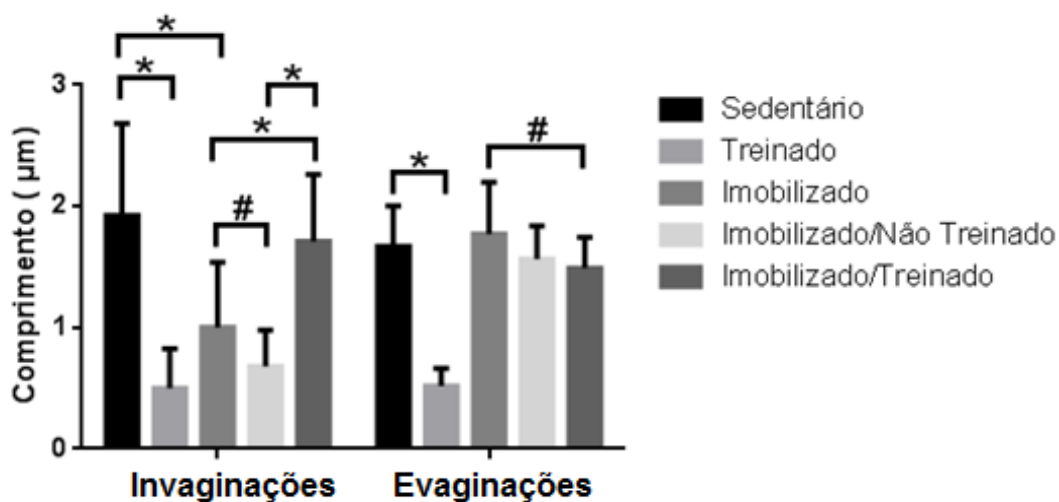
Será apresentada a análise morfométrica das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas do Tibial Anterior.

#### 6.6.1.1 Comprimento de Invaginações e Evaginações

Das análises das invaginações, em que os resultados foram estatisticamente significantes, o Grupo T apresentou redução de 73,95% em relação ao Grupo S, e o Grupo I apresentou redução de 47,91% em relação ao Grupo S. O Grupo I/NT apresentou comprimento 32,01% menor em relação ao Grupo I. Quanto ao Grupo I/T,

este apresentou comprimento 41,52% maior em contraste ao Grupo I e 60,23% maior respectivamente ao Grupo I/NT. Evidenciamos que em relação ao comprimento das evaginações o Grupo T apresentou comprimento 69,27% menor respectivamente ao Grupo S. O Grupo I apresentou comprimento 31,8% maior respectivamente ao Grupo I/NT. Enquanto que o Grupo I/T apresentou comprimento 16,38% menor em relação ao Grupo I, como apresentamos no Gráfico 5.

**Gráfico 5.** Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.



Fonte: dados da pesquisa. ( $p \leq 0,05$ ) (#) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (#) diferença intergrupo em relação à I e I/T; ( $p \leq 0,001$ ) (\*) diferença intergrupo em relação à S e T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e I; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T; (\*) diferença intergrupo em relação à T e I.

Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de  $d$  de Cohen para cada comparação. Em relação ao comprimento das invaginações, S vs. T apresentou magnitude do efeito alta, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito média, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta. Em relação ao comprimento das evaginações, S vs. T apresentou magnitude do efeito alta, S vs. I apresentou magnitude do efeito pequena, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito média, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito média.

**Tabela 6.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos dos Comprimentos de Invaginações e Evaginações do Tibial Anterior.

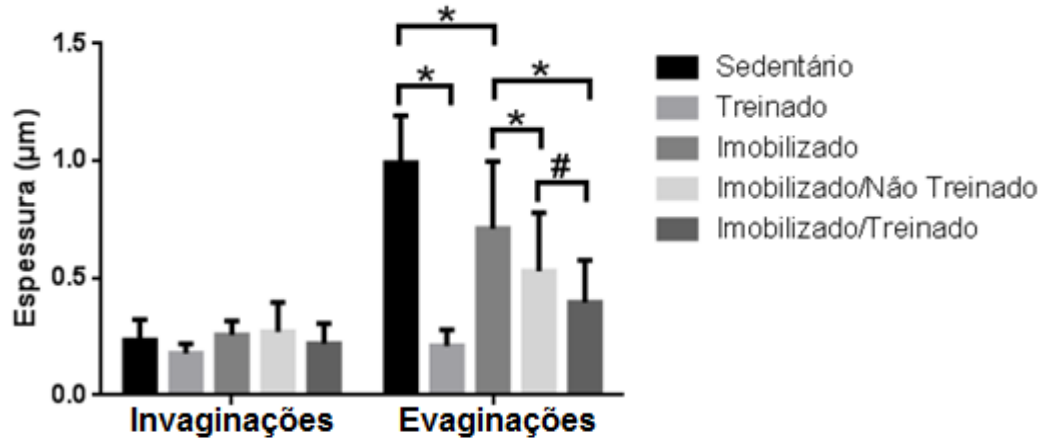
	<b>Comprimento</b>	<b>Cohen's <i>d</i></b>
<b>Invaginações</b>	S vs. T	3.30
	S vs. I	1.40
	I vs. I/NT	0.73
	I vs. I/T	1.30
<b>Evaginações</b>	S vs. T	6.43
	S vs. I	0.27
	I vs. I/NT	0.57
	I vs. I/T	0.80

#### 6.6.1.2 Espessura de Invaginações e Evaginações

O Grupo S apresentou espessura de invaginações 23,60% em relação ao Grupo T, enquanto que o Grupo I apresentou espessura 5,86% maior respectivamente ao Grupo S. O Grupo I apresentou espessura 9,33% maior em relação ao Grupo I/NT. O Grupo I/T apresentou espessura 56% maior respectivamente ao Grupo I.

O Grupo T apresentou espessura de evaginações 78,78% menor em relação ao Grupo S, enquanto que o Grupo I apresentou espessura 28,28% menor respectivamente ao Grupo S. O Grupo I/NT apresentou espessura 25,25% menor em contraste ao Grupo I, enquanto que o Grupo I/T apresentou espessura 45,07% menor respectivamente ao Grupo I. O Grupo I/NT apresentou espessura 26,41% maior respectivamente ao Grupo I/T.

**Gráfico 6.** Média e desvio padrão da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Tibial Anterior.



Fonte: dados da pesquisa. Sendo considerado estatisticamente significativo quando ( $p \leq 0,05$ ) (#) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T; ( $p \leq 0,001$ ) (\*) diferença intergrupo em relação à S e T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e I; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/T.

Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de  $d$  de Cohen para cada comparação. Em relação à espessura das invaginações, S vs. T apresentou magnitude do efeito grande, S vs. I apresentou magnitude do efeito pequena, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito média, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta.

**Tabela 7.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos da Espessura de Invaginações e Evaginações do Tibial Anterior.

	<b>Espessura</b>	<b>Cohen's <math>d</math></b>
<b>Invaginações</b>	S vs. T	3.37
	S vs. I	0.33
	I vs. I/NT	0.14
	I vs. I/T	0.18
<b>Evaginações</b>	S vs. T	6.43
	S vs. I	3.93
	I vs. I/NT	0.67
	I vs. I/T	1.32

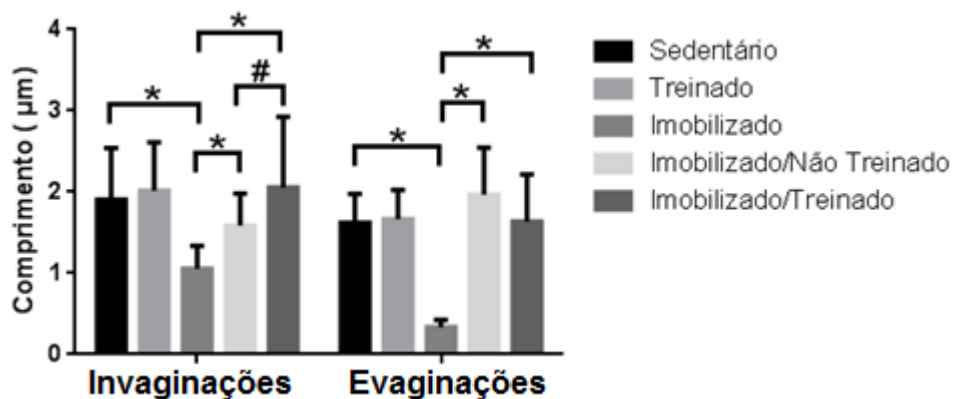
## 6.6.2 Sóleo

Serão apresentados os resultados da análise morfométrica das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas do Sóleo.

### 6.6.2.1 Comprimento de Invaginações e Evaginações

Em relação ao comprimento das invaginações, o Grupo I apresentou comprimento reduzido de 45,02% em relação ao Grupo S. O Grupo T apresentou comprimento 48,01% maior em relação ao Grupo I, enquanto que o Grupo I/NT apresentou comprimento 33,54% maior em relação a esse mesmo Grupo. O Grupo I/T apresentou comprimento 75,01% maior em relação ao I, e 22,92% em relação ao Grupo I/NT. Evidenciamos que em relação ao comprimento das evaginações, o Grupo I apresentou comprimento 79,62% menor em relação ao Grupo S, e 80,23% em relação ao Grupo T. O Grupo I/NT apresentou comprimento 83,16% maior em relação ao Grupo I, enquanto que o Grupo I/T apresentou comprimento 79,75% maior em relação a esse mesmo Grupo.

**Gráfico 7.** Média e desvio padrão do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Sóleo.



Fonte: dados da pesquisa. Sendo considerado estatisticamente significativo quando ( $p \leq 0,05$ ) (#) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T; ( $p \leq 0,001$ ) (\*) diferença intergrupo em relação à S e I; (\*) diferença intergrupo em relação à T e I; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/T.

Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de  $d$  de Cohen para cada comparação. Em relação ao comprimento das invaginações,

S vs. T não apresentou magnitude do efeito, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito alta, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta. Em relação ao comprimento das evaginações, S vs. T não apresentou magnitude do efeito, S vs. I apresentou magnitude do efeito alta, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito alta, e I vs. I/T apresentou magnitude do efeito alta.

**Tabela 8.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos de Comprimento de Invaginações e Evaginações do Sóleo.

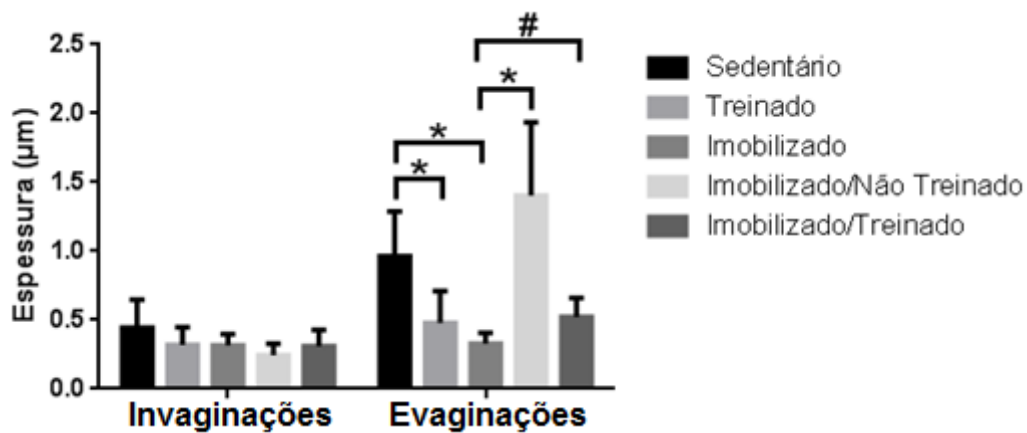
	<b>Comprimento</b>	<b>Cohen's <i>d</i></b>
<b>Invaginações</b>	S vs. T	0.17
	S vs. I	1.75
	I vs. I/NT	1.54
	I vs. I/T	1.54
<b>Evaginações</b>	S vs. T	0.13
	S vs. I	5.03
	I vs. I/NT	3.91
	I vs. I/T	3.16

#### 6.6.2.2 Espessura de Invaginações e Evaginações

Em relação à espessura das invaginações, o Grupo T apresentou espessura 27,27% menor respectivamente ao Grupo S, enquanto que o Grupo I apresentou espessura 29,54% menor em relação ao Grupo S. O Grupo I/NT apresentou espessura 22,58% menor respectivamente ao Grupo I, e o Grupo I/T apresentou espessura 1,88% menor em relação ao Grupo I.

Em relação à espessura das evaginações, o Grupo I apresentou espessura 65,62% menor em relação ao Grupo T, enquanto que o Grupo T apresentou espessura 51,04% menor em relação a esse mesmo Grupo. O Grupo I/NT apresentou espessura 66,42% maior em relação ao Grupo I, enquanto que o Grupo I/T apresentou espessura 36,53% maior em relação a esse mesmo Grupo. O Grupo I/NT apresentou espessura 76,42% maior em relação ao Grupo I/T, como apresentado no Gráfico 8.

**Gráfico 8.** Média e desvio padrão da espessura ( $\mu\text{m}$ ) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, I, I/NT e I/T do Sóleo.



Fonte: dados da pesquisa. Sendo considerado estatisticamente significativo quando ( $p \leq 0,05$ ) (#) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à S e T; (\*) diferença intergrupo em relação à S e I; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/NT; (\*) diferença intergrupo em relação à I e I/T; (\*) diferença intergrupo em relação à I/NT e I/T.

Realizamos o cálculo da magnitude do efeito amostral, e observamos o valor de  $d$  de Cohen para cada comparação. Em relação à espessura das invaginações, S vs. T apresentou magnitude do efeito média, S vs. I apresentou magnitude do efeito grande, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito grande, e I vs. I/T não apresentou magnitude do efeito. Em relação à espessura das evaginações, S vs. T apresentou magnitude do efeito grande, S vs. I apresentou magnitude do efeito grande, I vs. I/NT apresentou magnitude do efeito grande, e I vs. I/T não apresentou magnitude do efeito.

**Tabela 9.** Magnitude da grandeza. Comparação dos Grupos da Espessura de Invaginações e Evaginações do Sóleo.

	<b>Espessura</b>	<b>Cohen's <math>d</math></b>
<b>Invaginações</b>	S vs. T	0.72
	S vs. I	0.81
	I vs. I/NT	0.90
	I vs. I/T	0.05
<b>Evaginações</b>	S vs. T	1.70
	S vs. I	2.66
	I vs. I/NT	0.90
	I vs. I/T	0.05



## 7 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho evidenciaram como principais achados que ocasionaram benefícios para as estruturas analisadas: 1) as alterações da massa corporal dos ratos; 2) alterações na área de secção transversa das fibras tipo I e tipo II do tibial anterior e sóleo; 3) as adaptações morfológicas estruturais, e ultraestruturais do ventre muscular e da JMT do tibial anterior e sóleo de ratos *Wistar* submetidos à imobilização do membro posterior direito e ao protocolo de reabilitação articular perante o treinamento de natação; 4) as alterações no comprimento dos sarcômeros proximais e distais do tibial anterior e sóleo; 5) as alterações no comprimento e espessura das invaginações e evaginações dos músculos analisados.

No presente estudo, nossos resultados revelaram que a imobilização articular resulta em redução da massa corporal dos ratos como consequência do processo de atrofia do músculo esquelético. Além disso, após o protocolo de imobilização articular, foi evidenciado que ocorreu o reestabelecimento da massa corporal dos ratos tanto quando estes foram submetidos a um protocolo de treinamento de natação quanto quando não o realizaram. Em estudo de Kunz et al., (2014) foi observado que um protocolo de imobilização do membro posterior de ratos por 15 dias resulta em redução da massa muscular, em comparação com dois grupos de estudo: um grupo submetido à reabilitação articular livre na gaiola, sem realização de exercícios, e grupo submetido à remobilização articular pela natação e salto em meio aquático.

Nos resultados encontrados no presente estudo, embora os grupos tenham reestabelecido os valores da massa corporal no terceiro período, o grupo I/NT apresentou maior valor em relação ao I/T. Uma provável explicação para isso é pelo aumento do tecido adiposo.

Em modelos experimentais, há evidência da ocorrência da plasticidade tecidual de acordo com o estímulo recebido, o que ocasiona alterações nas características do ventre muscular (SHAH et al., 2001). Isto corrobora com os resultados que encontramos, haja visto que estas adaptações foram também observadas nos músculos sóleo e tibial anterior dos animais submetidos à imobilização e reabilitação articular em meio aquático.

Dentro desse contexto, segundo os dados obtidos em nosso estudo, evidenciamos que a atrofia induzida pela imobilização prolongada ocasionou drásticas alterações no ventre do músculo Tibial Anterior e Sóleo pela presença de fusos extracelulares, macrófagos e tecido conjuntivo intramuscular. No estudo de Jozsa et al., (1990) utilizaram modelo de imobilização gessada do membro posterior esquerdo, foi demonstrado que ocorre aumento do tecido conjuntivo, mais acentuada após 2 e 3 semanas, principalmente no endomísio e perimísio. Foram utilizados os métodos de microscopia de luz (coloração Hematoxilina-Eosina) e microscopia eletrônica de transmissão, assim como neste estudo. Os autores concluíram que isto produz uma barreira mecânica ao influxo sanguíneo para o músculo, o que contribuiu para a atrofia muscular.

Seguindo essa linha, a imobilização articular ocasionou drásticas alterações no ventre muscular dos músculos analisados, e a reabilitação articular por meio do protocolo de natação demonstrou ser efetiva, pois foi capaz de reestabelecer as características do grupo Sedentário. A presença de núcleos centralizados na região da JMT principalmente nos grupos I e I/T, indicaram aumento da atividade celular devido aos protocolos de imobilização e treinamento de natação. Em estudo de Lima et al., (2007) após 7 dias de imobilização do Sóleo em posição de encurtamento, foi observado que os fibroblastos, que estão sujeitos à tensão ativa e passiva muscular, têm o seu metabolismo alterado com a diminuição de tensão provocada pela imobilização, o que acarreta no aumento da área de tecido conjuntivo intramuscular, o que foi analisado por meio dos métodos de Microscopia de Luz e análise morfométrica da área de secção das fibras musculares. Com isso, os autores sugerem a necessidade da reabilitação em músculos submetidos à imobilização, mesmo a curto prazo, com a finalidade do retorno precoce das características musculares normais. Também foi encontrado diminuição na massa muscular, número e comprimento de sarcômeros em série. Foram observados núcleos centralizados na região na JMT, o que demonstra caráter regenerativo dessa região. Este processo ativa as células satélites, que proliferam-se e expressam marcadores da linhagem miogênica (YABLONKA-REUVENI, 1994).

Nesse sentido, evidenciamos em nosso estudo que a reabilitação articular sem a utilização de qualquer tipo de treinamento apresentou discreta restauração das características estruturais do ventre muscular após o protocolo de imobilização. No

Grupo I/NT do tibial anterior, foi observado o perimísio espesso, além da presença de macrófagos, e o perimísio envolvendo as fibras musculares. Foi constatado no endomísio a presença de tenócitos, e aumento no tecido conjuntivo. No Grupo I/NT do sóleo foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de tecido conjuntivo, e este envolvendo as fibras musculares. Em estudo de Kuns et al., (2014) foram analisados os efeitos da imobilização pelo período de 14 dias utilizando modelo confeccionado por atadura gessada, e remobilização sobre parâmetros morfológicos dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar*. Os músculos sóleo e tibial anterior, controles do experimento, foram analisados pelo método de microscopia de luz, e apresentaram células em formato poligonal, núcleos periféricos e padrão fascicular normal. Nos animais submetidos ao período de imobilização, foi verificado um desarranjo na organização tecidual dos músculos sóleo e tibial anterior com aparecimento de fibras polimórficas de aspecto arredondado, mais evidente no músculo tibial anterior, bem como uma maior quantidade de tecido conjuntivo intramuscular. A imobilização reduziu massa, diâmetro da fibra e comprimento do músculo sóleo, e massa muscular do tibial anterior. Nos grupos remobilizados livremente e remobilizados em meio aquático houve aumento da massa e comprimento muscular do tibial anterior, e nos remobilizados livremente houve aumento do menor diâmetro da fibra do sóleo. Tanto a remobilização livre (imobilização por 14 dias e em seguida remobilização na gaiola sem treinamento) quanto a remobilização por exercícios (pela associação de natação e salto em meio aquático após os 14 dias de imobilização), reestabeleceram as características morfológicas do ventre destes músculos, que foram evidenciadas pela técnica de Microscopia de Luz (Hematoxilina – Eosina).

Seguindo essa linha, no estudo de Polizello et al., (2011) sobre a imobilização em posição de alongamento por 14 dias consecutivos, observaram alterações histopatológicas através do método de microscopia de luz, coloração de Hematoxilina-Eosina condizentes com a atrofia como centralização nuclear e processos degenerativos, e aumento do colágeno. Em sequência, com a liberação do animal por um período de dez dias consecutivos, isto gerou estímulos mecânicos pela livre movimentação, capazes de promover ativação de mecanismos competentes em recuperar os padrões do músculo extensor longo dos dedos, com exceção do trofismo e proporção das fibras de contração rápida.

Dentro desse contexto, os músculos Tibial Anterior e Sóleo respondem de forma diferenciada a um mesmo protocolo de imobilização e reabilitação articular, uma vez que, as alterações da área de secção transversa das fibras musculares diferem entre os músculos. No músculo tibial anterior, a área de secção transversa das fibras tipo I foi maior no grupo Imobilizado em relação aos grupos I/NT e I/T. As fibras tipo II do grupo T apresentaram área maior que o grupo S, enquanto que o grupo I apresentou área menor. Em estudo de modelo experimental realizado por Fujita et al., (2011) com suspensão do membro posterior de ratos *Wistar* por sete dias, que resultou em atrofia, ocorreu diminuição da massa muscular, e da área de secção transversa do tibial anterior, de ambos os tipos de fibras.

No músculo sóleo o grupo I apresentou área de secção transversa reduzida em relação aos demais grupos, em relação às fibras tipo I e tipo II. As fibras tipo II do Grupo I/T apresentou discreto aumento da área de secção transversa em relação às do grupo I. Os músculos esqueléticos apresentam predomínio de determinado tipo de fibra muscular de acordo com a demanda funcional à qual o músculo é submetido. De modo que o músculo sóleo apresenta predomínio de fibras de contração lenta, pois suas fibras estão ativadas durante 90% do tempo, enquanto que os músculos fásicos ou rápidos são ativados somente durante 5%. Sendo assim, os músculos posturais ou tônicos, responsáveis pela manutenção do corpo contra a gravidade, apresentam um predomínio de fibras de contração lenta, e os músculos rápidos, responsáveis pela produção de força muscular, são compostos, predominantemente, por fibras de contração rápida (MINAMOTO, 2005).

Em conformidade, no atual estudo, observou-se uma diminuição da área de secção transversal tanto nas fibras do músculo sóleo (predominantemente fibras oxidativas), quanto no músculo tibial anterior (predominantemente fibras glicolíticas), que passaram pelo protocolo de imobilização articular. Existe maior predisposição dos músculos com predomínio de fibras lentas se manterem em posição de encurtamento, devido à função postural e a estarem sempre em estado de contração, o que provoca, além da perda do número de sarcômeros em série, encurtamento da fibra muscular, e maior proliferação de tecido conjuntivo (SALVINI et al., 2000). Predominantemente oxidativas, essas fibras também se apresentam mais susceptíveis à atrofia muscular em decorrência de processo de imobilização articular do que as fibras musculares rápidas (tipo II), devido a mudanças em seu metabolismo. (APPELL, 1990).

Dentro desse contexto, os aspectos morfológicos dos músculos tibial anterior e sóleo também foram evidenciados pelas características da JMT, que segundo Ciena et al., (2012) é uma região de interface entre os músculos e os tendões capaz de transmitir a força contrátil gerada pelas proteínas contráteis presentes nas miofibrilas e a força elástica armazenada no tecido conjuntivo durante o movimento, bem como atuar no posicionamento e estabilização articular.

Neste estudo de Ciena et al., (2012) foram descritas as características ultraestruturais da JMT da musculatura cervical, esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos. No Grupo Recém-nascido foram observadas células musculares em elevada atividade celular, com numerosas mitocôndrias ovais, evidenciando suas cristas de dupla membrana, além de feixes de miofibrilas com pequenas mitocôndrias ovais e invaginações e evaginações delimitadas pela membrana plasmática. No grupo Adulto foi observado a disposição longitudinal dos feixes de miofibrilas, os sarcômeros em série, alinhados em mitocôndrias ovais aos pares, adjacentes a linha Z. Na extremidade celular foi notado, na interface músculo-tendão, longas invaginações, evaginações sarcoplasmáticas e mitocôndrias, o que também foi notado no grupo S do nosso estudo; e no Grupo Idoso foi evidenciado invaginações finas e curtas, e disposição das invaginações mostrando ramificações e revelando características ultraestruturais de atrofia celular com diminuição de células musculares e substituição por tecido conectivo, o que também foi evidenciado no grupo I do presente estudo.

Nessa perspectiva, demonstramos que a projeção das fibras colágenas do tecido tendíneo para as células do tecido muscular, na região da MEC, tem diferenças em seu tamanho e espessura de acordo com o protocolo empregado, e principalmente a atividade física exercida. No Grupo T e I/T observamos o aumento das projeções do tecido tendíneo em relação ao tecido muscular, além de fibras musculares organizadas, o que ocasiona o fortalecimento da região da JMT, e a melhora na transmissão de forças nesta região. Da mesma maneira, o estudo descrito por Kojima et al., (2008), relatou utilizando o método de microscopia eletrônica de transmissão, que em nível morfológico a JMT apresenta interdigitações, conhecidas também como profundas invaginações sarcoplasmáticas que penetram nas membranas das células musculares, e também evaginações, paralelamente à direção miofibrilar em músculos fusiformes. Sua presença aumenta a superfície de contato entre os tecidos muscular

e tendíneo, o que colabora para a JMT ser resistente às forças contráteis do músculo-esquelético.

Neste estudo de Kojima et al. (2008) examinaram as alterações na JMT induzidas pelo exercício de corrida, diariamente por 4 semanas, nos membros posteriores de ratos, comparando o grupo Não Treinado (controle) e o grupo Treinado, evidenciando que a tensão gerada é menor durante o descanso quando comparado ao exercício de corrida. Além disso, foi observado que as ramificações formando as invaginações permitem um aumento na área de contato da JMT e, portanto, de acordo com o nível de tensão, a JMT pode ajustar a força de cisalhamento.

Por conseguinte, identificamos que a JMT possui um padrão de fortalecimento determinado pela aplicação do treinamento indicados nos Grupos T e I/T, apresentando maiores projeções e densidade em relação aos Grupos S, I e I/NT que não realizaram um protocolo de treinamento, e nos Grupos I e I/NT demonstrando características de atrofia muscular. Essas características ocasionadas por um modelo de microgravidade também foram encontradas por Curzi et al., (2013) que observaram as alterações morfológicas geradas pela atrofia muscular nestas condições, em estudo que analisou a plasticidade da JMT em condições de atrofia e suas alterações morfofuncionais utilizando método de microscopia eletrônica de transmissão.

Neste estudo, em um grupo foram submetidos à suspensão do membro posterior, e em outro formaram o grupo controle, que não foi submetido a nenhum protocolo. No grupo controle, longas e diversas interdigitações do tendão penetram no tecido muscular, paralelamente à orientação dos miofilamentos, enquanto que após 5 dias de suspensão do membro posterior as invaginações e evaginações diminuiram em quantidade e comprimento, e foram evidenciados na região dos sarcômeros distais na região da JMT, sarcômeros desalinhados, mitocôndrias com alteração em seus formatos e as tríades localizadas em diferentes locais em relação às condições não patológicas. Desorganização de miofilamentos, distorção ou ausência de linhas Z também são observados nessas condições (CURZI et al., 2013).

Corroborando com nossos achados, condições patológicas como a imobilização articular acarretam em atrofia muscular, assim como alterações na principal área de transmissão de forças do aparelho locomotor, a JMT, o que foi observado também em estudo de Kannus et al., (1992) através do método de

microscopia eletrônica de transmissão, sobre os efeitos da imobilização na JMT por 3 semanas, que demonstrou que a interface entre as células musculares e fibrilas colágenas foi reduzida em cerca de 50% em fibras tipo I e tipo II.

Seguindo essa linha, foram observadas e descritas no presente estudo as características e adaptações ultraestruturais da junção miotendínea dos músculos tibial anterior e sóleo, foram detalhadas a interface entre o tecido tendíneo e como as fibrilas de colágeno se apresentam, bem como os feixes de miofilamentos que se apresentam ao longo do eixo longitudinal da JMT. No grupo S do músculo Tibial Anterior foram evidenciados na extremidade da fibra muscular, região da matriz extracelular, depósito de fibrilas de colágenos, projeções oriundas da membrana plasmática, denominadas de invaginações sarcoplasmáticas, ou também conhecidas como interdigitações, que apresentam intercomunicações dispostas nesta região de interface paralelamente entre os feixes de miofilamentos em proximidade às linhas Z dos sarcômeros distais. As interdigitações delimitam as evaginações sarcoplasmáticas, conhecidas também como “finger-like process” que apresentam formatos irregulares. No músculo Sóleo o tecido muscular apresentou-se com sarcômeros distais com maior comprimento, e nesta interface, observou-se a extremidade distal da célula muscular com formato cônico, com os sarcômeros em série dispostos organizadamente, além de intercomunicações presentes entre as interdigitações. Na região da JMT, os feixes distais de miofilamentos apresentam projeções sarcoplasmáticas alongadas em suas extremidades que possuem formato semelhantes a “dedos”, estas envolvidas pelas invaginações sarcoplasmáticas provenientes da matriz extracelular, que foram denominadas de evaginações sarcoplasmáticas (CIENA et al., 2010).

Com a realização do protocolo de treinamento aquático foram observadas invaginações sarcoplasmáticas espessas e amplas dispostas em contato com as evaginações. Na MEC foram notados grupamentos mitocondriais e fibroblastos. No tecido muscular os sarcômeros em séries estão dispostos organizados no eixo longitudinal. A maior área de contato entre o tecido muscular e o tecido tendíneo, observado pelo aumento das interdigitações acarreta em maior resistência muscular, o que auxilia na principal função da JMT que é transmitir as forças geradas nas ações musculares pelas proteínas contráteis para as proteínas do tecido conjuntivo do tendão, bem como agir na força motriz, estabilidade e posicionamento das

articulações, auxiliar o controle dos movimentos, armazenar e liberar energia elástica (KANNUS et al., 1992; TROTTER et al., 2002).

Em contrapartida, com a realização do protocolo de imobilização articular foram observados na região da JMT aspectos característicos de atrofia do tecido muscular devido à ampla desorganização tecidual das células musculares, com diminuição drástica dos feixes de miofilamentos e ampla desorganização dos sarcômeros em séries residuais. Na região da matriz extracelular foram observados núcleos de tenócitos e maior depósito de fibrilas de colágeno, bem como ampla redução nos comprimentos das invaginações sarcoplasmáticas com redução da área de contato, alterações estas semelhantes às encontradas por Järvinen et al. (2002) que constataram aumento no colágeno I e III nos músculos sóleo e gastrocnêmio após 3 semanas de imobilização, o que pode acarretar em rigidez e maior predisposição à lesões musculares na área da JMT. Em um estudo utilizando modelo de microgravidade, com redução da carga imposta aos músculos, é observado que isto produz diminuição considerável da interface entre o músculo-tendão de ratos, bem como um aumento do número de ribossomos e mitocôndrias (TIDBALL et al., 1992).

Nesse sentido, correlato acerca de indivíduos que apresentam amputação de membro inferior, a perda de massa muscular que evidencia a atrofia está acompanhada com a perda de contato entre o músculo e o tendão (DE PALMA et al., 2011). Também foram encontradas alterações na JMT do músculo esternocleidomastoideo de ratos *Wistar* idosos, e características de atrofia muscular, além de mudanças na disposição e formato das invaginações sarcoplasmáticas e consequentemente nas evaginações sarcoplasmáticas com aumento de depósito de colágeno nesta região, através do método de microscopia eletrônica de transmissão (CIENA et al., 2012).

Estas alterações morfológicas são semelhantes às encontradas por meio da análise das características ultra-estruturais da JMT do músculo pterigoideo medial, que evidencia um remodelamento dessa área com o envelhecimento, em que a membrana sarcoplasmática e fibras colágenas estão apresentadas com suas áreas de interface comprometidas, devido à inatividade muscular que é resultado da atrofia muscular, e presumivelmente podem contribuir com rigidez e lesões musculares (CIENA et al., 2010).



Com o propósito de observar se a remobilização articular sem o treinamento, deixando os animais soltos na gaiola, o que possivelmente reverteria os efeitos ocasionados pela imobilização, o grupo I/NT demonstrou discreto remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de delgadas fibras colágenas. Na região distal da célula muscular, foram observados a presença de sarcômeros em séries realinhados em relação ao eixo longitudinal da JMT. As invaginações sarcoplasmáticas revelaram-se curtas e ramificadas, predispondo a região de JMT à lesões pela diminuição da área de contato, o que também foi descrito em estudo recente em que ratas foram submetidas a um protocolo de ovariectomia, em que foram notadas características de atrofia muscular com aumento do depósito de colágeno e dessaranjo das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas em toda interface miotendínea (SIERRA et al., 2018).

A imobilização causa mudanças degenerativas na junção miotendínea, que, por sua vez, diminui sua resistência à tração e pode predispor a ruptura durante atividades. Em contrapartida, no grupo I/T, foram observados extenso remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de longas fibras colágenas. Na região distal da célula muscular, foram observados a presença de sarcômeros em séries realinhados em relação ao eixo longitudinal da JMT. As invaginações sarcoplasmáticas revelaram-se espessas e maiores comprimentos, apresentando intercomunicações, e as evaginações delimitados pelo sarcolema, e reestruturação e alinhamento das linhas Z dos sarcômeros adjacentes à JMT, o que também foi observado em estudo sobre os efeitos da sarcopenia que induzem à atrofia muscular perante protocolo de ovariectomia, em que no grupo Ovariectomizado/Treinado houve uma reorganização e reestruturação da interação das invaginações e evaginações em toda interface miotendínea, além do remodelamento e reajuste dos feixes miofibrilares e fibrilas de colágeno do tendão com a presença de fragmentos celulares citoplasmáticos de tenócitos em toda área da JMT (SIERRA et al., 2018). A reabilitação de disfunções músculo-esqueléticas pelo exercício aquático tem demonstrado ser efetiva, além de prevenir diversas patologias. Os efeitos desta intervenção são variados e dependentes de fatores extrínsecos como duração, tipo e intensidade do exercício de acordo com a especificidade do indivíduo. Em consequência desses fatores, apresentam-se diversos efeitos fisiológicos capazes de promover um reparo tecidual devido ao aumento da circulação periférica e

consequentemente um aumento no suprimento de nutrientes do músculo ativo (DEGANI, 1998; MEDEIROS et al., 2004).

O exercício aeróbio tem a capacidade de provocar alterações morfológicas na JMT, e a sua aplicabilidade em situações patológicas específicas confirma tanto seu caráter preventivo quanto de reabilitação neste estudo em que foi capaz de reverter os efeitos deletérios da imobilização articular através do protocolo de natação. O exercício aeróbio induziu ao aumento da quantidade de interdigitações, na área de contato entre o tendão e o músculo, portanto uma melhor resistência à tensão, pela reorganização da arquitetura proteica presente na JMT, que pode assim adaptar-se às forças de cisalhamento, se necessário aumentando a quantidade de invaginações e evaginações, suas distribuições e estruturas, que também é constatado em estudo que seguiu um protocolo de exercício aeróbio moderado (CURZI et al., 2015; CURZI et al., 2016).

Nosso estudo também evidenciou que os sarcômeros proximais e distais sofrem alterações no comprimento, de acordo com a intervenção empregada. No Tibial Anterior, os sarcômeros proximais e distais do Grupo I/NT apresentaram comprimento maior em relação aos Grupo I e I/T. Confirmando esse achado, a comparação entre o Grupo I/NT e o Grupo I apresentou grande magnitude em relação ao tamanho do efeito, bem como em relação ao Grupo I/T dos sarcômeros distais. Uma possível explicação para esta diferença em relação ao Grupo I é devido a alterações que ocorreram mediante ao processo de atrofia ocasionada pelo protocolo de imobilização articular (RUDRAPPA et al., 2016).

Existem quatro vias proteolíticas que ao terem suas atividades aumentadas podem contribuir para a atrofia muscular: a via das catepsinas ou lisossomais, via das calpaínas dependentes de cálcio, via das caspases e via da ubiquitina proteassoma ATP-dependente (MACHADO, 2009). Na via proteolítica lisossomal, existem as proteases catepsinas B, D, H e L e outras hidrolases ácidas, presentes nos lisossomos. As catepsinas não degradam proteínas citosólicas, como as proteínas miofibrilares, no entanto, são responsáveis principalmente pela degradação de proteínas de membrana como receptores, canais de íons e transportadores, além de proteínas ubiquitinadas (JACKMAN & KANDARIAN, 2004, MACHADO, 2009). As fibras músculo-esqueléticas contêm as calpaínas -1,-2 e -3. Quando há elevação da concentração do cálcio intracelular, as calpaínas presentes no disco Z do sarcômero

podem ser ativadas, sendo capazes de degradar proteínas importantes que constituem o sarcômero tais como a nebulina, titina, proteína-C, vinculina. Com a clivagem da titina, proteína que mantém o alinhamento do sarcômero, ocorre a liberação das miofibrilas para serem ubiquitinadas e degradadas pelo proteassoma (JACKMAN & KANDARIAN, 2004, ZHANG et al., 2006). Outra via proteolítica importante é a via das caspases, responsável pela apoptose, ou morte celular programada, de modo que as caspases tornam as proteínas miofibrilares disponíveis para a ubiquitinação, uma vez que o sistema proteolítico ubiquitina proteassoma não é capaz de degradar proteínas intactas. (MACHADO, 2009). A via da ubiquitina/proteassoma é o sistema proteolítico celular que está intimamente relacionado à perda de massa muscular, sendo responsável pela degradação da maioria das proteínas celulares. É importante observar que para a atuação dessa via é necessária a ação primária da via das calpaínas e/ou caspases. A perda de massa muscular é caracterizada pelo aumento da proteólise por via da ubiquitina / proteassoma, aumentando a conjugação da ubiquitina às proteínas do músculo e um aumento da regulação da proteína ubiquitina-ligases (VOGES et al, 1999).

Nesse contexto, a degradação de proteínas miofibrilares ocorre através da atividade do proteassoma, por meio da adição de uma cadeia de poliubiquitina na proteína a ser degradada (substrato), sendo esse processo altamente modulado. Isso ocorre pela interação de três enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1) que ativa a ubiquitina com gasto de ATP, enzima de conjugação-transporte (E2) que forma um complexo poliubiquitina, e enzima ubiquitina-ligase (E3). O proteossoma (20S ou 26S) é um complexo composto por uma ou três grandes enzimas com a função de degradar proteínas desnecessárias ou danificadas da célula. Inicialmente ocorre a ativação da ubiquitina pela E1 e, em uma reação dependente de energia, é transferida da E2. Ao se formar um complexo ativado, se liga a E3, que por sua vez reconhece o substrato (ubiquitinação) para ser degradado, devido ao domínio FBox das moléculas. Assim as ligases E3 ubiquitinam tipos específicos de proteínas determinando quais são alvos para a degradação pelo proteossoma (VOGES et al, 1999; GOMES et al., 2001, JACKMAN & KANDARIAN, 2004, ZHANG et al., 2006).

Com isto, a imobilização de um segmento é utilizada clinicamente no tratamento de lesões musculares, tendíneas, ligamentares e osteo-articulares. Assim, como consequência deste processo, ocorre o surgimento de fibrose intramuscular, perda de extensibilidade e contractilidade, que por sua vez, reduz a geração e

transmissão da força muscular (CURZI et al., 2013). Com isso, a capacidade do músculo de tracionar e tensionar a articulação após imobilização diminuem acentuadamente, o que poderia explicar essas alterações nos sarcômeros (CURZI et al., 2013; JÄRVINEN et al., 1977). Além disto, desorganização de miofilamentos, distorção ou ausência de linhas Z também são observados nessas condições (CURZI et al., 2013).

Somado a isto, quanto a diferença em relação ao Grupo I/NT, o possível remodelamento na área da JMT em virtude do protocolo de reabilitação pode explicar tal achado (JAKOBSEN et al., 2018) pois a taxa de remodelamento das fibras musculares nesta região é muito alta.

Em adição, observamos que os sarcômeros distais do Grupo T apresentaram comprimento menor em relação ao Grupo S, com grande magnitude do tamanho do efeito. Isto possivelmente indica que esteja ocorrendo um processo de adição de sarcômeros em séries no grupo submetido ao protocolos de reabilitação (PEVIANI et al., 2018; SIERRA et al. 2018; KINNEY et al., 2017; BUTTERFIEL et al., 2005). Em um estudo realizado por Peviani e colaboradores (2018) teve como objetivo avaliar a expressão de colágenos, sarcomerogênese, atividade de metaloproteinases e expressão gênica de reguladores da matriz extracelular (MEC) no músculo sóleo de ratos submetidos a diferentes períodos de alongamento. O músculo sóleo foi submetido a 10 séries de alongamento passivo pelo período de 10 dias ou 15 dias. Foram analisados sarcomerogênese muscular, área da seção transversal e níveis de mRNA em colágeno (tipo I, III e IV), fator de crescimento tecidual (CTGF), fator de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e lisil oxidase (LOX). O alongamento passivo, em ambos os períodos de tempo mitigou o depósito de COL-I no músculo sóleo de ratos. Em contrapartida, 10 dias de estiramento passivo induziram a síntese COL-I e COL-III, com concomitante aumento da expressão TGF- $\beta$ 1 e CTGF ao nível da transcrição. Estas respostas podem estar associadas a um menor níveis de LOX nos músculos submetidos a 10 sessões de alongamento passivo. Além disso, a sarcomerogênese foi observada após 15 dias de alongamento, sugerindo que são respostas às adaptações musculares induzidas pelo alongamento.

No que tange os dados dos sarcômeros proximais e distais do músculo Sóleo, o Grupo I/T apresentou comprimento maior que Grupo I/NT, que foi maior que o Grupo I. Estes achados apresentaram grande magnitude em relação ao tamanho do efeito. Uma provável explicação para esta divergência quando comparado aos dados do

músculo Tibial Anterior, seja devido a predominância do tipo de fibra muscular em cada um dos músculos (MINAMOTO et al., 2005). Uma vez que em nosso estudo, foi selecionado o protocolo de natação por 60 min para a reabilitação dos roedores, esta intervenção propicia maiores adaptações as fibras do tipo I, que são mais presentes no músculo Sóleo do que no Tibial Anterior.

Nesta perspectiva, também analisamos os comprimentos e espessuras das invaginações e evaginações dos músculos Tibial Anterior e Sóleo. Pudemos observar que no músculo Tibial Anterior, o comprimento das invaginações do Grupo S foi maior em relação aos Grupos T e I, que em sua comparação em relação ao tamanho do efeito apresentaram grande magnitude. Estes dados parcialmente vão de encontro com o estudo realizado por Curzi e colaboradores (2013), no qual foi observado que a suspensão da pata traseira de ratos induziu a alterações morfológicas geradas pela atrofia muscular na região da JMT. Os autores também verificaram que no grupo sedentário, longas e diversas interdigitações do tendão penetram no tecido muscular, paralelamente à orientação dos miofilamentos, enquanto que após a suspensão as invaginações e evaginações diminuíram em quantidade e se tornaram mais curtas.

Somado a estes dados, verificamos maior área de contato e, conseqüentemente, maior resistência na interface miotendíneas dos Grupos I/NT e I/T em comparação ao Grupo I, sendo que a comparação do Grupo I vs. I/T também apresentou grande magnitude do tamanho do efeito. Nossos dados vão de encontro com os de Sierra e colaboradores (2018), nos quais em estudo sobre os efeitos da natação sobre a região da JMT de ratas ovariectomizadas, notaram extenso remodelamento com reestruturação através do aumento da área de contato tecidual, organização extensiva, arranjo em paralelo e aumento do comprimento das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas.

Neste sentido, a perda de massa e função muscular relacionada a processos como envelhecimento, desuso e imobilização devido a recuperação de uma lesão afetam predominantemente os membros inferiores. Deste modo, a região que pode estar mais sujeita ao comprometimento de sua funcionalidade com estes processos é a JMT (NIELSEN et al., 2018). Assim, estudos analisando como os processos de reabilitação podem adaptar e recuperar a JMT podem contribuir com a menor incidência de lesões e reinjúria de membros inferiores, e por conseqüência, beneficiar diversas populações como idosos, atletas e portadores de lesões osteomusculares e patologias neurológicas.

Dentro desse contexto, a literatura também apresenta estudos com humanos submetidos à protocolos de reabilitação, pois a JMT apresenta alto risco de lesões por esforços, devido às transferências de forças através desta estrutura. O risco de lesões é significativamente reduzido pelo treinamento de resistência, indicando um remodelamento na área da JMT. Em estudo de Jakobsen et al., (2018) foram investigadas as alterações que ocorrem nesta área perante o treinamento de resistência. Em 8 indivíduos, foram retiradas amostras da JMT do semitendinoso e grácil e foram coradas imuno-histoquimicamente por mionúcleos (DAPI), fibroblastos (TCF7L2) e células satélites (CD56). Como resultado, as fibras musculares adjacentes à JMT continham mionúcleos localizados centralmente e metade das fibras musculares foram positivas para CD56. O número de células satélites e os fibroblastos não foram predominantes na área da JMT, porém foram observados no ventre muscular, o que demonstra a capacidade de regeneração do músculo.

Nesse sentido, observamos a importância de estudar novos protocolos de reabilitação com exercícios físicos e suas consequências nas alterações morfológicas estruturais e ultraestruturais do ventre muscular e da JMT perante a imobilização e reabilitação articular. O protocolo de natação empregado no presente estudo demonstrou ser efetivo para reverter os efeitos deletérios da imobilização articular, reestabelecendo as condições morfológicas do músculo sóleo e tibial anterior. Portanto é um protocolo que poderia ser empregado em humanos na prática clínica pela natação, para a reabilitação morfofuncional do aparelho locomotor.

## 8 CONCLUSÃO

De acordo os resultados parciais apresentados acerca das alterações das características morfológicas do ventre e da junção miotendínea do tibial anterior e sóleo de ratos *Wistar* adultos submetidos à imobilização e remobilização por protocolo de natação, conclui-se que:

1. O treinamento de natação mostrou-se eficaz para manutenção do peso corporal, enquanto que o protocolo de Imobilização está associado à diminuição da massa corporal, e a imobilização articular resulta em redução da massa muscular como consequência do processo de atrofia do músculo esquelético;
2. As características morfológicas do grupo T evidenciaram o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares, envolvendo as fibras musculares e tenócitos no endomísio;
3. No grupo I foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares, capilares, e este envolvendo as fibras musculares que apresentaram atrofia;
4. No grupo I/NT foi observado aumento no tecido conjuntivo.
5. No grupo I/T foi evidenciado o perimísio espesso, com a presença de fusos extracelulares, e o perimísio envolvendo as fibras musculares;
6. A presença de núcleos centralizados na região da JMT principalmente nos grupos I e I/T, indicando aumento da atividade celular devido aos protocolos de imobilização e treinamento de natação;
7. Em relação aos aspectos ultra estruturais do grupo S na região da JMT foram evidenciadas as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas que apresentaram formatos irregulares, e intercomunicações dispostas nesta região de interface paralelamente entre os feixes de miofilamentos em proximidade às linhas Z dos sarcômeros distais;
8. No grupo T na região da JMT foram evidenciadas invaginações sarcoplasmáticas espessas e amplas dispostas em conformidade com as evaginações;
9. No grupo I foram observados na região da JMT amplo processo degenerativo com desorganização celular, com diminuição drástica dos feixes de miofilamentos e desorganização dos sarcômeros em séries residuais;

10. No grupo I/NT foram observados discreto remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de delgadas fibras colágenas. Na região distal da célula muscular, foram observados a presença de sarcômeros em séries;
11. No grupo I/T foram observados extenso remodelamento e reorganização na área da JMT, pela presença de longas fibras colágenas. Presença de sarcômeros em séries realinhados. As invaginações sarcoplasmáticas revelaram-se espessas e maiores comprimentos, apresentando intercomunicações, e as evaginações delimitados pelo sarcolema, e reestruturação e alinhamento das linhas Z dos sarcômeros adjacentes à JMT;
12. No músculo Tibial Anterior foi observado que o protocolo de natação ocasiona sarcomerogênese na região da JMT, pelas alterações que ocorrem nos sarcômeros proximais e distais, enquanto que a imobilização articular induz à atrofia dos sarcômeros presentes nessa região. No músculo Sóleo foi observado o treinamento após a imobilização é efetivo para reorganizar os sarcômeros existentes na região da JMT, e a reabilitação livre ocasiona um remodelamento dos sarcômeros distais e proximais;



## REFERÊNCIAS

- AHTIKOSKI, A. M.; KOSKINEN, S. O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; TAKALA, T. E. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta physiologica scandinavica**, Stockholm, v. 172, n.2, p. 131-140, 2001.
- AMIEL, D.; KUIPER, S. D.; WALLACE, C. D.; HARWOOD, F. L.; VANDEBERG, J. S. Age-related properties of medial collateral ligament and anterior cruciate ligament: a morphologic and collagen maturation study in the rabbit. **Journal of gerontology**, v. 46, n. 4, p. B159-65, 1991.
- AMIEL, L.; FRANK, C.; HARWOOD F.; FRONEK J.; AKESON W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. **Journal of orthopaedic research**, v.1, p. 257-265, 1984.
- AOKI, M. S.; LIMA, W. P.; MIYABARA, E. H.; GOUVEIA, C. H. A.; MORISCOT, A. S. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. **Clinical nutrition**, Edinburgh, v. 23, p. 1176- 1183, 2004.
- APPELL, H. J. Muscular atrophy following immobilization: a review. **Sports Medicine**, v.10 (1), p.42-58, 1990.
- ARRUDA, E. M.; CALVE, S.; DENNIS, R. G. MUNDY, K. BAAR, K. Regional variation of tibialis anterior tendo mechanics is lost following denervation. **Journal of applied physiology**, Washington, v. 101, p. 1113-1117, 2006.
- BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. **American Journal of physical medicine & rehabilitation**, v.81, p. S40-51, 2002.
- BANZ, W. J.; MAHER, M. A.; THOMPSON, W. G.; BASSETT, D. R.; MOORE, W.; ASHRAF, M.; KEETER, D. J.; ZEMEL, M. B. Effects of resistance versus aerobic training on coronary artery disease risk factors. **Experimental biology and medicine**, v. 228, p. 434-440, 2003.
- BELL, R. A. V.; AL-KHALAF, M.; MEGENEY, L. A. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. **Skeletal muscle**, v.6:16, p.1-12, 2016.
- BENJAMIM, M.; EVANS, E. J.; COPP, L. The histology of tendo attachments to bone in man. **Journal of anatomy**, v. 149, p. 89-100, 1986.
- BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. **International review of cytology**, v. 196, p. 85-130, 2000.
- BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. **Cold spring harbor laboratory press**, v.4:a008342, p.1-16, 2012.
- BOLINA, C. S.; BOLINA-MATOS, R. S.; ALVES, P. H. M.; CURY, D. P.; CIENA, A. P.; WATANABE, I. Three-dimensional aspects of the structural characteristics and kidney angioarchitecture of adult and aged Wistar rats: a scanning electron microscopy study. **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 5, p. 538-544, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 258-254, 1976.
- BUTLER, D.L.; JUNCOSA, N.; DRESSLER, M.R. Function efficacy of tendon repair processes. **Annual review of biomedical engineering**, v.6, 303-329, 2004.
- BUTTERFIELD, T. A.; LEONARD, T. R.; HERZOG, W. Differential serial sarcomere number adaptations in knee extensor muscles of rats is contraction type dependent. **Journal of applied physiology**. V. 99(4):1352-8, 2005.
- CAI D.; FRANTZ J.D.; TAWA N.E.; MELENDEZ P.Q.; LIDOV H.; HASSELGREN G. W.; et al. IKK/betaNF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, V.119, p. 285-298; 2004.
- CAMPION, M. R. **Adult Hydrotherapy**: a practical approach. Oxford: Heinemann medical Books, 1990.
- CAMPOS, G. E. R.; LUECKE, T. J.; WENDELN, H. K.; TOMA, K.; HAGERMAN, F. C.; MURRAY, T. F. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **European Journal of Applied Physiology**, v.88, p.50-60, 2002.
- CELICHOWSKI, J. MROWCZYŃKI, W.; KRUTKI, P.; GORSKA, T.; MAJCZYŃSKI, H.; SLAWWINSKA, U. Changes in contractile properties of motor units of the rat medial gastrocnemius muscle after spinal cord transaction. **Experimental physiology**, Cambridge, v. 91, n.5, p. 887-895, 2006.
- CHANG, H. N.; PANG, J. H.; CHEN, C. P.; KO, P. C.; LIN, M. S.; TSAI, W.C.; YANG, Y. M. The effect of aging on migration, proliferation, and collagen expression of tenocytes in response to ciprofloxacin. **Journal of orthopaedic research**, v.30, n.5, p.764-8, 2012.
- CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiology review**, v. 84, p. 209-238, 2004.

- CHEN, J. C. J.; GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 1:101, 2003.
- CHOPARD, A.; PONS, F.; MARINI, J. F. Cytoskeletal protein contents before and after hindlimb suspension in a fast and slow rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.280 (2), p.R323–R330, 2001.
- CIABATTARI, O.; DAL PAI, A.; DAL PAI, V. Efeito da natação associado a diferentes dietas sobre o músculo tibial anterior do rato: estudo morfológico e histoquímico. **Revista brasileira da medicina do esporte**, v. 11, n. 12, p. 121-125, 2005.
- CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; ALVES, P. H. M.; BOLINA-MATOS, R. S.; DIAS, F. J.; ISSA, J. P. M.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Histochemical and ultrastructural changes of sternomastoid muscle in aged wistar rats. **Micron**, [s.l.], v. 42, n.8, p.871-876, 2011.
- CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; BOLINA, C. S.; BOLINA-MATOS, R. S.; RICI, R. E. G.; SILVA, M. C. P.; MIGLINO, M. A.; WATANABE, I. Ultrastructural features of the myotendinous junction of the sternomastoid muscle in wistar rats: from newborn to aging. **Microscopy research and technique**, v.75, p.1292–1296, 2012.
- CLARK, K. A.; MCELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. C.; GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual review of cell and developmental biology**. Palo Alto, v.18, p. 637–706, 2002.
- COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; SALVINI, T. F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 35, n. 11, p.1329-1332, 2002.
- CUNHA, D. M.; NASCIMENTO, C. M.; ARTIFONM E. L.; FERRARI, D.; RIBEIRO, L. F. C. FONTANESI, L. B.; BERTOLINI, G. R. F. Evaluation of rats soleus muscle submitted to remobilization protocol with therapeutic ultrasound associated with static stretching. **Journal of morphological science**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 2012.
- CURZI, D.; BALDASSARRI, V.; MATTEIS, R.; SALAMANNA, F.; BOLOTTA, A.; FRIZZIERO, A.; FINI, M.; MARINI, M.; FALCIERI, E. Morphological adaptation and protein modulation of myotendinous junction following moderate aerobic training. **Histology and histopathology**, n. 30, p.465-472, 2015.
- CURZI, D.; LATTANZI, D.; BURATTINI, S.; TIDBALL, J. G.; FALCIERI, E. Morphological changes of myotendinous junction generated by muscle disuse atrophy. **Microscopie**, p. 46-53, 2013.
- CURZI, D.; SALUCCI, S.; MARINI, M.; ESPOSITO, F.; AGNELLO, L.; VEICSTEINAS, A.; BURATTINI, S.; FALCIERI, E. How physical exercise changes rat myotendinous junctions. **European journal of histochemistry**, v.56, p.117–122, 2012.
- CURZI, D.; SARTINI, S.; GUESCINI, M.; LATTANZI, D.; DI PALMA, M.; AMBROGINI, P.; SAVELLI, D.; STOCCHI, V.; CUPPINI, R.; FALCIERI, E. Effect of different exercise intensities on the myotendinous junction plasticity. **Plos One**, v. 11(6), 2016.
- DE PALMA, L.; MARINELLI, M.; PAVAN, M.; BERTONI-FREDDARI, C. Involvement of the muscle-tendon junction in skeletal muscle atrophy: an ultrastructural study. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**. V.52, p.105-109, 2011.
- DEGANI, A. M. Hidroterapia: os efeitos físicos, fisiológicos e terapêuticos da água. **Fisioterapia em movimento**, v.11, p.91-106, 1998.
- DEGENS, H.; ALWAYS, S. E. Control of muscle size during disuse, disease, and aging. **Int. j. sports med**. V.27, p.94-99, 2006.
- DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, M. R.; VILORIA, M. I. V.; NATAI, A. J.; BARBOSA, A. L. T.; MONTEIRO, B. S.; PINHEIRO, L. C. P. Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 363-370, 2007.
- DORAL, M. N.; ALAM, M.; BOZKURT, M. TURHAN, E.; ATAY, O. A.; DONMEZ, G.; MAFFULLI, N. Functional anatomy of the Achilles tendon. **Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy**, v. 18, n. 5, p. 638-643, 2010.
- DURO, C. C.; CIENA, A. P.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; RIGHETTI, M. M. S.; GRISOLIA, D. F.; ISSA, J. P.; DA SILVA, M. C. P.; WATANABE, I. Qualitative study of young, adult, and aged wistar rats temporomandibular synovial membrane employing light, scanning, and transmission electron microscopy. **Microscopy Research and technique**, v.75, p.1522-1527, 2012.
- ERTBJERG, P.; PUOLANNE, E. Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review. **Meat Science**, v. 132, p.139-152, out. 2017. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.261>.
- FERREIRA, A. T. Fisiologia da contração muscular. **Revista Neurociências**, v. 13, n.3, p.60-62, 2005.

- FLANN, K. L. et al. Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain? **Journal of experimental biology**, [s.l.], v. 214, n. 4, p.674-679, 2011.
- FUJITA, N.; MURAKAMI, S.; ARAKAWA, T.; MIKI, A.; FUJINO, H. The combined effect of electrical stimulation and resistance isometric contraction on muscle atrophy in rat tibialis anterior muscle. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v.11 (2), p.74-9, 2011.
- FUKUDA, SO-ICHIRO. The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy, and hypertrophy, **Journal of Biochemistry. Review**, Osaka, Japan, p.1-22, 2018.
- GALVÃO, M. R.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I. V.; NATALI, A. J.; BARBOSA, A. L.; MONTEIRO, B. S.; PINHEIRO, L. C.; DEL CARLO, K. N. Aspectos clínicos e morfofisiológicos do joelho de ratos após imobilização prolongada e remobilização. **Revista ceres**, v. 53, n. 308, p. 495-505, jul/ago. 2006.
- GAYRAUD-MOREL, B.; CHRÉTIEN, F.; TAJBAKHS, S. Skeletal muscle as a paradigm for regenerative biology and medicine. **Regenerative medicine**, [s.l.], v.4, n. 2, p.293-319, 2009.
- GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, p.1974-1984, 2005.
- GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **International journal of biochemistry & cell biology**, v.37, p.1974-1984, 2005.
- GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **Journal of anatomy**, v.194, p. 323-334, 1999.
- GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A., GOLDBERG A.L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V.98, p.14440-14445, 2001.
- GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; TORENSMA, R.; VON DEN ROFF, J. W. Skeletal muscle development and regeneration. **Stem cells and development**, v. 16, n.5, p. 857-868, 2007.
- HENDERSON, C. A.; et al. Overview of the muscle cytoskeleton. **Comprehensive physiology**, [s.l.], p.891-944, 2017.
- HERRMANN, H.; BÄR, H.; KREPLAK, L.; STRELKOV, S. V.; AEBI, U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. **Nature reviews molecular cell biology**. London, v.8, p. 562-573, 2007.
- HOPPELER, H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. **International journal of sports medicine**. V.7, p.187-204,1986.
- IYOMASA, M. M.; et al. Ultrastructural characteristics of the gerbil pterygoid medial muscle after experimental occlusal alteration. **Micron**, [s.l.],v.40, n. 2, p.206-211, 2009.
- JACKMAN R.W.; KANDARIAN S.C. The molecular basis of muscle atrophy. **The American Journal of Physiology**, v. 287, p.C834-843, 2004.
- JACKSON, J. R.; KIRBY, T. J.; FRY, C. S.; COOPER, R. L.; MCCARTHY, J. J.; PETERSON, C. A.; VERSTEEGDEN, E. E. D. Reduced voluntary running performance is associated with impaired coordination as a result of muscle satellite cell depletion in adult mice. **Skeletal Muscle**, v.5, n. 41, p. 1-17, 2015.
- JAKOBSEN, J. R.; JAKOBSEN, N. R.; MACKEY, A. L.; KOCH, M.; KJAER, M.; KROGSGAARD; M. R. Remodeling of muscle fibers approaching the human myotendinous junction. **Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports**, [s.l.], v. 28, n. 8, p.1859-1865, 2018. Wiley.
- JÄRVINEN, M. Immobilization effect on the tensile properties of striated muscle: an experimental study in the rat. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, l58, 123 -127, 1977.
- JÄRVINEN, T. A. H.; JÓZSA, L.; KANNU, P.; JÄRVINEN, T. L. N.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles: An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **Journal of muscle research and cell motility**, London, v. 23, p. 245-254, 2002.
- JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THÖRING, J.; REFFY, A.; JÄRVINEN, 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 Joint and Surgery**, v.72-B, p.293-7, 1990.
- JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The histochemical journal**, v. 11, n.4, p. 447-455, 1979.
- KADI, F.; JOHANSSON, F.; JOHANSSON, R.; SJOSTROM, M.; HENRIKSSON, J. Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. **Histochemical cell biology**, v.121, p.329-334, 2004.
- KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 10, n.6, p. 312-320, 2000.

- KANNUS, P.; JOZSA, L.; JÄRVINEN, T. L.; KVIST, M.; VIENO, T.; JÄRVINEN, T. A.; NATRI, A.; JÄRVINEN, M. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **Journal applied of physiology**, Washington, v. 84, p. 1418-1424, 1998a.
- KANNUS, P.; JOZSA, L.; KVIST, M.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. The effect of immobilization on myotendinous junction: an ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. **Acta physiologica Scandinavica**, v.144, p.387-394, 1992.
- KINNEY, M. C.; DAYANIDHI, P. T.; DYKSTRA, P. B.; McCARTHY, J. J.; PETERSON, C. A.; LIEBER, R. L. Reduced skeletal muscle satellite cell number alters muscle morphology after chronic stretch but allows limited serial sarcomere addition. **Muscle & Nerve**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.384-392, 28 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.25227>.
- KJÆR, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiological reviews**, v. 84, n.2, p. 649-698, 2004.
- KJÆR, M.; KROGSGAARD, M.; MAGNUSSON, P.; ENGBRETSSEN, L.; ROOS, H.; TAKALA, T.; WOO, S. L-Y. Textbook of sports medicine. Basic science and clinical aspects of sports injury and physical activity. **Sports medicine**, Oxford, 2003.
- KOJIMA, H.; SAKUMA, E.; MABUCHI, Y.; MIZUTANI, J.; HORIUCHI, O.; WADA, I.; HORIBA, M.; YAMASHITA, Y.; HERBERT, D. C.; SOJI, T.; OTSUKA, T. Ultrastructural changes at the myotendinous junction induced by exercise. **Journal of orthopaedic science**, v.13, p. 233-239, 2008.
- KOSTROMINOVA, T. Y.; CALVE, S.; ARRUDA, E. M.; LARKIN, L. M. Ultrastructure of myotendinous junctions in tendon-skeletal muscle constructs engineered in vitro. **Histology and histopathology**, v. 24, n. 5, p. 541-550, 2009.
- KRAUSE-NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; NUCCI, R. A.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Effects of strength training and anabolic steroid in the peripheral nerve and skeletal muscle morphology of aged rats. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v.1, p. 1, 2017.
- KUNZ, R. I.; CORADINI, G. J.; SILVA, L. I.; KAKIHATA, M. M.; BRANCALHÃO, C. C.; MEIRE, R.; BERTOLINI, G. R. F.; RIBEIRO, C.; FÁTIMA, L. Morfologia dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos *Wistar* imobilizados e remobilizados em meio aquático. *ConScientiae Saúde*, v. 13, n. 4, p. 595-602, 2014.
- KVIST, M.; HURME, T.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T.; MAUNU, V. M.; JOZSA, L.; JÄRVINEN, M. Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. **The american journal of sports medicine**, Baltimore, v. 23, n. 3, p. 359-364, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 15, n. 227, p. 680-685, 1970.
- LAW, D. J.; LIGHTNER, V. A. Divalent cation-dependent adhesion at the myotendinous junction: ultrastructure and mechanics of failure. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.14(2), p.173-185, 1993.
- LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. J. **Nutr.** V.129, p.227S-237S, 1999.
- LEVITSKY, D. I. Actomyosin systems of biological motility. **Biochemistry**. Washington, v. 69, p.1177-1189, 2004.
- LIBERANO, D. J. A. **Tratado de anatomia sistêmica aplicada**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 288p.
- LIMA, S. C.; CAIERÃO, Q. M.; DURIGAN, J. L. Q.; SCHWARZENBECK, A.; SILVA, C. A.; MINAMOTO, V. B. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v.11(4), p.297-302, 2007.
- LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. Biomechanics of tendon injury and repair, **Journal of biomechanics**, v. 37, p. 865-877, 2004.
- LOITZ, B. J.; ZERNICKE, R. F.; VAILAS, A. C.; KODY, M. H.; MEALS, R. A. Effects of short-term immobilization versus continuous passive motion on the biomechanical and biochemical properties of the rabbit tendon. **Clinical orthopaedics and related research**, Philadelphia, v. 244, n. 6, p. 265-271, 1989.
- MACEDO-FILHO, A.; LAVEDONIO J. C.; CASTRO, M.; CARDOSO, M. G. Tratamento cirúrgico para úlceras pré-tibiais utilizando retalho de músculo sóleo com fluxo invertido. **An paul med cir**, v.122, p.5-10, 1995.
- MACHADO J.; KRINSKI K.; ELSANGEDY H.M.; CIESLAK F.; LOPES G.; GOMES A.R.S. Vias de sinalização intracelular na atrofia muscular e no treinamento resistido. **Fisioterapia em Movimento**. Curitiba, v.22, p.383-393, 2009.
- MACHIDA, S.; BOOTH, F. W. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. **Medicine & science in sports & exercise**, v.36, p.52-59, 2004.

- MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fiber. **The journal of biophysical and biochemical cytology**, v.9, p. 493-495, 1961.
- MCCARTHY, J. J.; MULA, J.; MIYAZAKI, M.; ERFANI, R.; GARRISON, K.; FAROOQUI, A. B.; SRIKUEA, R.; LAWSON, B. A.; GRIMES, B.; KELLER, C.; VAN ZANT, G.; CAMPBELL, K. S.; ESSER, K. A.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E.; PETERSON, C. A. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. **Development**. V.138, p.3657-66, 2011.
- MCCRAW, J. B.; ARNOLD, P. G. **Atlas of muscle and musculocutaneous flaps**. Norfolk, Hampton Press, 1987.
- MCNULTY, A. L.; OTTO, A. J.; KASPER, C. E.; THOMAS, D. P. Effect of recovery mode following hind-limb suspension on soleus muscle composition in the rat. **International journal of sports medicine**, v. 13, n. 1, 6-14, 1992.
- MEDEIROS, A.; , E. M.; GIANOLLA, R.; NEGRÃO, D. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Brazilian journal of medical biological research**, v. 37, p. 1909-17, 2004.
- MENON, T.; CASAROLLI, L. M.; CUNHA, N. B.; SOUZA, L.; ANDRADE, P. H. M.; ALBUQUERQUE, C. E.; BERTOLINI, G. R. F. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 segundos a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 13, n. 6, p. 407-410, 2007.
- MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.12(3), p.50-5, 2005.
- MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Mechanisms of muscle wasting—the role of the ubiquitin-proteasome pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 25, p. 1897-905, 1996.
- MITCHELL, P. O.; PAVLATH, G. K. Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells, **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, p.287(6), 2004.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. Anatomia orientada para a clínica. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011.
- NIELSEN, K. B.; LIL, N. L.; SHEARD, P. W. Age-related remodelling of the myotendinous junction in the mouse soleus muscle. **Experimental Gerontology**. V. 104, p. 52-59, 2018.
- NIYIBIZI, C.; SMITH, P.; SHULER, F.D.; GERGESCU, H. I.; GHIVIZZANI, S. C. JOHNSTONE, B.; ROBBINS, P.D.; EVANS, C.H. Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: Comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. **Arthritis & Rheumatism**, v.43, p. 1156-1164, 2000.
- OKAMOTO, T.; TORII, S.; MACHIDA, S. Differential gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase MAFbx/Atrogin-1 and MuRF1 in response to immobilization-induced atrophy of slow-twitch and fast-twitch muscles. **The Journal Of Physiological Sciences**, [s.l.], v. 61, n. 6, p.537-546, 8 set. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12576-011-0175-6>.
- OLIVEIRA, D. P.; PINHO, A. C. A.; DELISE, J. D. N.; NUNES, M. P.; DINIZ, L. B.; NETO, H. R.; SANTOS, H. B. S.; OLIVEIRA, V. N. O.; RIBEIRO, R. I. M. A. Efeito da natação associada a diferentes tratamentos sobre o músculo sóleo de ratos: estudo histológico e morfométrico. **Revista brasileira de medicina do esporte**, 2014. v. 20.
- ORLANDO, J. M. Vencendo a morte: como as guerras fizeram a medicina evoluir. **Matrix Editora**, p. 107-110, 2016.
- PATTERSON, M. F.; STEPHENSON, G. M.; STEPHENSON, D. G. Denervation produces different single fiber phenotypes in fast-and-slow-twitch hindlimb muscle of the rat. **American journal of physiology, Cell physiology**, Bethesda, v. 291, n.3, p. C518-C528, 2006.
- PESTANA, P. R. D.; ALVES, A. N.; FERNANDES, K. P. S.; JUNIOR, J. A. S.; FRANCA, C. M.; MARTINS, M. D.; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA-FERRARI, R. A., Efeito da natação na expressão de fatores regulatórios miogênicos durante o reparo do músculo esquelético de rato, **Revista brasileira medicina do esporte**, v. 18, n. 6, p. 419-422, 2012.
- PETTE, D.; STARON, R. S. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. **International review of cytology**, v. 170, p. 143-223, 1997
- PEVIANI, S. M.; GUZZONI, V.; PINHEIRO-DARDIS, C. M.; SILVA, Y. P.; FIORAVANTE, A. C. R.; SAGAWA, A. H.; DELFNO, G. B.; DURIGRAN, J. L. Q.; SALVINI, T. F. Regulation of extracellular matrix elements and sarcomerogenesis in response to diferent periods of passive stretching in the soleus muscle of rats. **Scientific Reports**, v. 8:9010, p. 1-9, 2018.
- POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C.; FREITAS, F. C.; PADULA, N.; MARTINEZ, E. Z.; MATTINELLO-SVERZUT, A. C. Efeitos morfológicos do retorno da sobrecarga após imobilização em alongamento de músculo esquelético de ratas. **Revista brasileira de fisioterapia**, v. 15, n.1, p. 73-79, 2011.

- QAHAR, M.; TAKUMA, Y.; MIZUNOYA, W.; TATSUMI, R.; IKEUCHI, Y.; NAKAMURA, M. Semaphorin 3A promotes activation of Pax7, Myf5, and MyoD through inhibition of emerin expression in activated satellite cells. **Febs Open Bio**, v.6, n. 6, p.529-539, 2016.
- QUINTANA, D. S. Statistical considerations for reporting and planning heart rate variability case-control studies. **Psychophysiology**, v.54(3), p.344-349, 2017.
- RIGOARD, P.; BAUCHE, S.; BUFFENOIR, K.; GIOT, J. P.; FAURE, J. P.; SCEPI, M.; RICHER, J. P.; LAPIERRE, F.; WAGER, M. Le support anatomique de la contraction musculaire. **Neurochirurgie**, v. 55, n. S1, p. S69-S82, 2009.
- ROCHA, W. A.; GOBBI, G. A.; ARAUJO, V. F.; SANTUZZI, C. H.; COUTINHO, G. C.; NOGUEIRA, B. V.; GONÇALVES, W. L. S. Alterações morfofuncionais musculares em resposta ao alongamento passivo em modelo animal de imobilização prolongada de membro posterior. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 16, n. 6, p. 450-454, 2010.
- RODRIGUEZ-GUZMAN, M. A. J.; SANTESTEBAN, E.; GAÑAN, Y.; MACIAS, D.; HURLE, J. M. Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic signaling. **Developmental biology**, v. 302, n. 1, p. 267-280, 2007.
- RUDRAPPA, S. S.; WILKINSON, D. J.; GREENHALFF, P. L.; SMITH, K.; IDRIS, I.; ATHERTON, P. J. Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. **Frontiers in Physiology**, v. 7:361, 2016.
- SALVINI, T. Plasticidade e adaptação postural dos músculos esqueléticos. **Cadeias musculares**. São Paulo, Manole, 2000.
- SCHAFER, E. S.; SYMINGTON, J.; BRYCE, T. H. **Quain's elements of anatomy**. Part II. 11th Ed. New York, Longman's Green and Co, 1924. P.67-70.
- SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical therapy**, v.81, p.1810-1816, 2001.
- SHAH, S. B.; PETERS, D.; JORDAN, K. A.; MILNER, D. J.; FRIDÉN, J.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R. L. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. **The Journal of Experimental Biology**, v.204, p.1703-10, 2001.
- SIERRA, L. R.; FAVARO, G.; CERRI, B. R.; ROCHA, L. C.; ALMEIDA, S. R. Y.; WATANABE, II-SEI; CIENA, A. P. Myotendinous junction plasticity in aged ovariectomized rats submitted to aquatic training. **Microscopy Research and Technique**, [s.l.], p.1-7, 24 abr. 2018. Wiley.
- SKINNER, A.; THOMPSON, A. **Duffield: exercícios na água**. Manole, São Paulo, 1988.
- SNIJDERS, T.; WALL, B. T.; DIRKS, M. L.; SENDEN, J. M.; HARTGENS, F.; DOLMANS, J.; LOSEN, M.; VERDIJK, L. B.; VAN LOON, L. J. Muscle disuse atrophy is not accompanied by changes in skeletal muscle satellite cell content. **Clinical Science (London)**. V.126, p. 557-66, 2014.
- SPIERTS, I.; AKSTER, H.; VOS, I.; OSSE, J. Local differences in myotendinous junctions in axial muscle fibres of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of experimental biology**, p.825-833, 1996.
- STANDRING, S.; ELLIS, H.; HEALY, J.; JOHNSON, D.; WILLIAMS, A. **Gray's Anatomy**. The anatomical basis of clinical practice. 39th Ed. New York, Elsevier, 2005. P.1499-500.
- SUETTA, C.; FRANDBSEN, U.; JENSEN, L.; JENSEN, M. M.; JESPERSEN, J. G.; HVID, L. G. Aging affects the transcriptional regulation of human skeletal muscle disuse atrophy. **Plos one**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.51238, 2012.
- TAJBAKSH, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. **Journal of internal medicine**, [s.l.], v.266, n.4, p.372-389, 2009.
- TAKALA, T. E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, Munksgaard, v. 10, n. 6, p. 321-325, 2000.
- TIDBALL, J. G.; CHAN, M. Adhesive strength of single muscle cells to basement membrane at myotendinous junctions. **Journal of applied physiology**, v.67, p.1063-109, 1989.
- TIDBALL, J. G.; SALEM, G.; ZERNICKE, R. Site and mechanical conditions for failure of skeletal muscle in experimental strain injuries. **Journal of applied physiology**, v. 74, n.3, p.1280-1286, 1993.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
- TROTTER, J. A. Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. **Comparative biochemistry and physiology – part a: molecular & integrative physiology**, v.133, n.4, p. 1127-1133, 2002.
- VOGES, D.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, p. 1015-1068, 1999.
- WATANABE, I.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. **Archivum histologicum japonicum**, v. 46, p. 173-182, 1983.

- WATANABE, T.; IMAMURA, Y.; HOSAKA, Y.; UEDA, H.; TAKEHANA, K. Graded arrangement of collagen fibrils in the equine superficial digital flexor tendon. **Connective tissue research**, v.48, p.332–337, 2007.
- WELSER, J. V.; ROONEY, J. E.; COHEN, N. C.; GURPUR, P. B.; SINGER, C. A.; EVANS, R. A. Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack alpha7 integrin and utrophin. **The american journal of pathology**, v. 175, p. 1545-1554, 2009.
- WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilised muscle. **Journal of anatomy**, London, v. 138, n.2, p. 343-50, 1983.
- YABLONKA-REUVENI, Z.; RIVERA, A. J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. **Developmental biology**, v. 161, p. 588-603, 1994.
- YAMASHITA, S.; MCGRATH, K. F.; YUKI, A.; TAMAKI, H.; KASUGA, N.; TAKEKURA, H. Assembly of transverse tubule architecture in the middle and myotendinous junctional regions in developing rat skeletal muscle fibers. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 28, n. 2-3, p. 141-151, 2007.
- ZAMORA, A. J.; CARNINO, A.; ROFFINO, S.; MARINI, J. F. Respective effects of hindlimb suspension, confinement and spaceflight on myotendinous junction ultrastructure. **Acta astronaut**, v.36, p.693-706, 1995.
- ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Medical Hypotheses**. V.11, p.1-12, 2006.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAL  
CEUA – IB – UNESP - CRC

### DECISÃO CEUA Nº 08/2017

Instituição: <b>UNESP – IB – CRC</b>	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 12.04.2017	

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Plasticidade tecidual na junção miotendínea do tibial anterior e sóleo de ratos wistar imobilizados e submetidos à remobilização aquática: análises morfológicas e moleculares**", protocolo nº 3132, sob responsabilidade de Juliana Cristina Barbosa (Pesquisadora Responsável) e Adriano Polican Ciena (Orientador) que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

**Subprojeto(s) vinculado(s):** ==.==

#### Colaboradores: -----

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **32ª reunião ordinária**, realizada em **07.06.2017**.

(x)	<b>Aprovou</b> o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
( )	Desde que <b>atendidas as pendências</b> apontadas na reunião (vide anexo), <b>aprova</b> o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
( )	<b>Referendou</b> o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
( )	Aprovou <b>retornar</b> ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
( )	<b>Não Aprovou</b> .
( )	<b>Retirou</b> , devido à permanência das pendências.

Vigência da autorização: 14/05/2017 a 14/05/2019

Finalidade: ( ) Ensino      (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: rattus novergicus (Wistar)      Número de animais: 60

Peso: 225 g      Idade: 90 dias      Sexo: machos

Origem dos animais.(Informações sobre o fornecedor): Biotério Central da UNESP- Câmpus de Botucatu

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC <input checked="" type="checkbox"/> Mestrado <input type="checkbox"/> Doutorado <input type="checkbox"/> Outros – (Iniciação Científica) <input type="checkbox"/> Pós- Graduação
---------------------	---

Rio Claro, 07/06/2017

**Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci**  
Coordenador

Instituto de Biociências – Seção Técnica Acadêmica

Avenida 24-A nº 1515 - CEP 13506-900 – Rio Claro - S.P. – Brasil - tel 19 3526-4105 - fax 19 3534-0009 - <http://www.rc.unesp.br>