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

**PLASTICIDADE TECIDUAL DOS SARCÔMEROS E JUNÇÃO
MIOTENDÍNEA DE RATOS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO
ARTICULAR E REMOBILIZAÇÃO AQUÁTICA: ANÁLISES
HISTOQUÍMICA, ULTRAESTRUTURAL E MORFOMÉTRICA**

LARA CAETANO ROCHA



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



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

LARA CAETANO ROCHA

**PLASTICIDADE TECIDUAL DOS SARCÔMEROS E JUNÇÃO
MIOTENDÍNEA DE RATOS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO
ARTICULAR E REMOBILIZAÇÃO AQUÁTICA: ANÁLISES
HISTOQUÍMICA, ULTRAESTRUTURAL E MORFOMÉTRICA**

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Humano e Tecnologias.

Rio Claro – SP

2020

R672p Rocha, Lara Caetano
Plasticidade tecidual dos sarcômeros e junção miotendínea de ratos submetidos à imobilização articular e remobilização aquática: análises histoquímica, ultraestrutural e morfométrica / Lara Caetano Rocha. -- Rio Claro, 2020
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Adriano Polica Ciena

1. Junção miotendínea. 2. Sarcômero. 3. Núcleo. 4. Atrofia muscular. 5. Remobilização aquática. 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 DOS SARCÔMEROS E JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DE RATOS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO ARTICULAR E REMOBILIZAÇÃO AQUÁTICA: ANÁLISES HISTOQUÍMICA, ULTRAESTRUTURAL E MORFOMÉTRICA

AUTORA: LARA CAETANO ROCHA

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 / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro



Prof. Dr. HI-SEI WATANABE
Universidade de São Paulo / Instituto de Ciências Biomédicas, ICBIII - SP



Prof. Dr. ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA
Departamento de Educação Física / IB Rio Claro

Rio Claro, 19 de fevereiro de 2020

Dedicatória

*Dedico a minha família pela fé e confiança
inestimável, e ao Daniel, por todo amor e parceria
nesta incrível jornada da vida.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades de aprendizado e sabedoria neste percurso;

Ao meu grande amor, Daniel, é imensurável a gratidão que sinto por toda compreensão, auxílio, parceria durante os longos dias e noites de estudo e por todo amor que me permitiu continuar;

Aos meus pais, Vânia e Job, agradeço todo apoio financeiro e emocional durante esses anos;

Aos meus avós, Alceu e Maria, agradeço todas as palavras de sabedoria e amor que me permitiram ter força e coragem;

As minhas irmãs, Luany e Marina, agradeço a compreensão pela falta em alguns momentos e todo apoio;

A toda minha família, Valdir (padrasto), Antonieta (avó), Viviane (madrinha), Jarbas (padrinho), Cida (sogra) e Dorival (sogro), agradeço a fé em mim depositada, que me manteve forte e com os pés no chão;

Ao meu orientador, Prof. Adriano, agradeço as oportunidades, por toda confiança, todo auxílio durante o desenvolvimento desta pesquisa e por ser ótimo exemplo de empenho e conhecimento;

Aos meus companheiros de pós-graduação, Jurandyr, Gabriela e Carolina agradeço pelas colaborações e conversas nos momentos de dissecações, protocolos, discussões, análises e correções;

Aos meus companheiros de LAMAF, Bruna, Isabella, Giovana, Samuel e Marcela, agradeço as inúmeras perguntas, discussões e curiosidades que me permitiram aprender mais e avançar;

Agradeço aos colaboradores por todos os auxílios técnicos e científicos nesta pesquisa;

Ao Prof. Fernando Pagnocca e Daiane pelo auxílio com o Microscópio de luz (CEIS - UNESP Rio Claro);

Ao Prof. Walter Krause Neto pelo auxílio com o material e análise de Imunofluorescência (Universidade São Judas Tadeu – São Paulo);

Ao Prof. Henrique Ferreira e seu aluno Caio pelo auxílio com o Microscópio de Fluorescência (Laboratório de Genética de Bactéria – UNESP Rio Claro);

A Téc. Sonia Yokomizo pelo auxílio com a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (ICB – USP São Paulo);

Ao Téc. José Roberto por todos os auxílios técnicos (Laboratório de Morfologia - UNESP Rio Claro);

A Téc. Priscila Cintra pelo auxílio com o Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Laboratório de Microscopia – UNESP Rio Claro);

Ao programa de pós-graduação em Desenvolvimento Humano e Tecnologias, bem como o coordenador Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira e demais funcionários relacionados, pelas oportunidades e auxílio;

Agradeço aos animais que deram suas vidas para o avanço da ciência, a eles todo meu respeito e zelo;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos muito obrigada!

“Não peça auxílio ao professor antes de tentar, com todas as informações e meios que tem a seu dispor, resolver a dificuldade. O aprendizado depende muito da sua capacidade de observar, raciocinar, comparar, discutir e deduzir.

Aprender a aprender!”

D’Angelo e Fattini

RESUMO

A atrofia por desuso é caracterizada pela redução e perda de tecido muscular esquelético, é comum da utilização de imobilização articular no tratamento de lesões, e apesar de seus efeitos terapêuticos promove efeitos residuais em importantes mecanismos do aparelho locomotor, como nos sarcômeros em série que compõem o músculo estriado esquelético, e também na junção miotendínea (JMT), principal área anatômica especializada do aparelho locomotor, localizada na interface entre o músculo e o tendão, responsável pela transmissão de força. O treinamento aquático proporciona diversos benefícios ao indivíduo e foi utilizado como método de remobilização aquática para a reabilitação dos efeitos deletérios decorrentes da imobilização. O objetivo do presente estudo consistiu em descrever os efeitos da plasticidade tecidual na JMT do músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* adultos submetidos a imobilização articular e remobilização aquática por meio da análise de suas características histoquímica, ultraestrutural e morfométrica. Foram utilizados ratos com 90 dias, divididos em 5 grupos: Sedentário (S), Imobilizado (I), Treinado (T), Imobilizado Livre (IL) e Imobilizado Treinado (IT). Os grupos I, IL e IT foram submetidos a imobilização articular e os grupos T e IT ao protocolo de treinamento em meio aquático. A análise dos aspectos estruturais do ventre e JMT ocorreram através da técnica de microscopia de luz corada com Hematoxilina-Eosina e Picro-sírus, através da análise histoquímica de ATPase Miofibrilar foram identificados e mensurados a área de secção transversa (AST) e análise esteriológica da Densidade/Volume dos diferentes tipos miofibrilares, foram realizadas análises morfoquantivas das características ultraestruturais dos sarcômeros e JMT através da microscopia eletrônica de transmissão, e foram analisados a organização nuclear da JMT através de Imunofluorescência. Observamos no grupo I alterações morfoquantivas de atrofia muscular na organização da JMT, redução da AST e redução da área de contato. No grupo IL observamos lento reestabelecimento de organização dos componentes da região da JMT, com retorno da AST e aspectos dos componentes ultraestruturais da JMT com possível pré-disposição a lesões. Enquanto, no grupo IT observamos grande atividade celular na região miotendínea, aumento da AST, e extensa melhora dos componentes ultraestruturais das JMT que promoveram maior área de contato entre os tecidos muscular e tendíneo. Concluímos que a imobilização articular acarretou

atrofia muscular por desuso, o período de remobilização livre decorreu em reestabelecimento em alguns parâmetros, enquanto a remobilização aquática demonstrou eficiente reabilitação dos efeitos deletérios da atrofia muscular para todo tecido muscular.

Palavras-chaves: Junção miotendínea, sarcômero, núcleo, atrofia muscular, remobilização aquática.

ABSTRACT

Muscle atrophy by disuse is characterized for reduction and loss of skeletal muscle tissue, it is common in the use of joint immobilization in the treatment of injuries, and despite it is therapeutic effects promotes residual effects on important mechanisms of the locomotor system, as in the sarcomeres in series that compose the striated skeletal muscle, and also at the myotendinous junction (MTJ), the main specialized anatomical area of the locomotor apparatus, located at the interface between the muscle and tendon, responsible for force transmission. Water training provides several benefits for individual and was used as an aquatic remobilization method to rehabilitate the deleterious effects of immobilization. The present study aimed to describe the effects of tissue plasticity in MTJ on the gastrocnemius muscle of adult Wistar rats submitted to joint immobilization and aquatic remobilization by analyzing their histochemical, ultrastructural and morphometric characteristics. Rats with 90 days old were divided into 5 groups: Sedentary (S), Immobilized (I), Trained (T), Immobilized/Free (IL) and Immobilized/Trained (IT). The I, IL and IT groups underwent to joint immobilization and T and IT for aquatic training protocol. The analysis of structural aspects of the belly and myotendinous junction occurred through the technique of light microscopy stained with Hematoxylin-Eosin and Picrosirius, through the histochemical analysis of the myofibrillar ATPase were we identified the different myofibrillary types and realized the morphometric analysis of cross-section area (CSA) and Density/Volume, the morphometrical analyzes of the sarcomeres and ultrastructural characteristics of MTJ were performed by transmission electron microscopy, and the nuclear organization of MTJ were analyzed by immunofluorescence. We observed in I group morphometrical changes of muscular atrophy in reduction of CSA, organization of the MTJ and reduction of the contact area. In the IL group, we present slow re-establishment of structural components organization of the MTJ region, with the return of CSA and aspects of the ultrastructural components of the MTJ with a possible predisposition to injuries. While, in the IT group we observed great cellular activity in the myotendinous region, CSA increased, and extensive improvement of MTJ ultrastructural components that promoted greater contact area between the muscle and tendon tissues. We conclude that joint immobilization resulted in muscle atrophy by disuse, the free remobilization period was reestablished in some parameters, while aquatic remobilization

demonstrated efficient rehabilitation of the deleterious effects of muscle atrophy for all muscle tissue.

Key-words: Myotendinous junction, sarcomere, nucleus, muscle atrophy, aquatic remobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da organização da região da JMT e seus elementos.....	20
Figura 2 - Delineamento experimental dos grupos.....	27
Figura 3 - Dispositivo de imobilização articular.....	28
Figura 4 - Protocolo de treinamento aquático.....	29
Figura 5 - Microscopia de luz do ventre muscular.....	36
Figura 6 - Microscopia de luz da região da junção miotédinea.....	38
Figura 7 - Dimensão fractal das fibras musculares.....	39
Figura 8 - Dimensão fractal mionuclear.....	40
Figura 9 - Quantificação da área positiva de PS de tecido conjuntivo associado.....	41
Figura 10 - Histoquímica (ATPase miofibrilar).....	42
Figura 11 - Médias e desvios-padrões da AST (μm^2) das fibras Tipo I, IIa e IIx.....	43
Figura 12. Médias da análise de Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, IIa, IIx e interstício dos grupos S, T, I, IL e IT.	44
Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão do ventre muscular e da JMT dos grupos.....	46

Figura 14 - Médias e desvios-padrões do comprimento (μm) dos sarcômeros do ventre, proximal e distal dos grupos.....	47
Figura 15 - Médias e desvios-padrões do comprimento (μm) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos grupos.....	48
Figura 16 - Médias e desvios-padrões da espessura (μm) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos grupos.....	49
Figura 17 - Médias e desvios-padrões do Perímetro de contato/Base (μm) da JMT dos grupos.....	50
Figura 18 - Médias e desvios-padrões da espessura (μm) da Lâmina Basal dos grupos.....	50
Figura 19 - Microscopia confocal de varredura a laser da JMT dos grupos.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios-padrões da massa corporal (g) dos grupos S, T, I, IL e IT nos três períodos analisados.....34

Tabela 2 - Médias e desvios-padrões da Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, Ila e Iix e interstício dos grupos S, T, I, IL e IT.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

°C - Graus Ceulsius

µm – Micrômetros

µm² – Micrômetros quadrados

AST – Área de secção transversa

ATP - Adenosina Trifosfato

Cm – Centímetros

DF – Dimensão Fractal

H - Hora

HE - Hematoxilina-Eosina

I - Imobilizado

IL – Imobilizado Livre

IT - Imobilizado Treinado

JMT - Junção miotendínea

Kg - Quilogramas

MEC - Matriz extracelular

Mg – Miligramas

Min - Minutos

mL - Mililitros

PS – Picro-sírus

Rpm – rotações por minuto

S - Sedentário

T – Treinado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO	16
1.2 JUNÇÃO MIOTENDÍNEA.....	19
1.3 IMOBILIZAÇÃO ARTICULAR.....	22
1.4 REMOBILIZAÇÃO AQUÁTICA.....	23
2. OBJETIVO.....	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 ANIMAIS.....	26
3.2 IMOBILIZAÇÃO ARTICULAR.....	27
3.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO AQUÁTICO	28
3.4 MASSA CORPORAL.....	29
3.5 MICROSCOPIA DE LUZ	29
3.6 ANÁLISE HISTOQUÍMICA (ATPASE MIOFIBRILAR).....	30
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	31
3.8 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	32
4. RESULTADOS	34
4.1 MASSA CORPORAL.....	34
4.2 MICROSCOPIA DE LUZ	35
4.2.1 DIMENSÃO FRACTAL	39
4.3 ANÁLISE HISTOQUÍMICA (ATPASE MIOFIBRILAR).....	42
4.3.1 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA	42
4.3.2 DENSIDADE/VOLUME	43
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	44
4.4.1 COMPRIMENTO SARCOMÉRICO	47
4.4.2 INVAGINAÇÕES E EVAGINAÇÕES SARCOPLASMÁTICAS	48
4.4.3 PERÍMETRO DE CONTATO.....	49
4.4.4 LÂMINA BASAL	50
4.5 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é um tecido com ampla capacidade de responder a diferentes estímulos, como as alterações hormonais, nutrição, lesões, imobilização articular e também a prática de exercícios físicos (NATALI et al., 2008; SILVA et al., 2013), possui extensa plasticidade em decorrência de sua característica regenerativa, devido as propriedades das células satélites que seguem um programa miogênico bem regulado para gerar novas miofibrilas contrácteis para melhor desempenho muscular (LE MOAL et al., 2017).

O tecido muscular possui sarcômeros em série para a realização das contrações musculares, eles apresentam característica variada conforme sua localização no músculo, tal como no ventre muscular onde apresenta fibras alongadas, enquanto que em sua extremidade demonstra redução, tais características decorrem da função e localização do músculo em questão, além de perturbações como a imobilização articular apresentar alterações em sua conformidade (LIEBER et al., 2017).

A união do tecido muscular com o tecido tendíneo é denominada junçãomiotendínea (JMT), é uma região anatômica especializada onde ocorre a transmissão de força. Como o tecido muscular, a JMT apresenta plasticidade devido a variados estímulos externos, influenciada pelos tecidos do complexo musculotendíneo, também são descritas alterações morfofuncionais moduladas pela prática de exercícios físicos (CURZI et al., 2012).

A JMT apresenta papel importante à locomoção, pois possui alta capacidade de transferência de força, de suma relevância para prevenção e recuperação de lesões que influenciam os músculos estriados esqueléticos. A imobilização articular é um tratamento conservador para lesões, onde um membro ou segmento é submetido a longo período de desuso muscular o qual acarreta em diversas alterações degenerativas, como atrofia muscular, redução da área de secção transversa, alterações metabólicas, entres outras diversas consequências aos movimentos (YOSHIHARA et al., 2016).

A remobilização é o período pós imobilização que proporciona a compensação muscular após as alterações causadas, e quando associada ao meio aquático pode proporcionar melhora dos efeitos atroficos, como melhora do desempenho motor, aumento da massa muscular e comprimento muscular, além de,

possivelmente promover a reversão da redução do número de sarcômeros em série (VOLPI et al., 2008).

Os mecanismos para alterações e remodelação da JMT ainda são desconhecidos, como também qual seu papel na recuperação de uma imobilização articular e remodelamento frente a remobilização aquática. Através da evidenciação dos aspectos morfológicos da JMT será possível proporcionar um meio clínico para a recuperação dos efeitos deletérios da imobilização, como método de prevenção de possíveis lesões na JMT. Além do possível efeito rápido e eficiente para melhora da locomoção no período pós-imobilização, visto que o músculo gastrocnêmio possui grande responsabilidade de produção de força de propulsão e estabilização.

1.1 Músculo esquelético

O músculo estriado esquelético é o tecido presente em maior abundância no corpo humano, representa quase metade da massa corporal, e possui a responsabilidade de realização dos movimentos corporais, produção de calor, postura e sustentação corporal. Sua capacidade contráctil é determinada devido as propriedades de força, elasticidade e plasticidade (CRETOIU et al., 2018).

O tecido músculo esquelético possui uma íntima relação entre suas fibras e o tecido conjuntivo, qual é estruturalmente organizado para unir as fibras em feixes musculares e assim formarem os músculos estriados esqueléticos. O tecido conjuntivo associado é também responsável pela difusão de força transversal, e são organizados em epimísio, perimísio e endomísio. O epimísio é o tecido conjuntivo externo que recobre toda superfície muscular contempla vasos e nervos, e atribui continuidade ao tendão. O perimísio refere-se ao o tecido conjuntivo que agrupa as miofibrilas em feixes musculares, formam os fascículos, contém os proprioceptores. Enquanto o endomísio dá-se por uma bainha fina de tecido conjuntivo interno que envolvem as miofibrilas, é composto de fibras reticularem em maioria de colágeno Tipo III (KJAER, 2003; CRETOIU et al., 2018).

O tecido músculo esquelético é então organizado em células cilíndricas, alongadas e multinucleada denominado de fibra muscular, ou miócitos, e são envoltas pelo sarcolema onde recebe auxílio energético de diversas organelas sarcoplasmáticas (ERTBJERG; PUOLANNE, 2017).

As fibras musculares possuem características histoquímicas classificadas: Tipos I, são fibras com baixa velocidade de contração, alta capacidade oxidativa, possuem menor área de secção transversa, alta resistência a fadiga, além de possuir alta densidade mitocondrial e capilar; as fibras Tipo II são subdivididas nos Tipos IIa, intermediária em todas as características, e Tipo IIx, que possui alta velocidade de contração, baixa capacidade oxidativa, maior área de secção transversa, reduzida resistência a fadiga, porém possui maior atividade de influxo de Ca^{2+} (CAMPOS et al., 2002; QAISAR; BHASKARAN; VAN REMMEN, 2016).

Alguns músculos possuem maior densidade por volume de fibras caracterizada em um dos tipos miofibrilares, porém, alterações podem ocorrer em razão dos estímulos atribuídos ao músculo como diferentes modalidades de exercício, situações de atrofia, lesões e miopatias (OH et al., 2007; LEE; OH, 2015). O músculo gastrocnêmio analisado neste estudo possui predominância de fibras Tipo II (ZIERATH; HAWLEY, 2004).

As fibras musculares são compostas por um conjunto de miofibrilas constituídas por unidades funcionais organizadas paralelamente denominadas de sarcômeros em série, e são as unidades funcionais básica do músculo estriado esquelético. Os sarcômeros são formados por filamentos delgados e espessos que se estendem e se sobrepõem, principalmente miosina e actina, no entanto, as miofibrilas são constituídas também por proteínas como tropomiosina, o complexo troponina, tropomodulina, nebulina, conectina/titina, entre outras diversas proteínas relacionadas (SWEENEY; HAMMERS, 2018; OJIMA, 2019).

Os sarcômeros em série são complexas unidades contráteis de proteínas ordenadas e interligadas, para produção da força muscular ativa e passiva, e a quantidade destas unidades é equivalente ao necessário para a gama de contrações do músculo. Os comprimentos sarcoméricos podem variar em contração ou relaxamento muscular, ou perturbações crônicas como situações de imobilização. Os sarcômeros apresentam grande plasticidade, como sua adição longitudinal durante o crescimento, e alterações em sua estrutura decorrentes de diversos estímulos, entretanto, são escassos estudos que confirmam a variação de comprimentos dos sarcômeros dentro de um mesmo músculo em diferentes localizações nesta situação (KINNEY et al., 2017; MOO; HERZOG, 2018).

Os sarcômeros apresentam faixas proteicas claras e escuras visíveis através de microscópio, o filamento espesso é composto principalmente de miosina e o

filamento delgado principalmente de actina, cada sarcômero é separado por um par de linhas Z, dentro dele há uma área escura chamada banda A e se estende por todo filamento espesso. No centro da banda A existe a zona H que contém apenas filamentos espessos e na extremidade da banda A os filamentos espessos e delgados se sobrepõem. A banda I é a região clara que se estende para dentro de dois sarcômeros dividido por uma linha Z, na área clara lateralmente á banda I contém o restante dos filamentos delgados. A linha Z se liga através da titina aos filamentos espessos que se conectam a locais específicos da actina e outras proteínas sarcoplasmáticas, esta linha é o ponto de condução primária da contração e contém proteínas que auxiliam a estabilização do sarcômero durante a contração muscular (ERTBJERG; PUOLANNE, 2017; RASSIER, 2017).

A contração muscular ocorre através do movimento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina, onde ocorre o encurtamento dos sarcômeros. O comprimento do sarcômero é de grande importância para a força de contração, o qual depende da rigidez e encurtamento da fibra muscular para realização das contrações que promovem movimentos segmentares (MACINTOSH, 2017; RASSIER, 2017). O estímulo crônico de ativação muscular pode envolver todo controle da massa muscular, devido a diversos fatores para o equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação de proteínas, e é importante fator na qualidade de vida dos indivíduos (MARTONE et al., 2017).

O tecido muscular apresenta alta capacidade adaptativa devido as células satélites, as quais são precursores miogênicos que não se diferenciaram, estão localizadas no interior do músculo estriado esquelético adulto, entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras musculares, porém, sua origem exata ainda é uma ampla área de investigação. Possuem responsabilidade pelo crescimento muscular na fase pós-natal, além de ter o papel principal na manutenção e reparação muscular, como em situações de estresse muscular, como no exercício físico ou em lesões, onde ocasionam na ativação, proliferação e diferenciação das células satélites em resposta aos estímulos. Estas células progenitoras atuam através de dois mecanismos, como a hipertrofia, ou seja, no aumento do tamanho da fibra existente, ou através da hiperplasia, isto é, pelo desenvolvimento de novas fibras (SAID et al., 2017; ZAMMIT, 2017).

Durantes as diferentes fases de miogênese das células satélites elas expressam fatores regulatórios envolvidos, como o fator de transcrição 7 (Pax-7) que

caracteriza a célula em inatividade, e o fator regulatório de início da proliferação das células satélites a proteína de determinação de mioblastos (MyoD) que marca a proliferação e diferenciação destas células. Para manutenção da homeostase muscular é necessário entender a interação do Pax-7 e MyoD e sua contribuição neste processo, e a relação direta na expressão destes fatores concomitante aos efeitos do exercício físico (PESTANA et al., 2012; TIAN et al., 2016).

A terapia aquática é um estímulo capaz de promover remodelamento muscular para melhor adaptação frente as demandas funcionais, porém são evidenciados que o exercício físico aquático não foi capaz de reverter totalmente o processo de atrofia decorrente da imobilização articular de um segmento (VOLPI et al., 2008), entretanto um estudo sobre a repercussão da imobilização e posterior remobilização aquática nos sarcômeros e JMT, pode permitir a compreensão sobre como os núcleos e células satélites interferem no processo de reparo muscular.

1.2 Junção Miotendínea

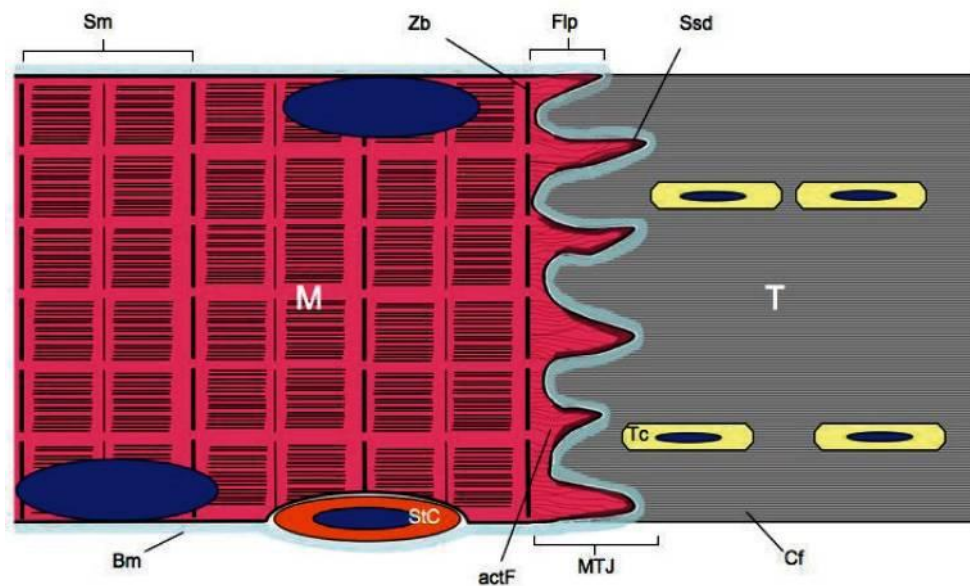
A JMT é a principal área anatômica especializada do aparelho locomotor, região esta localizada na interface entre o músculo e o tendão responsável pela transmissão primária de força entre as proteínas contráteis do músculo esquelético e as fibrilas colágenas do tendão, e assim constituem uma unidade mecânica integrada. Estruturalmente a JMT é formada por complexos proteicos de microfilamentos de actina que se estendem até a última linha Z, proteínas de ligação à actina que agrupam filamentos de actina, proteínas intracelulares que ligam os feixes de filamentos de actina ao sarcolema, complexos de proteínas transmembranares e extracelulares (KANNUS, 2000; CHARVET; RUGGIERO; LE GUELLEC, 2012).

A JMT possui miofibrilas com formato cônico na extremidade distal da fibra muscular, as quais apresentam miofibrilas terminais na extremidade que formam projeções sarcoplasmáticas alongadas, os filamentos de actina se estendem a partir da última Linha Z, se ligam á proteínas subsarcolemais e indiretamente interagem com componentes extracelulares, são chamadas invaginações sarcoplasmáticas que promovem a formação de dobras, chamadas interdigitações denominadas "*finger-like process*" (TIDBALL, 1991; CIENA et al., 2010, 2012; SAMUKAWA et al., 2011; CURZI et al., 2013a).

A JMT é a área de maior predisposição a lesão do aparelho locomotor, portanto lesões nesta região são comuns, em especial as causadas por contração muscular combinada com alongamento excessivo, e são as interdigitações que proporcionam um melhor funcionamento entre estes componentes que permite o aumento da área de contato na JMT e da resistência as forças de contração muscular (KNUDSEN et al., 2015). As interdigitações apresentam diferentes amplitudes nos tipos de fibras musculares como são amplas nas fibras musculares de contração lentas do que nas fibras de contração musculares rápidas além de sua complexidade associada aos tipos miofibrilares (TROTTER; BACA, 1987; SPIERTS et al., 1996; CURZI, 2016).

O complexo músculo-tendão apresenta diferentes constituintes estruturais responsáveis por realizar suporte de cargas tencionais e evitam possíveis rupturas (CARVALHO et al., 2009), para que esta transmissão de força ocorra são necessárias também extensões menores na região proximal por meio de feixes de miofibrilas e tecido conjuntivo da fibra muscular, porém na região central da fibra muscular ocorrem diferentes níveis de invaginações sarcoplasmáticas (CIENA et al., 2012). As interdigitações permitem que ocorra a transmissão de força de cisalhamento e tensão durante a contração muscular, possibilita que a contração se transforme em movimento de um segmento através da transmissão da carga pelo membro, articulação e osso (KOJIMA et al., 2008).

Figura 1. Representação da organização da região da JMT e seus elementos.



Fonte: (CHARVET; RUGGIERO; LE GUELLEC, 2012). Na extremidade na fibra muscular (M) e seus sarcômeros (Sm) organizados paralelos a MTJ, e a partir da última linha Z (Zb)

as miofibrilas terminais formam projeções sarcoplasmáticas em formato cônico (actF) e formam os “*finger like-process*” (Flp), as proteínas subsarcolemais interagem com os componentes extracelulares através da lâmina basal (Bm) localizada na MTJ (Ssd). Na região também são formadas através das fibras colágenas as invaginações sarcoplasmática constituídas pelas fibras colágenas (Cf) produzidas pelos Tenócitos (Tc) no tendão (T). Esta região possui ampla plasticidade devido a íntima relação com as células satélites adjacentes (StC).

Diferentes componentes celulares foram encontrados na JMT, como descritos por Ciena et al. (2012), no músculo digástrico, existem subespecialidades nas áreas intercaladas entre feixes terminais de miofibrilas e tecido conjuntivo nas regiões central e periférica das extremidades distais das fibras musculares, com grande área de tecido conjuntivo em torno de feixes de miofibrilas através de feixes longos que compõem os microtendões, os quais possuem grande presença de grupos mitocondriais subsarcolemais e intermiofibrilares, que demonstra grande atividade celular nesta região (CIENA et al., 2011).

O desenvolvimento da JMT sofre influência da interação entre o músculo e tendão desde o desenvolvimento embrionário, as células que darão origem a JMT estão localizadas na região, porém não totalmente diferenciadas. Durante a fase neonatal a JMT ainda não possui sua estrutura complexa desenvolvida e não apresentam longas interdigitações como encontrado em adultos, se desenvolvem em resposta a força contrátil muscular onde os componentes da matriz extracelular começam a alinhar-se na direção da força aplicada, a interação entre o músculo e a tensão é fundamental para a fase adulta e para a capacidade de força (KOSTROMINOVA et al., 2013). Durante o envelhecimento as interdigitações apresentam grande remodelação, alteração no colágeno, encurtam e afunilam suas características de invaginação, ou seja, apresentam redução na sua área de contato que dificulta a interação dos tecidos muscular e tendíneo (CIENA et al., 2010).

Durante o exercício físico ocorre o aumento da tensão na JMT que proporciona a esta região com alta plasticidade tecidual, que ocorram alterações em sua conformidade, como o aumento de sua área de contato para regular a tensão como também diversas alterações estruturais, cronicamente, bem como, o desuso demonstra alterações na JMT devido a atrofia muscular e sarcopenia, que confirma grande importância da JMT no aparelho locomotor e sua predisposição a lesões (KANNUS et al., 1992; KOJIMA et al., 2008).

1.3 Imobilização articular

A imobilização de um segmento é utilizada como tratamento conservador de uma lesão que apesar de seus efeitos terapêuticos, promove alterações residuais que afetam a qualidade de vida (KUNZ et al., 2014a). No membro inferior ocasiona a redução dos estímulos musculares, conseqüentemente, do músculo gastrocnêmio que realiza movimentos importantes para a deambulação, pois reduz as propriedades biomecânicas do complexo músculo-tendão.

A inatividade decorrente da imobilização articular ocasiona em atrofia por desuso e conseqüente remodelação no desempenho muscular devido seus diversos efeitos deletérios residuais no período durante e pós-imobilização, como perda de proteínas miofibrilares, mudança metabólica, alteração vascular e neural, redução no número de sarcômeros em série, diminuição de força muscular e na amplitude dos movimentos (NATALI et al., 2008).

As alterações conseqüentes da imobilização variam em relação ao posicionamento do segmento durante o período imobilizatório enquanto em uma posição alongada demonstra atrofia moderada ou ausente e sem mudanças significativas no tecido conjuntivo, entretanto, induz a modificações nos fatores relacionados à regulação miogênica, aumento no tecido conectivo do endomísio e perimísio e maioria do colágeno endomisial depositado diretamente no sarcolema das células musculares, desta forma causa respostas negativas no período pós imobilização (JÄRVINEN et al., 2002; POLIZELLO et al., 2011; SILVA et al., 2013).

A redução do número de sarcômeros em série é uma resposta à variações do tamanho funcional do sarcômero, que afeta sua funcionalidade, esse processo ocorre para a manutenção do sarcômero em um tamanho ideal para o desempenho de suas funções (VOLPI et al., 2008). Outros fatores também podem afetar a magnitude da atrofia muscular, como a idade, gênero, tempo do período de imobilização, tipo miofibrilar e se o grupamento muscular é extensor ou flexor, além de provocar a diminuição da área de secção transversa, aumento o tecido conjuntivo intramuscular e alterações na composição bioquímica do músculo (APPELL, 1990; CRETOIU et al., 2018).

Devido as alterações na matriz extracelular ocorre a redução das propriedades mecânicas do músculo no período pós-imobilização, quais estão susceptíveis a lesões teciduais devido as adaptações decorrentes da imobilização,

estímulos de alongamento passivo e da marcha geram respostas positivas ao indivíduo, entretanto seus componentes não retornam aos níveis do período anterior à imobilização (CARVALHO et al., 2009; CAÇÃO-BENEDINI et al., 2013). Mesmo com o conhecimento sobre os efeitos lesivos da imobilização, ela ainda é um tratamento conservador frequentemente utilizado, que compromete o suporte de cargas que vulnerabiliza o tecido ao estresse longitudinal, portanto aumenta a predisposição a lesões na região da JMT (PALMA et al., 2011; POLIZELLO et al., 2011; CURZI et al., 2013b).

1.4 Remobilização aquática

A remobilização livre, sem exercícios, por si já proporciona a redução do colágeno intramuscular e consegue restaurar valores de diâmetros para alguns tipos de fibras musculares, entretanto, não reverte a atrofia (CARVALHO et al., 2009; POLIZELLO et al., 2011). A remobilização através de exercícios físicos apresenta diversos benefícios morfológicos quando comparado a remobilização livre, além dos aspectos de bem-estar para o indivíduo (DEL CARLO et al., 2007).

O exercício físico dispõe de potencial de melhora cardiovascular e respostas fisiológicas de repouso, por esse motivo é largamente utilizado com finalidade terapêutica e preventiva de diversas condições fisiopatológicas, além de que se realizado diariamente possui influência na reversão de efeitos deletérios decorrentes da imobilização (PETRINI et al., 2015; FORESTO et al., 2016). Em maior intensidade o exercício físico proporciona melhores efeitos no número de sarcômeros em série e comprimento muscular, enquanto apenas a marcha já demonstra melhora destes impactos (NATALI et al., 2008; VOLPI et al., 2008). Na articulação a imobilização proporciona degeneração da cartilagem articular e alterações na membrana sinovial, o exercício possibilita melhora da organização morfológica em relação a remobilização livre (KUNZ et al., 2014b).

A natação é um exercício físico realizado em meio aquático que proporciona diversos benefícios ao indivíduo como a redução do estresse nas articulações, aumento da força e redução da massa corporal, além de ser utilizado como instrumento terapêutico por seu caráter relaxante proporcionado pelo ambiente aquático ao promover o bem-estar físico e mental. Apresenta benefícios a indivíduos

com dificuldades de locomoção auxilia na reabilitação através de fortalecimento muscular (BANZ et al., 2003; LEE; OH, 2015).

Pelo treinamento aquático não se tratar de uma modalidade de impacto não permite sobrecarga direta nos membros acometido pela fragilidade de seus componentes celulares decorrente da imobilização articular. A remobilização através do treinamento aquático propicia relativa adaptação muscular a curto prazo e melhora nas suas propriedades mecânicas, decorrente da tensão induzida através do exercício que acarreta resistência muscular (NASCIMENTO et al., 2008; CURZI et al., 2013a).

A imobilização de um segmento é um tratamento clínico conservador para diversas lesões tendíneas e músculo esqueléticas do aparelho locomotor, que acometem grande parte da população em algum momento de sua vida. Diversos efeitos deletérios estão relacionados em decorrência da inatividade muscular, como o acometimento da resistência em resposta da atrofia das células musculares e segmentos próximos diretamente afetados. Através deste estudo foi possível apresentar as alterações que ocorrem na principal área responsável pela transmissão de força, a JMT, e seus benefícios ao aparelho locomotor devido a sua suscetibilidade a lesões, analisar os efeitos da imobilização associado ao treinamento aquático com finalidade de reabilitação, como também apresentar os possíveis diferentes comprimentos dos sarcômeros em série nas regiões do ventre muscular e na região proximal a JMT.

O exercício físico é um assunto amplamente estudado por nosso grupo onde tem demonstrado diversos benefícios a plasticidade tecidual da JMT, como o aumento de sua área de contato e componentes celulares consequentes da remodelação muscular dos sarcômeros em série, associado a outros acometimentos conforme estudos recentes (SIERRA et al., 2018; JACOB et al., 2019). Através da análise do modelo experimental de imobilização foi possível analisar as alterações histoquímica, ultraestrutural e morfométrica que ocorrem, e os possíveis benefícios mediante remobilização aquática. Além de suas futuras aplicações para à reabilitação, como alternativa para reversão das alterações decorrentes, ao analisar as possíveis modificações dos sarcômeros, JMT, em sua organização e componentes celulares, área de contato e consequentemente na transmissão de força.

2. OBJETIVO

Descrever os efeitos da plasticidade tecidual nos sarcômeros e JMT do músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* adultos submetidos a imobilização articular e remobilização aquática por meio da análise de suas características histoquímica, ultraestrutural e morfométrica.

2.1 Objetivos específicos

- Descrever os aspectos estruturais do ventre e Junção miotendínea, através da técnica de Microscopia de luz com as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picro-sírus (PS);
- Mensurar a Dimensão Fractal da organização miofibrilar, mionuclear e tecido conjuntivo associado;
- Quantificar a área positiva de tecido conjuntivo associado ao ventre muscular;
- Identificar e mensurar a área de secção transversa das fibras musculares Tipo I, IIa e IIx;
- Demonstrar através de Microscopia Eletrônica de Transmissão as características ultraestruturais da junção miotendínea;
- Descrever a disposição e organização das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas;
- Mensurar os comprimentos e espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas;
- Mensurar os comprimentos dos sarcômeros do ventre muscular, proximal (penúltimo sarcômero) e distal (último sarcômero) da junção miotendínea;
- Descrever a organização e distribuição nuclear na interface músculo-tendínea através da imunomarcagem dos componentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

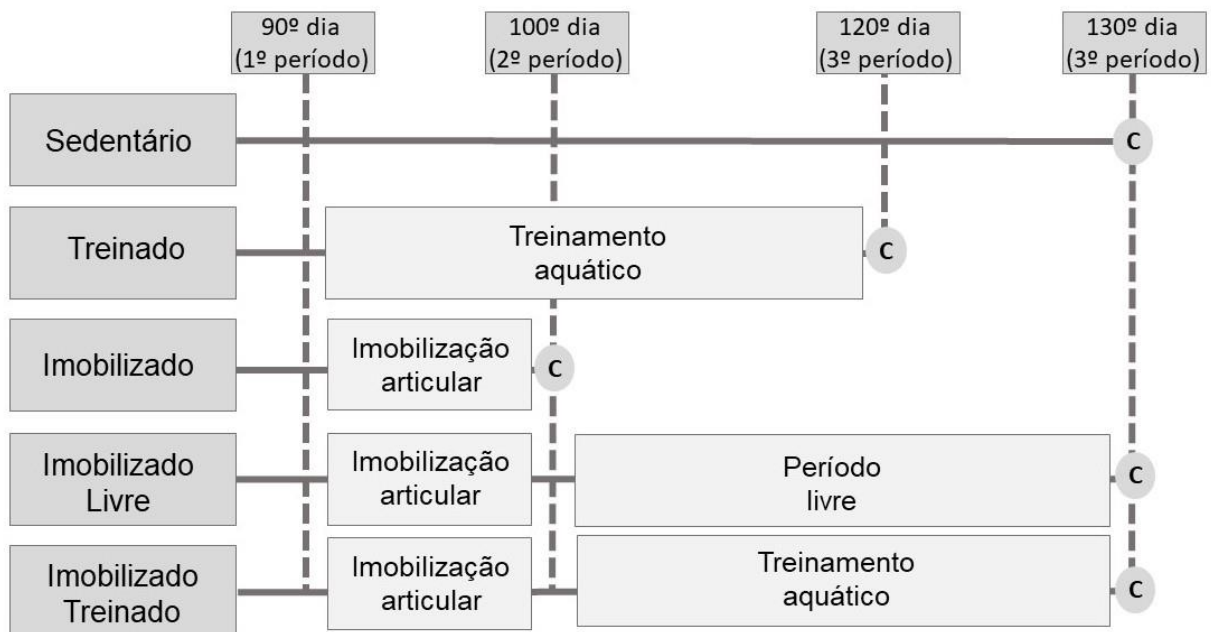
3.1 Animais

Foram utilizados 55 ratos *Wistar* machos com 90 dias de vida, divididos em 5 grupos (n=11):

- **Grupo Sedentário (S)**: os animais não foram submetidos a nenhum procedimento;
- **Grupo Imobilizado (I)**: os animais foram submetidos à imobilização articular (10 dias);
- **Grupo Treinado (T)**: os animais foram submetidos ao treinamento aquático;
- **Grupo Imobilizado/Livre (IL)**: os animais foram submetidos a imobilização (10 dias) e remobilizado livre (30 dias);
- **Grupo Imobilizado/Treinado (IT)**: os animais foram submetidos à imobilização (10 dias) e remobilizados através do treinamento aquático (30 dias).

Os animais foram oriundos do Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu, SP, foram alojados em gaiolas de polipropileno coletivas, 5 animais em cada gaiola, no Biotério Setorial do Laboratório de Anatomia do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Rio Claro, SP. Os animais receberam ração balanceada padrão (Purina®) e água “*ad libitum*”, à temperatura ambiente controlada à $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos aplicados neste estudo foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Campus de Rio Claro-SP, (nº 1220).

Figura 2. Delineamento experimental dos grupos.

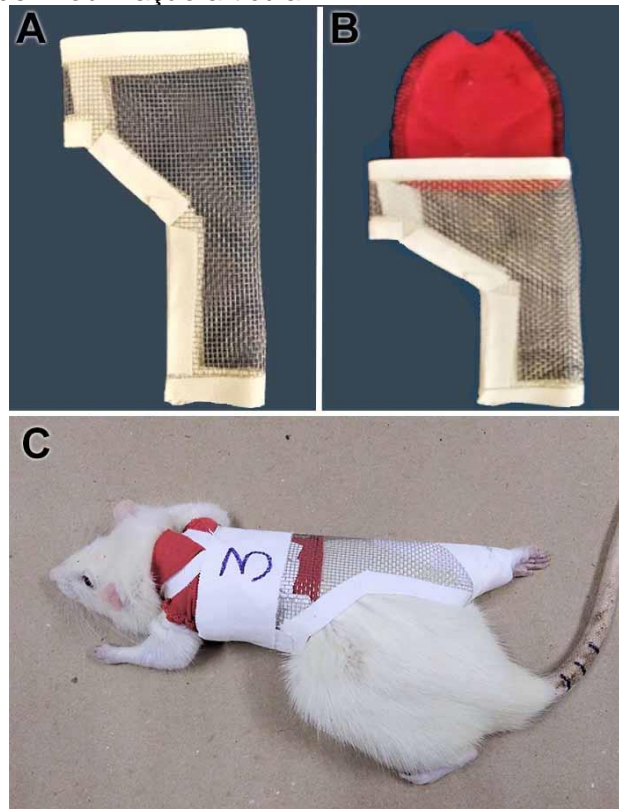


Fonte: Elaborado pelo autor. Delineamento e organização dos grupos experimentais, demarcados pelos períodos delimitantes: 1º período, ao início do experimento e determinados protocolos; 2º período, final da imobilização articular; 3º período, final das intervenções. (C) coleta das amostras do músculo gastrocnêmio.

3.2 Imobilização articular

Os animais dos grupos Imobilizado, Imobilizado/Livre e Imobilizado/Treinado foram previamente anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg) via intraperitoneal e imobilizados na articulação tíbio-társica em flexão plantar máxima do membro posterior direito. Foi adicionado a parte superior do animal similar a uma camiseta de algodão que permitiu a movimentação livre da cabeça, membros superiores e que permitia livre alimentação do animal na gaiola. A parte inferior consistiu em uma malha de aço inoxidável que imobilizou o membro inferior através da união das partes anterior e posterior unidas, para proteção da pele do animal o membro inferior foi recoberto de algodão. Para melhor fixação do dispositivo foi fixado um suspensório para união da parte superior e inferior do dispositivo (Figura 2) (COUTINHO et al., 2002; YOSHIHARA et al., 2016). Os animais dos grupos I e IL foram imobilizados por 10 dias. O grupo IL ao 10º dia teve todos os elementos do dispositivo imobilizatório removidos e os animais permaneceram livres na gaiola por 30 dias, enquanto o grupo I os animais foram eutanasiados ao 10º dia.

Figura 3. Dispositivo de imobilização articular.



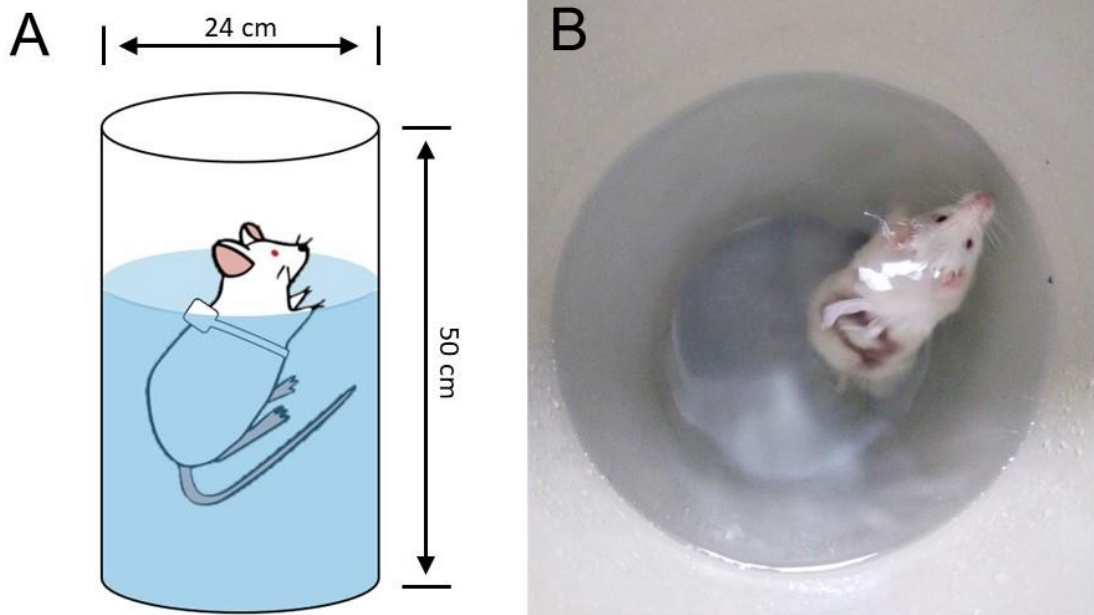
Fonte: Elaborado pelo autor. Parte posterior constituída de malha de aço recoberta com fita (A), parte anterior composta por malha de algodão para proteção do corpo do animal (B) e dispositivo imobilizatório adicionado ao animal com livre movimentação dos membros não imobilizados (C).

3.3 Protocolo de treinamento aquático

Foram submetidos ao protocolo de treinamento em meio aquático os animais dos Grupos Treinado e Imobilizado Treinado, todos os animais foram submetidos previamente a um período de 10 dias de adaptação ao meio líquido sem sobrecarga, ao início com duração de 15 min e nos dias consecutivos eram adicionados progressivamente 5 min. O grupo Imobilizado Treinado foi submetido ao processo de adaptação anteriormente a aplicação da técnica de imobilização.

O treinamento ocorreu em tanques retangulares, onde os animais foram separados individualmente por tubos cilíndricos (24x50) imersos em 40 cm de água aquecida a 31°C. Ocorreram 5 sessões semanais de 60min durante 4 semanas, com total de 20 sessões, os animais utilizaram sobrecargas equivalentes a 3% da massa corporal fixados ao tórax dos animais através de uma cinta elástica, aferidas e corrigidas semanalmente (Figura 3) (CIABATTARI; DAL PAI; DAL PAI, 2005; RAQUEL et al., 2016).

Figura 4. Protocolo de treinamento aquático.



Fonte: Elaborado pelo autor. Ilustração de um animal realizando o protocolo de treinamento aquático e as dimensões do tubo cilíndrico (A). Imagem de um animal em uma sessão de treinamento aquático (B).

3.4 Massa corporal

A massa corporal de ambos os grupos foram mensuradas em balança semianalítica (Marte LC1[®]) em 3 períodos: 1^o período, ao início do experimento delimitado pela imobilização dos grupos I, IL e IT (1^o dia), e para o grupo T início do protocolo de treinamento; 2^o período, ao final da imobilização (10^o dia), início do período livre para o grupo IL e início do protocolo de treinamento para o grupo IT; e 3^o período, ao final do experimento definido pelo término do protocolo de treinamento, 30^o dia para o grupo T, e 40^o dia para os grupos IL e IT. Após as mensurações da massa corporal dos grupos nos períodos, obteve-se as médias e desvios padrões, onde foi realizado a análise estatística de variância ANOVA Two way, com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$.

3.5 Microscopia de luz

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, eutanasiados overdose de anestésico Ketamina (200mg/Kg) e Xilasina (50 mg/Kg) via intraperitoneal, em seguida foram dissecadas as amostras do ventre muscular e

junção miotendínea do músculo gastrocnêmio direito, foram alocadas sobre a superfície de cortiça estabilizadas com cola biológica e untadas em talco neutro (Tragacanth, SIGMA®) para prevenção de artefatos, criofixadas em nitrogênio líquido, e em seguida armazenadas no Freezer -80°C. Foram realizadas secções transversais do ventre e longitudinais da JMT, de 10 µm de espessura (Criostato HM 505E, MICROM), corados com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para destaque dos componentes celulares, e Picro-sírus (PS) para destaque de tecido conjuntivo associado (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014; BHUTDA et al., 2017). A aquisição das imagens ocorreu através do microscópio de luz Leica DM750 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) do Laboratório de Microbiologia do Centro de Insetos Sociais (CEIS – UNESP), Rio Claro-SP.

Para análise da organização tecidual, utilizamos a análise de Dimensão Fractal (DF) através das imagens de microscopia de luz obtidas. As imagens foram binarizadas através do software ImageJ®, para quantificação da distribuição de pixels no espaço da imagem sem considerar sua textura. O valor da DF obtido é expresso em uma escala de 0 à 2, onde quanto mais próximo de 2 maior a complexidade de organização tecidual (CURY et al., 2018). Nas colorações de HE (n=10) foram analisados a organização miofibrilar e dos núcleos, e com as imagens de Picro-sírus (n=10) foram analisados a organização do tecido conjuntivo associado e sua quantificação de área positiva de PS (%).

Após obtenção das médias e desvio padrão foi realizada a análise estatística ANOVA One-way com pós teste de Bonferroni, com nível de significância $p < 0,05$.

3.6 Análise histoquímica (ATPase miofibrilar)

Das amostras de ventre muscular de cada grupo experimental, foram realizados secções transversais de 10 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM), onde foram incubadas durante 30 min a 37°C em uma solução de 10mg de ATP dissolvido em 2 gotas de água destilada adicionadas em conjunto com 10ml de glicina/tampão NaCl, CaCl₂ até atingir o pH 9,4 adicionado com Dithiothreitol. Em seguida as secções foram lavadas em água destilada e incubadas por 7 min em cloreto de cobalto 2%. Posteriormente ocorreu uma nova lavagem das amostras em água destilada e desidratação em séries ascendentes de álcoois (70 á 100%) e xilol, para concluir a fixação das amostras. Para os pH's 4,3 e 4,6, as seções foram pré

incubadas em solução tampão de acetato de sódio 0,1M com EDTA 10 mM durante 10 min a 4°C, as amostras foram posteriormente lavadas com água destilada e incubadas durante 7 min em cloreto de cobalto 2%, e posteriormente lavadas em água destilada e desidratadas em séries ascendentes de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%), finalizadas com xilol, e as lamínulas montadas com Entellan® (BROOKE; KAISER, 1974; KRAUSE NETO et al., 2018).

Através das imagens obtidas foram identificadas as fibras musculares do Tipo I, Tipo IIa e Tipo IIx, com auxílio do software ImageJ®, foram realizadas as mensurações da Área de Secção Transversa (AST) de ambos os tipos de fibras (n=100), bem como foi realizado a análise estereológica de Densidade/Volume (%) das fibras musculares e do interstício (n=10 imagens). Após a obtenção dos dados de média e desvio-padrão foram realizadas as análises estatísticas ANOVA Two-way com pós teste de Bonferroni, com nível de significância $p < 0,05$, com auxílio do software Graph Pad Prism 7.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Foram utilizados 3 animais de cada grupo experimental, anestesiados com Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, perfundidos com a solução fixadora de Karnovsky modificada que contém glutaraldeído à 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio à 0,1M e pH= 7,3 (DURO et al., 2012). A JMT do músculo gastrocnêmio foi dissecada e fixada na mesma solução durante 3h à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi lavada com solução de tampão fosfato de sódio e pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio à 1% durante 2h à 4°C. As amostras foram incluídas em resina (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit Electron Microscopy Sciences, USA), e posteriormente, foram obtidos cortes ultrafinos (90 nm), coletados em telas de cobre de 200 "mesh" (Sigma®) e contrastadas com solução de acetato de uranila 4%, durante 3min (BOLINA et al., 2013), e com a solução aquosa de citrato de chumbo 0,4% por 3min (CIENA et al., 2012). As telas foram examinadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL1010, do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA), da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, Brasil.

Através das micrografias obtidas com auxílio do software ImageJ® foram realizadas as mensurações dos sarcômeros e estruturas da JMT.

Foram mensurados os comprimentos dos sarcômeros do ventre muscular (n=200) e da região da JMT (n=90), os sarcômeros proximal (penúltimo) e distal (último) do miofilamento, delimitados entre um par de linhas Z. Também foram realizadas as mensurações de comprimento e espessura das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (n=90). Após obtenção das médias e desvio padrão foi realizada a análise estatística ANOVA Two-way com pós teste de Bonferroni, com nível de significância $p < 0,05$, com auxílio do software Graph Pad Prism 7.

Foram realizadas as análises morfométricas do Perímetro de contato da JMT por sua base como também foi mensurada a espessura da Lâmina Basal da JMT. Após obtenção das médias e desvio padrão foi realizada a análise estatística ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni, com nível de significância $p < 0,05$, com auxílio do software Graph Pad Prism 7.

3.8 Microscopia confocal de varredura a laser

Foram utilizados 3 animais de cada grupo experimental, eutanasiados overdose de anestésico Ketamina (200mg/Kg) e Xilasina (50 mg/Kg) via intraperitoneal, em seguida foram dissecadas as amostras do ventre muscular e JMT do músculo gastrocnêmio direito, foram alocadas sobre a superfície de cortiça estabilizadas com cola biológica e untadas em talco neutro (Tragacanth, SIGMA®) para prevenção de artefatos, criofixadas em nitrogênio líquido, e em seguida armazenadas no Freezer -80°C. Foram realizadas secções longitudinais de 100 µm e coletadas em lâminas histológicas sinalizadas. As lâminas foram lavadas em solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), permeabilizadas com Triton X-100 - 0,1%, durante 30min, nova lavagem com PBS + Albumina Sérica Bovina (BSA) para bloqueio de marcação inespecífica. Após esta etapa foi realizada a incubação com “Alexa Fluor 488 Faloidina” (5 µL da solução estoque de “Alexa Fluor 488 faloidina” + 200 µL de PBS + 2 µL de BSA) durante 30min, para marcação do citoesqueleto. Posteriormente as lâminas foram montadas com ProLong® Gold reagente contendo 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochoryde (DAPI, Molecular Probes) para marcação nuclear. As imagens foram obtidas através no Microscópio Confocal de

Varredura a Laser LEICA TCSSP5 do Centro de Microscopia da UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

4. RESULTADOS

Os resultados morfoquantitativos dos métodos de microscopia de luz, análise histoquímica (ATPase miofibrilar), microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal de varredura a laser de todos os grupos experimentais apresentados anteriormente estão descritos a seguir.

4.1 Massa corporal

Os dados obtidos a partir da mensuração da massa corporal dos animais de ambos os grupos estão representados na Tabela 1.

O grupo S apresentou aumento dos valores de massa corporal entre o 1º e o 3º período analisado. O grupo T apresentou aumento da massa corporal entre o 1º e 3º período, porém, não tão expressivo quanto o grupo S ($p < 0,05$). Enquanto o grupo I apresentou os efeitos da imobilização articular com redução brusca entre o 1º e 2º período ($p < 0,05$). Nos grupos IL e IT também foi observado o efeito da imobilização entre o 1º e 2º período com redução da massa corporal ($p < 0,05$), enquanto entre o 2º e 3º período o aumento foi mais expressivo no grupo IL ($p < 0,05$).

Tabela 1. Média e desvio padrão da massa corporal (g) dos grupos S, I, T, IL e IT nos três períodos analisados. (-) não mensurado.

Período Grupo	1º período	2º período	3º período
S	361,53±27,88	-	425,23±36,44
T	325±15,97	-	367,07±20,13 ^{##}
I	377,61±39,25*	309±33,98	-
IL	398,72±29,14*	344,27±27,37**	442,55±33,14
IT	402,38±35,03*	341,23±32,91**	401,53±35,51 [#]

Fonte: Elaborado pelo autor. A massa corporal dos animais dos grupos I, IL e IT apresentaram redução, 1º período \neq 2º período (* $p < 0,05$); enquanto no 3º período o grupo T apresenta menor, T \neq S e IL (^{##} $p < 0,05$); Houve aumento dos grupos IL e IT, 2º período \neq 3º período (** $p < 0,05$), e no grupo IL foi maior, IT \neq IL ([#] $p < 0,05$).

4.2 Microscopia de luz

Os componentes celulares no ventre muscular do músculo gastrocnêmio e organização foram apresentados através da técnica de microscopia de luz (Figura 5).

No grupo S observamos as fibras musculares com núcleos periféricos (Figura 5A) e o endomísio associado (Figura 5F).

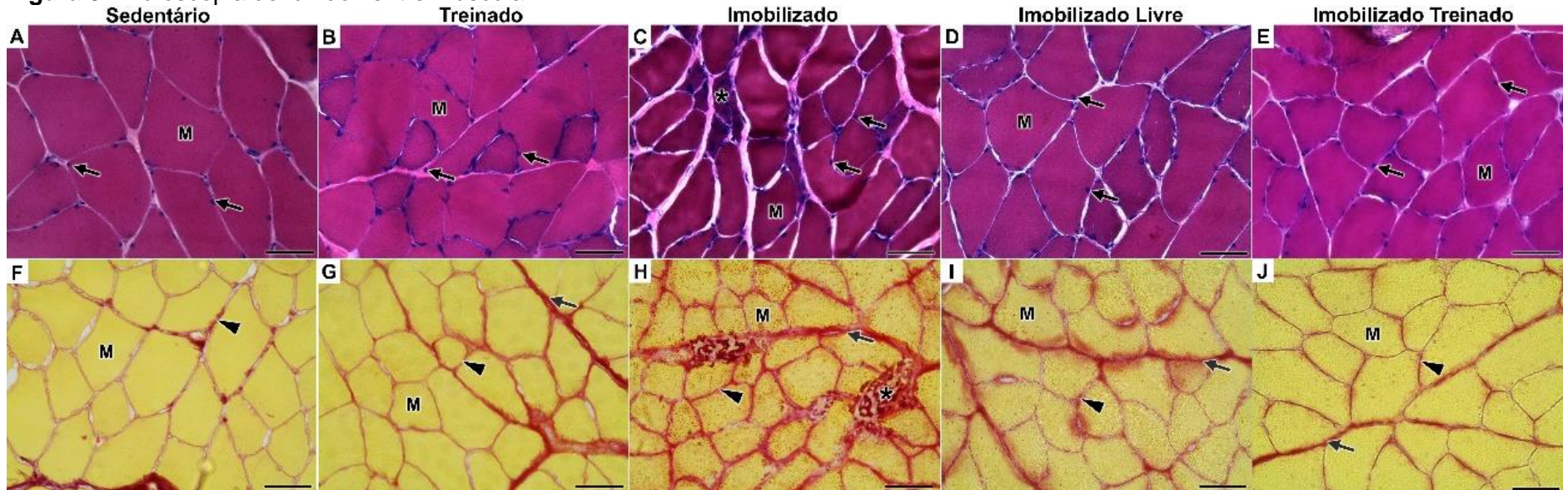
No grupo T a presença de núcleos periféricos foi mais evidente, principalmente na periferia das fibras musculares com menos diâmetro (Figura 5B), também foram identificados os feixes de tecido conjuntivo, em destaque o endomísio e perimísio (Figura 5G).

No grupo I observamos a menor densidade dos núcleos periféricos e aspectos de atrofia das fibras (Figura 5C), enquanto foi evidente a identificação do endomísio e perimísio associado as fibras, além do acúmulo de tecido conjuntivo, fibrose intersticial (Figura 5H).

No grupo IL os núcleos se apresentaram periféricos as fibras musculares (Figura 5D), e endomísio e perimísio foram evidenciados (Figura 5I).

No grupo IT também foi possível observar as fibras musculares com núcleos periféricos (Figura 5E), além do endomísio e perimísio do tecido (Figura 5J).

Figura 5. Microscopia de luz do ventre muscular.



Fonte: Elaborado pelo autor. Através da microscopia de luz evidenciamos os componentes celulares do ventre muscular dos grupos Sedentário (A, F), Treinado (B, G), Imobilizado (C, H), Imobilizado livre (D, I), e Imobilizado treinado (E, J), com as colorações de HE (A, B, C, D, E), PS (F, G, H, I, J), onde podemos observar as fibras musculares (M), os núcleos periféricos (Seta preta), e ainda o tecido conjuntivo associado, o Endomísio (Cabeça de seta), e o Perimísio (Seta cinza). No grupo Imobilizado é possível observar características de atrofia muscular (*). Barras: 50 μ m.

Os elementos estruturais da região da JMT foram apresentados através da técnica de microscopia de luz (Figura 6), onde foi possível observar a região com núcleos desorganizados (Figura 6A) e interação músculo-tendínea associado ao tecido conjuntivo (Figura 6F).

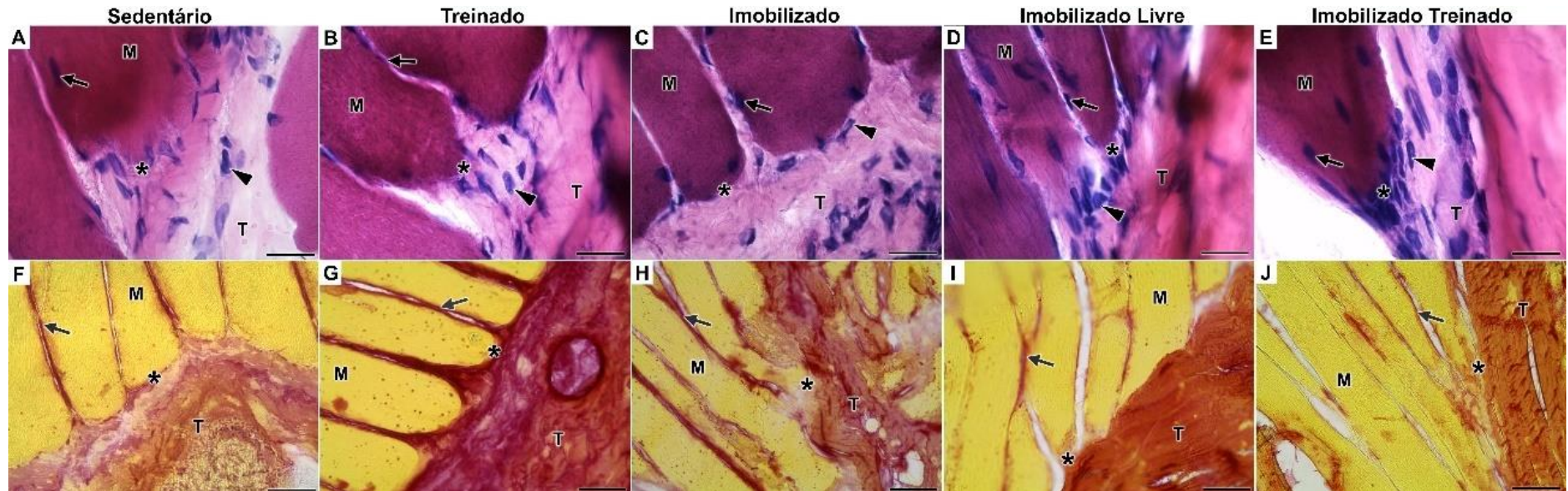
No grupo T, os núcleos musculares se apresentaram periféricos as fibras, com interação do tecido muscular e tendíneo, onde os tenócitos apresentaram com aspecto fusiforme com aglomeração na JMT (Figura 6B), além da evidente coloração/delineamento intenso do tecido conjuntivo, no endomísio e na área tendínea (Figura 6G).

No grupo I foi possível identificar aspecto arredondado na extremidade da fibra, e menor densidade dos tenócitos, estes apresentaram formato arredondado e grupamentos situados adjacentes na matriz extracelular (MEC) (Figura 6C), o tecido conjuntivo associado apresentou extensa desorganização (Figura 6H).

No grupo IL observamos núcleos musculares centralizados na região miotendínea, aumento dos tenócitos justapostos com formatos arredondados (Figura 6D). Também observamos a interação músculo-tendínea associado ao tecido conjuntivo com melhor organização (Figura 6I).

No grupo IT foram identificados núcleos musculares centralizados na região miotendínea, com aspecto cônico sua extremidade distal com expressivo aumento da quantidade de tenócitos na JMT com formatos ovais e alongados (Figura 6E). Observamos a região da JMT com desorganização do tecido conjuntivo (Figura 6J).

Figura 6. Microscopia de luz da região da junção miotendínea.



Fonte: Elaborado pelo autor. Através da microscopia de luz evidenciamos os componentes celulares da região da JMT dos grupos Sedentário (A, F), Treinado (B, G), Imobilizado (C, H), Imobilizado livre (D, I), e Imobilizado treinado (E, J), com as colorações de HE (A, B, C, D, E), PS (F, G, H, I, J), onde podemos observar as fibras musculares (M), os núcleos da fibra muscular (Seta preta), e os Tenócitos (Cabeça de seta), e ainda o tecido conjuntivo associado, o Endomísio (Seta cinza), também observamos o tendão (T) e interface músculo-tendínea, a JMT (*). Barras: 20 μm (A, B, C, D, E); e 50 μm (F, G, H, I, J).

4.2.1 Dimensão Fractal

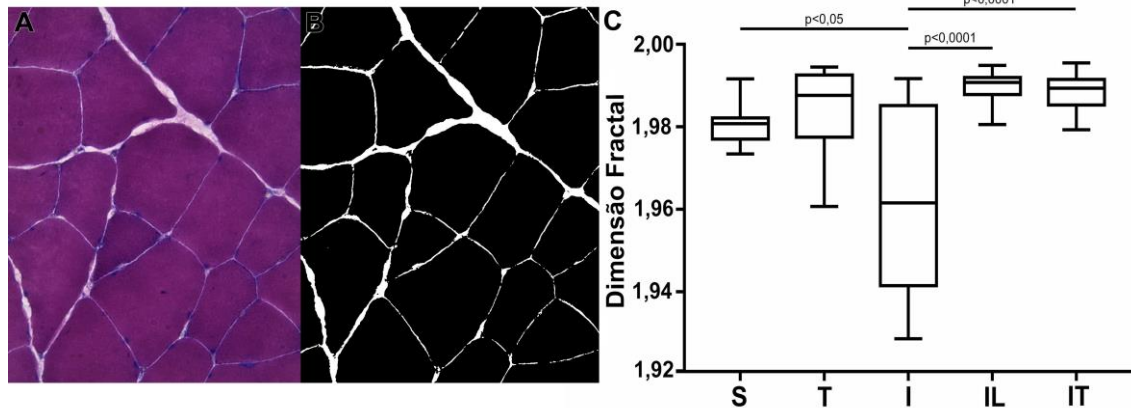
Através da DF das fibras musculares observamos diferentes organizações celulares nos grupos experimentais (Figura 7C).

O grupo S estabeleceu a organização das fibras, enquanto em comparação ao grupo T ocorreu aumento dos valores de DF e assim complexidade da sua organização ($p > 0,05$).

Com a imobilização, grupo I, as fibras se apresentaram com menores valores de DF em comparação ao grupo S ($p < 0,05$), além da elevada variação amostral na organização, diante da redução da AST das fibras.

Em comparação ao grupo I para demonstração do efeito pós imobilização, observamos que os grupos IL e IT apresentaram aumento da DF na organização das fibras ($p < 0,001$).

Figura 7. Dimensão fractal das fibras musculares.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Secção transversal do ventre muscular (coloração HE). Ampliação: 400x. (B) Imagem binarizada através do software ImageJ® com destaque das fibras musculares. (C) Médias e desvios-padrões em valores de 0 à 2 dos grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL) e Imobilizado Treinado (IT).

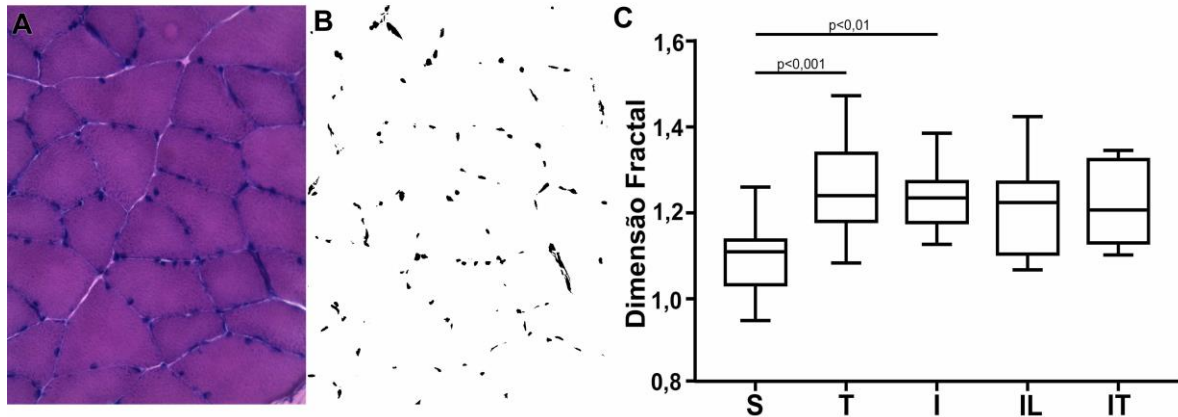
Através da DF dos núcleos celulares observamos diferentes organizações nos grupos experimentais (Figura 8).

No grupo S foi possível estabelecer a DF da disposição dos núcleos das fibras musculares. No grupo T observamos aumento dos valores de DF com maior variação na amostra em relação ao grupo S ($p < 0,001$).

No grupo I demonstrou aumento da DF e menor variação da organização em relação ao grupo S ($p < 0,01$).

Em comparação ao grupo I para apresentar os efeitos do período pós imobilização, os grupos IL e IT não apresentaram diferença nos valores de DF da organização nuclear ($p>0,05$).

Figura 8. Dimensão fractal mionuclear.



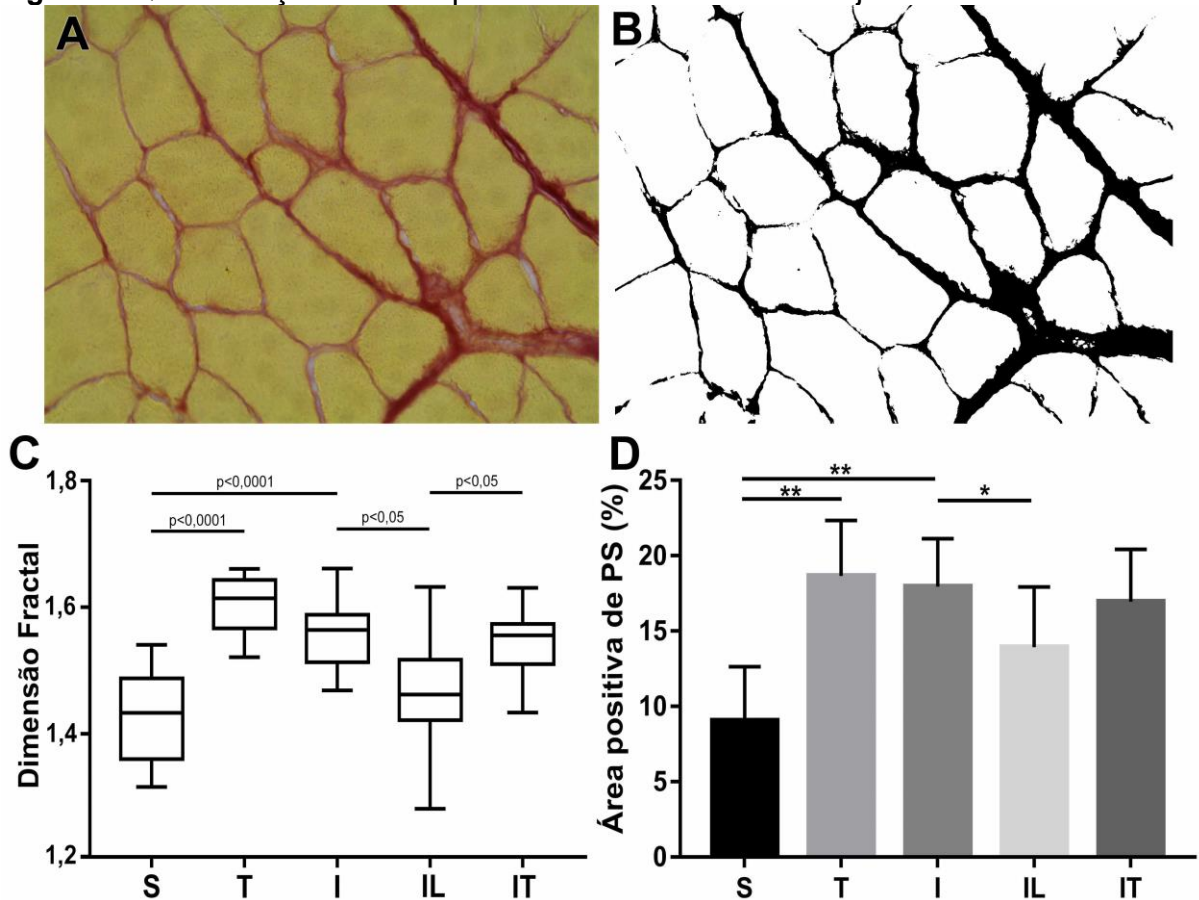
Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Secção transversal do ventre muscular (coloração HE). Ampliação: 400x. (B) Imagem binarizada através do software ImageJ® com destaque dos núcleos. (C) Médias e desvios-padrões em valores de 0 à 2 dos grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL) e Imobilizado Treinado (IT).

Através da análise de DF do tecido conjuntivo associado observamos diferentes organizações dos grupos experimentais, além da quantificação da área positiva de colágeno (Figura 9C e 9D).

Foi possível observar que o grupo T apresentou aumento dos valores de DF ($p<0,0001$), além de 105% de acréscimo na sua quantidade ($p<0,0001$). No grupo I também verificamos aumento da DF ($p<0,0001$), e acréscimo em 98% da quantidade da área positiva de tecido conjuntivo ($p<0,0001$).

Comparado ao grupo I, o período pós imobilização promoveu efeitos no grupo IL de redução dos valores de DF com ampla variação da organização da amostra ($p<0,05$) e redução da quantidade de tecido conjuntivo em 22% ($p<0,0001$). Enquanto o treinamento no período pós imobilização acarretou redução da DF ($p<0,05$) e da quantificação de tecido conjuntivo associado em apenas 5% ($p>0,05$).

Figura 9. Quantificação da área positiva de PS de tecido conjuntivo associado.

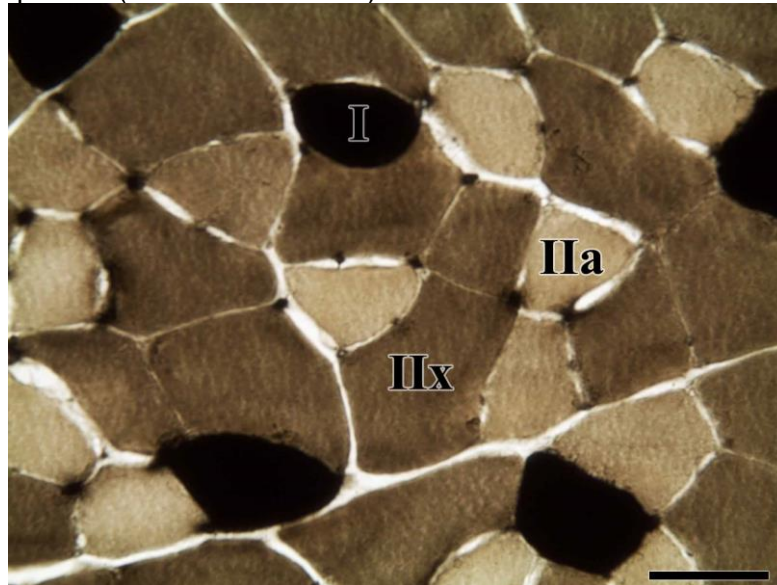


Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Secção transversal do ventre muscular (coloração PS). Ampliação: 400x. (B) Imagem binarizada através do software ImageJ® com destaque do tecido conjuntivo. (C) Médias e desvios-padrões em valores de 0 à 2. (D) Médias e desvios-padrões da quantificação da área positiva de tecido conjuntivo associado dos grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL) e Imobilizado Treinado (IT). *($p < 0,0001$); **($p < 0,005$).

4.3 Análise histoquímica (ATPase miofibrilar)

Através da análise histoquímica de ATPase miofibrilar foi possível observar os diferentes tipos de fibras musculares (Tipos I, IIa e IIx) nos grupos experimentais (Figura 10).

Figura 10. Histoquímica (ATPase miofibrilar).



Fonte: Elaborado pelo autor. Análise histoquímica de ATPase miofibrilar com diferenciação das fibras musculares dos Tipos I, IIa e IIx. Barra: 50 μ m.

4.3.1 Área de secção transversa

Através da morfometria da área de secção transversa (AST) das fibras musculares dos Tipos I, IIa e IIx, foi possível apresentar as diferenças entre os grupos submetidos a diferentes protocolos e suas repercussões na morfologia tipo-miofibrilar (Figura 11).

No grupo T foi possível observar redução da AST dos 3 Tipos de fibras musculares, no Tipo I em 24% ($p < 0,001$), no Tipo IIa em 22% ($p < 0,0001$), e no Tipo IIx em 32% ($p < 0,0001$), ambos em comparação ao grupo S.

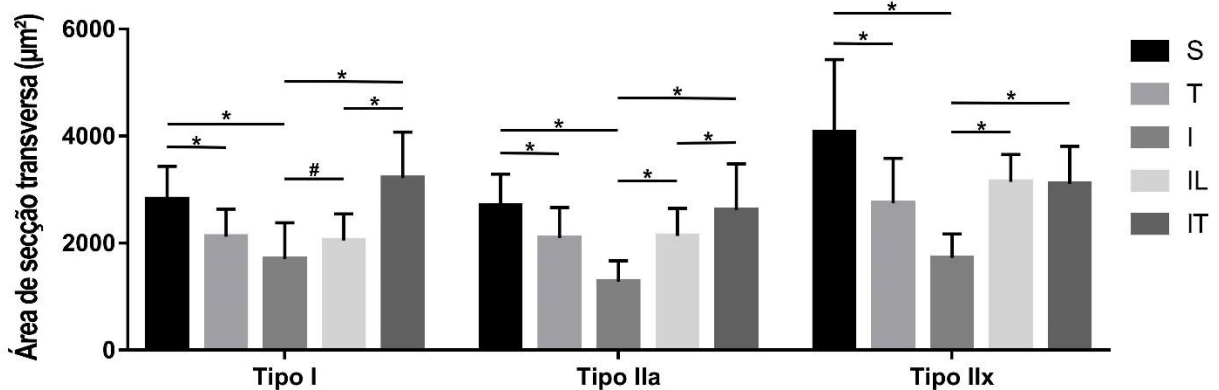
No grupo I, constatamos drástica redução da AST das fibras em relação ao grupo S, nas Tipo I de 39% ($p < 0,0001$), nas fibras Tipo IIa de 52% ($p < 0,0001$), e nas fibras Tipo IIx de 57% ($p < 0,0001$).

Em comparação ao grupo I para demonstração do efeito pós imobilização, no grupo IL observamos aumento da AST em todas as fibras, nas Tipo I de 20%

($p < 0,005$), nas Tipo IIa foi mais expressivo em 66% ($p < 0,0001$), e nas fibras Tipo IIx o aumento foi de 24% ($p < 0,0001$).

No grupo IT, também em relação ao grupo I, o treinamento pós imobilização demonstrou efeito no expressivo aumento em todas as fibras, na Tipo I de 89% ($p < 0,0001$), na Tipo IIa de 104% ($p < 0,0001$), e na Tipos IIx de 80% ($p < 0,0001$).

Figura 11. Médias e desvios-padrões da AST (μm^2) das fibras Tipo I, IIa e IIx.



Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT). * ($p < 0,0001$); # ($p < 0,001$).

4.3.2 Densidade/volume

Através da análise esteriologica da Densidade/Volume (%) do Interstício e das fibras musculares dos Tipos I, IIa e IIx, foi possível apresentar as diferenças entres os grupos submetidos a diferentes protocolos e suas repercussões na presença dos diferentes tipos de fibras, os dados estão apresentados na Tabela 2 e a representação de proporção estão ilustrados na Figura 12.

O grupo S apresentou uma predominância de fibras Tipo IIx com 53,3% ($p < 0,001$), seguido da presença de 18,6 e com ampla variação de fibras Tipo I e 14,8 de fibras Tipo IIa. Os grupos T e I apresentaram a densidade/volume das fibras semelhantes ao grupo S.

O grupo IL apresentou menor densidade/volume das fibras Tipo I, porém com a prevalência das fibras Tipo IIx como o grupo I. Enquanto o grupo IT apresentou expressivo aumento da presença de fibras Tipo I em relação ao grupo IL ($p < 0,001$), e uma redução da presença nas fibras Tipo IIx, porém esta continua a apresentar a maior densidade/volume em relação as outras fibras do grupo IT.

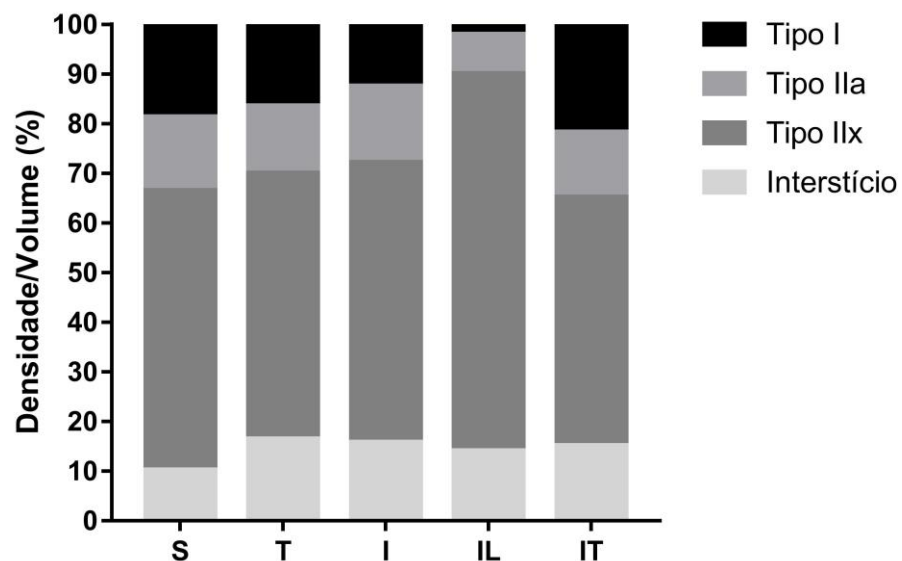
Tabela 2. Médias e desvios-padrões da Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, IIa, IIx e interstício dos grupos S, T, I, IL e IT.

Grupos Tipo	S	T	I	IL	IT
I	18,7 ± 14,5	16,5 ± 14,8	12,5 ± 11,9	2,0 ± 1,8	21,7 ± 17,7*
IIa	14,8 ± 6,1	13,5 ± 2,8	15,4 ± 5,7	7,9 ± 3,6	13,2 ± 3,8
IIx	56,3 ± 15,8#	53,6 ± 17,5#	56,3 ± 15,8#	76,0 ± 7,2#	50,0 ± 18,8** #
Interstício	10,2 ± 2,0	16,4 ± 4,9	15,8 ± 2,6	14,1 ± 2,5	15,1 ± 4,4

Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT). *IT ≠ IL ($p < 0,01$); **IT ≠ IL ($p < 0,0001$); # Tipo IIx ≠ Tipo I e Tipo IIa ($p < 0,0001$).

A figura 12 ilustra os dados revelados através na análise esteriológica de Densidade/Volume (%) em suas proporções das fibras Tipo I, IIa e IIx, bem como o interstício.

Figura 12. Médias da análise de Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, IIa, IIx e interstício dos grupos S, T, I, IL e IT.



Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT).

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Os aspectos ultraestruturais dos miofilamentos e da Junção miotendínea foram demonstrados através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 13), descritos a seguir.

No grupo S observamos a disposição longitudinal dos sarcômeros em série do ventre muscular, com definição das Bandas I, Banda A com a zona H e presença da Linha M (Figura 13A). Na área da JMT, as invaginações sarcoplasmáticas apresentam formato homogêneo com delgadas e escassas ramificações. As evaginações sarcoplasmáticas, feixes de miofilamentos distais, demonstram formato arredondado com alinhamento dos sarcômeros na região (Figura 13E).

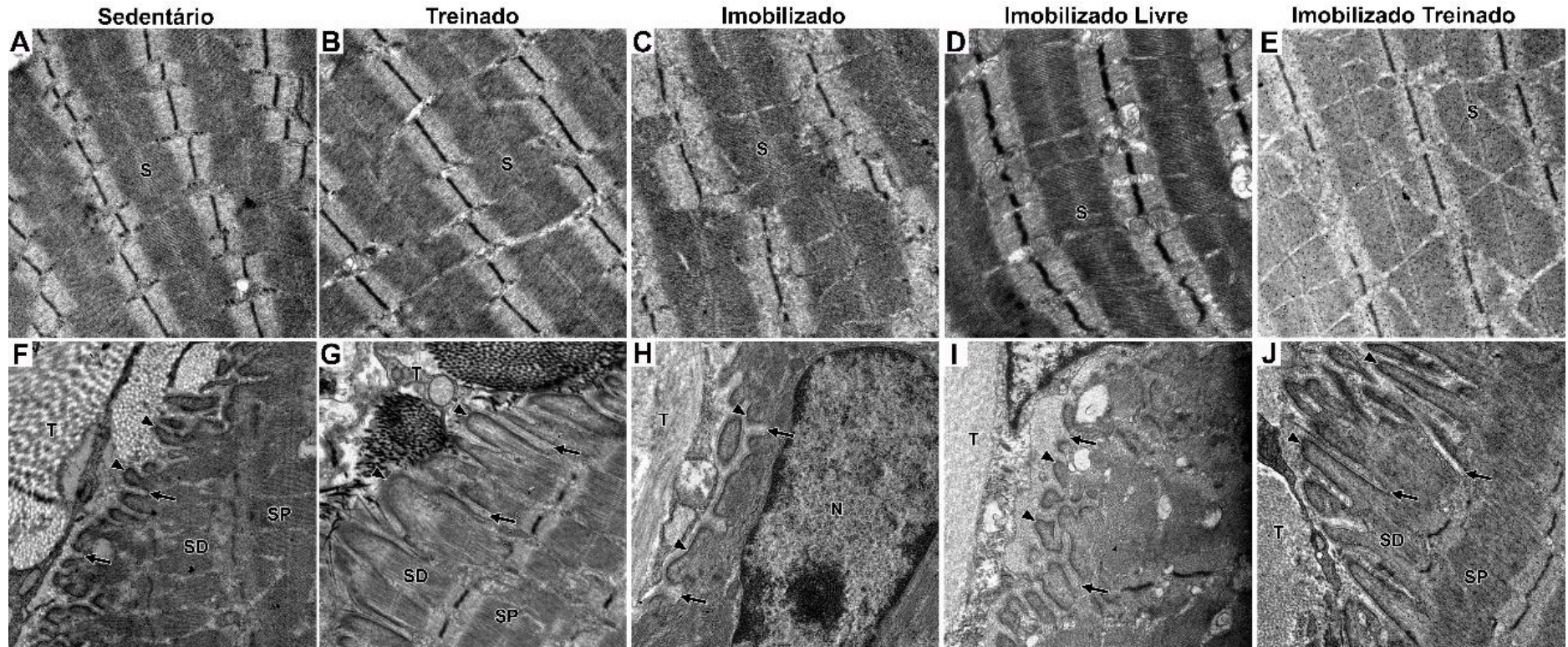
O grupo T apresentou alinhamento dos sarcômeros na região do ventre muscular (Figura 13B). Esta disposição manteve-se na região da JMT, com a presença de longos feixes de miofilamentos, evaginações sarcoplasmáticas, bem delimitadas, por longos e paralelos feixes de tecido conjuntivo, as invaginações sarcoplasmáticas (Figura 13G).

Em relação ao grupo I, foi possível observar sarcômeros desalinhados e organizados suas bandas (Figura 13C). Na JMT as invaginações sarcoplasmáticas apresentam tênues projeções espaçadas com reduzida quantidade, com comunicação entre elas. Com destaque à presença do núcleo muscular centralizado à extremidade distal da fibra (Figura 13H).

O grupo IL revelou sarcômeros em série do ventre muscular alinhados e organizados, com a presença de mitocôndrias ovais aos pares entre as linhas Z (Figura 13D). A JMT demonstrou invaginações sarcoplasmáticas curtas, ramificadas e desorganizadas evaginações sarcoplasmáticas em seus formatos e disposições (Figura 13I).

No grupo IT também observamos sarcômeros em série do ventre muscular alinhados (Figura 13E). As ultraestruturas da JMT se apresentaram extensas, com as invaginações sarcoplasmáticas alongadas e paralelas com ramificações e extensões que se aproximam da última linha Z, os sarcômeros distal, enquanto o sarcômero proximal demonstrou alinhado em adjacente à JMT (Figura 13J).

Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão do ventre muscular e da JMT dos grupos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Através da microscopia eletrônica de transmissão é possível observar os aspectos do ventre muscular (A, B, C, D, E) e da JMT (F, G, H, I, J) dos grupos Sedentário (A, F), Treinado (B, G), Imobilizado (C, H), Imobilizado Livre (D, I), e Imobilizado Treinado (E, J). Observamos os sarcômeros em série (S) no ventre muscular, na JMT está presente o sarcômero proximal (SP), o sarcômero distal (SD), as invaginações sarcoplasmáticas (Seta), as evaginações sarcoplasmáticas (Cabeça de seta) e o tecido tendíneo. No grupo I observamos um núcleo celular na região da JMT (N). Ampliações: 15000x.

4.4.1 Comprimento sarcomérico

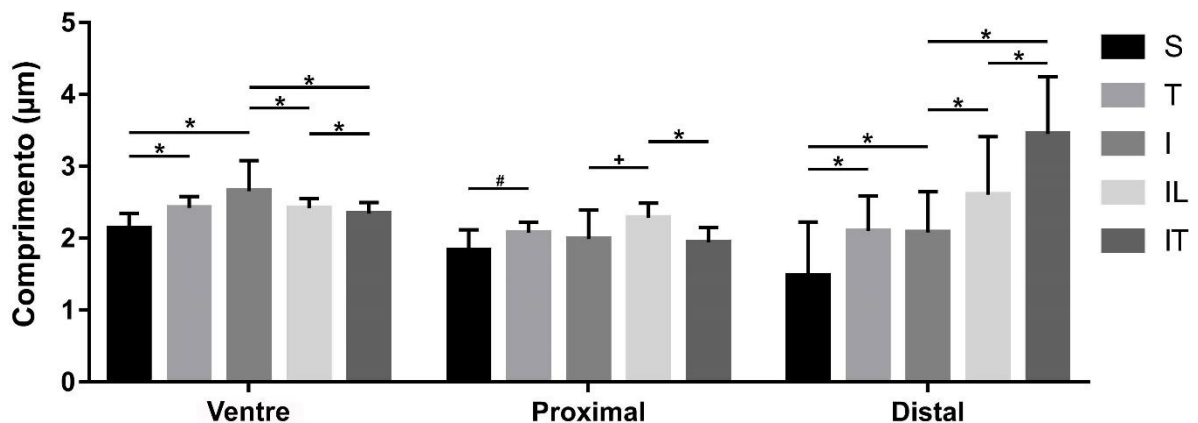
Foram mensurados os comprimentos dos sarcômeros da região do ventre muscular, e da região da JMT, os sarcômeros proximais e distais, para estabelecer as diferenças entre os grupos associados aos protocolos e as adaptações relacionadas à sua localização (Figura 14).

Observamos nos comprimentos do sarcômeros ventrais, que o grupo T apresentou aumento de 13% ($p < 0,0001$) e no grupo I de 24% ($p < 0,0001$), ambos em comparação ao grupo S. Em comparação com o grupo I, os grupos IL e IT apresentaram redução de 9% e 11% respectivamente ($p < 0,0001$), a diferença entre ambos de 3% ($p > 0,05$).

Os comprimentos do sarcômeros proximais apresentaram aumento de 13% no grupo T ($p < 0,01$) e de 8% no grupo I ($p > 0,05$), ambos em comparação ao grupo S. Enquanto em relação ao grupo I, o sarcômero proximal do grupo IL apresentou aumento de 14% ($p < 0,001$), e o grupo IT leve redução de 2% ($p > 0,05$), entre os grupos IL e IT a diferença foi de 12% ($p < 0,0001$).

Observamos no comprimento dos sarcômeros distais um expressivo aumento de 41% no grupo T ($p < 0,0001$) e de 40% no grupo I ($p < 0,0001$), ambos comparado ao grupo S. Em relação ao grupo I, o grupo IL apresentou aumento de 25% ($p < 0,0001$), enquanto no grupo IT houve elevado acréscimo de 65% ($p < 0,0001$). Entre os grupos IL e IT verificamos uma diferença de 40% ($p < 0,0001$).

Figura 14. Médias e desvios-padrões do comprimento (μm) dos sarcômeros do ventre, proximal e distal dos grupos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT). * ($p < 0,0001$); # ($p < 0,01$); + ($p < 0,001$).

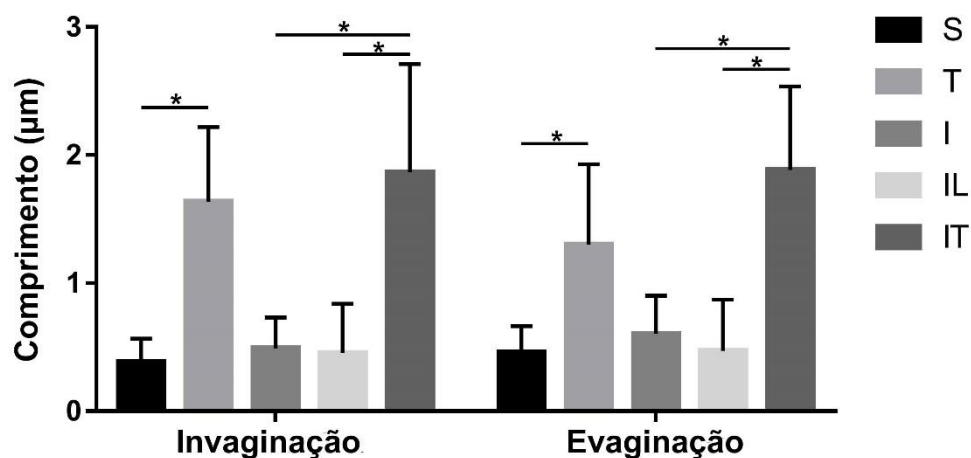
4.4.2 Invaginações e evaginações sarcoplasmáticas

Através da morfometria do comprimento e espessura das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas foi possível estabelecer diferenças estatísticas entre os grupos relacionados aos diversos protocolos e suas adaptações morfológicas (Figuras 15 e 16).

Observamos os comprimentos das invaginações sarcoplasmáticas (Figura 15), no grupo T maiores em 323% ($p < 0,0001$) em relação ao grupo S. Enquanto no grupo I foi analisado aumento de 26% comparado ao grupo S ($p > 0,05$). Para estabelecer os efeitos do período pós imobilização, em comparação ao grupo I, o grupo IL redução de 7% ($p > 0,05$), enquanto, no grupo IT houve expressivo aumento de 280% ($p < 0,0001$) em relação ao grupo I. Entre os grupos IL e IT a diferença foi de 287% ($p < 0,0001$).

Observamos os comprimentos das evaginações sarcoplasmáticas (Figura 15), no grupo T maiores em 182% ($p < 0,0001$) em relação ao grupo S. Enquanto no grupo I foi analisado aumento de 21% comparado ao grupo S ($p > 0,05$). Para estabelecer os efeitos do período pós imobilização, em comparação ao grupo I, o grupo IL com redução de 21% ($p > 0,05$), enquanto, no grupo IT houve expressivo aumento de 211% ($p < 0,0001$) em relação ao grupo I. Entre os grupos IL e IT a diferença foi de 232% ($p < 0,0001$).

Figura 15. Médias e desvios-padrões do comprimento (μm) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos grupos.

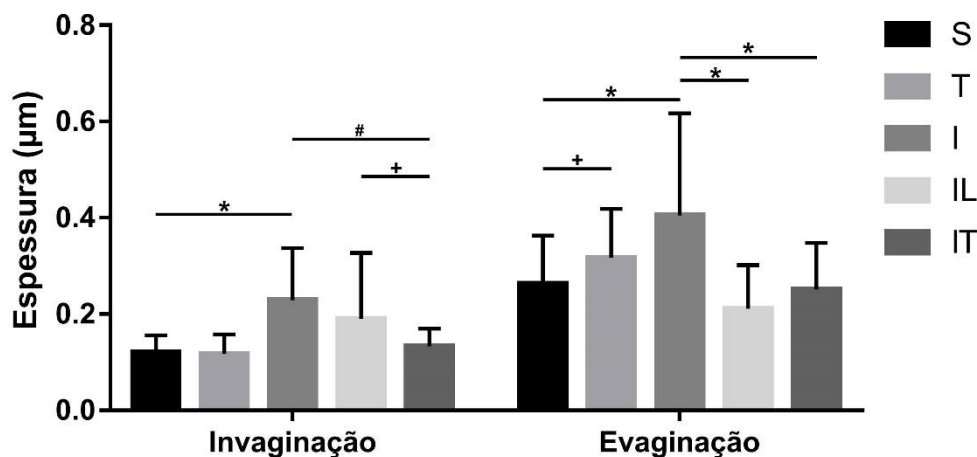


Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT). * ($p < 0,0001$).

A análise morfométrica da espessura das invaginações (Figura 16), demonstraram no grupo T redução de apenas 3% ($p>0,05$), enquanto no grupo I ocorreu aumento expressivo de 89% ($p<0,0001$), ambos em comparação ao grupo S. Após o período pós imobilização, comparado ao grupo I, o grupo IL apresentou redução de 17% ($p>0,05$), e no grupo IT também em relação ao grupo I a redução foi de 42% ($p<0,001$), entre IL e IT a diferença foi de 35% ($p<0,01$).

A análise morfométrica da espessura das evaginações (Figura 16), demonstraram no grupo T aumento de 20% ($p<0,01$), enquanto no grupo I ocorreu aumento expressivo de 54% ($p<0,0001$), ambos em comparação ao grupo S. Após o período pós imobilização, comparado ao grupo I, o grupo IL apresentou redução de 47% ($p<0,001$) e no grupo IT também em relação ao grupo I a redução foi de 42% ($p<0,001$), entre IL e IT a diferença foi de apenas 5% ($p>0,05$).

Figura 16. Médias e desvios-padrões da espessura (μm) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos grupos.



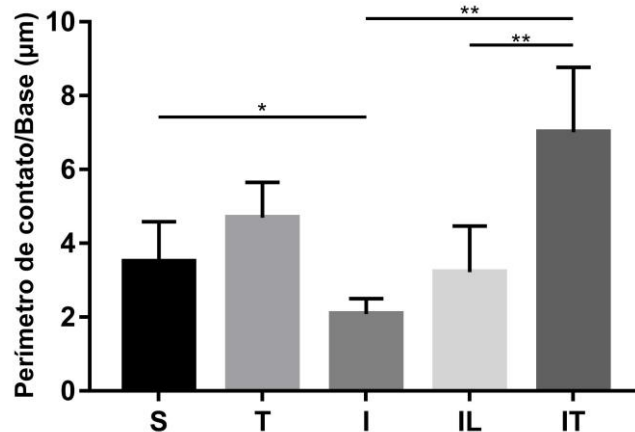
Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT). + ($p<0,01$); # ($p<0,001$); * ($p<0,0001$).

4.4.3 Perímetro de contato

A análise morfométrica de perímetro de contato da JMT por sua base (Figura 17), demonstrou no grupo T aumento de 34%, enquanto, o grupo I apresentou valores menores em 40% ($p<0,05$), ambos em comparação ao grupo S. Para estabelecer os efeitos do período pós-imobilização, em comparação ao grupo I, o grupo IL teve aumento de 54%, enquanto, no grupo IT houve expressivo aumento de

236% ($p < 0,0001$) também em relação ao grupo I. Entre os grupos IL e IT a diferença foi de 182% ($p < 0,0001$).

Figura 17. Médias e desvios-padrões do Perímetro de contato/Base (μm) da JMT dos grupos.

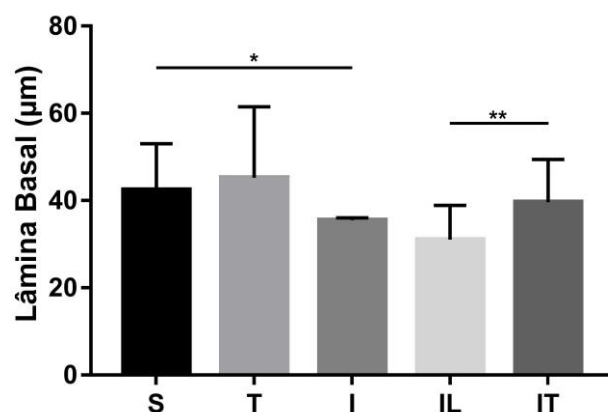


Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT). * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,0001$).

4.4.4 Lâmina basal

Em análise morfométrica da espessura da lâmina basal da JMT (Figura 18), o grupo T apresentou leve aumento de 6%, enquanto o grupo I apresentou valores reduzidos em 16% ($p < 0,05$), ambos comparados ao grupo S. Em relação ao grupo I, o grupo IL apresentou leve redução de 12%, e o grupo IT aumento em 11%. Enquanto entre os grupos foi mensurada a diferença de 23% ($p < 0,01$).

Figura 18. Médias e desvios-padrões da espessura (μm) da Lâmina Basal dos grupos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos Sedentário (S), Treinado (T), Imobilizado (I), Imobilizado Livre (IL), e Imobilizado Treinado (IT). * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$).

4.5 Microscopia confocal de varredura a laser

Através da imunomarcacão observamos a região terminal da fibra muscular localizada na JMT, e a organizaçãõ dos núcleos na região (Figura 19), descritos a seguir.

No grupo S observamos a disposiçãõ longitudinal das fibras musculares e a região distal com formato cônico, os núcleos destacados apresentam disposiçãõ na periferia da fibra e na região da JMT com pequena densidade.

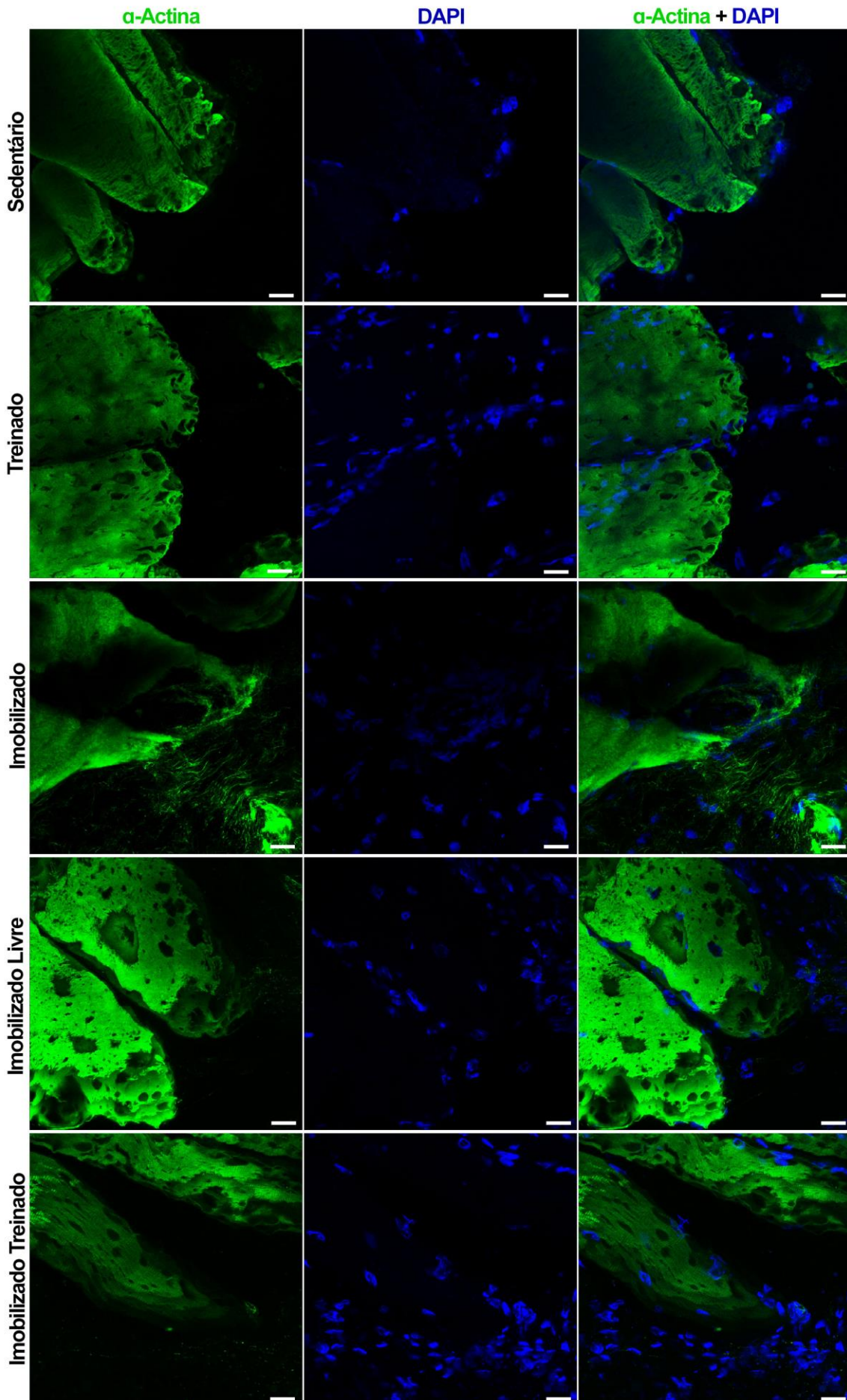
O grupo T apresentou as fibras musculares disposta longitudinalmente com formato côncavo, permitindo ampla área de contato, é possível observar grande densidade de núcleos dispostos nas fibras musculares em direçãõ ao tendãõ, diferente quando comparado ao grupo S.

No grupo I observamos a disposiçãõ longitudinal da fibra e a região distal apresenta um formato cônico e desorganizado. Os núcleos celulares estãõ presentes na fibra muscular mais profundamente, e estãõ presentes núcleos adjacentes ao tendãõ.

O grupo IL apresentou as fibras musculares com aspectos crivado e formato côncavo na região distal. A presençã dos núcleos é observada entre as fibras musculares bem como lateralmente na MEC, porém na JMT não foi observado sua presençã.

No grupo IT observamos a disposiçãõ longitudinal da fibra e a região distal apresenta um formato cônico. Os núcleos se apresentam na periferia das fibras, na JMT observamos sua grande densidade, e da mesma forma a presençã de núcleos no tendãõ.

Figura 19. Microscopia confocal de varredura a laser da JMT dos grupos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Imunomarcaco das fibras musculares em coloraco verde (α -Actina) e dos núcleos em coloraco azul (DAPI) da região da JMT dos grupos. Observamos a disposico das fibras musculares e os núcleos com reduzida presença no grupo S. No grupo T a disposico nuclear  aumentada. No grupo I as fibras musculares estão com aspecto desorganizado e com núcleos adjacentes. No grupo IL não observamos a presença de núcleos adjacentes a JMT. O grupo IT apresenta aumento da densidade nuclear na fibra muscular, na JMT e no tendão. Barras: 10 μ m.

5. DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste estudo revelam os efeitos da atrofia muscular por desuso, induzida através da imobilização articular experimental, e as alterações decorrentes da remobilização livre e aquática para efeito terapêutico no ventre muscular e repercussão no complexo musculo-tendíneo.

O grupo S e T apresentaram aumento da massa muscular entre o 1º e 3º período, possível consequência do crescimento e desenvolvimento do animal neste período, em sua fase de jovem adulto como descrito por Quinn (2005).

Enquanto, os grupos submetidos a imobilização articular apresentaram redução significativa na massa corporal em decorrência da atrofia por desuso que provavelmente demonstrou efeitos no organismo como um todo, devido redução da densidade mineral óssea e líquido sinovial das articulações como descritor por Kunz et al. (2015), em modelo de imobilização associada a remobilização aquática, como também por Vieira et al. (2017) em modelo de compressão de nervo isquiático e exercício resistido, bem como a redução de massa muscular em todo segmento do membro imobilizado e contralateral, como apresentado por Kunz et al. (2013).

O período pós imobilização estabeleceu o retorno da massa corporal tanto após remobilização livre na gaiola quanto no grupo associado ao treinamento aquático, tais efeitos que exercício físico promove podem ser relacionados a reversão da perda de massa decorrente de atrofia muscular como apresentado por Kannus et al. (1998). Como também na sarcopenia durante o envelhecimento descrito por White et al. (2016) e Clark (2018), que podem ter promovido o reestabelecimento da massa corporal descrita por Kinney (2017).

A análise de dimensão fractal apresentou um modelo de avaliação da complexidade de organização dos diferentes elementos teciduais do ventre muscular, observamos no grupo S, achados semelhantes aos de Cury et al. (2018), na organização dos núcleos e da organização do tecido conjuntivo, além de descrever os efeitos da distrofia muscular.

Revelamos através da dimensão fractal que o treinamento (grupo T) não promoveu alteração na complexidade de organização miofibrilar, entretanto promove adaptações de aumento na análise da disposição nuclear na periferia dos miócitos, que está relacionada a alta atividade celular, devido ao aumento do estresse

mecânico decorrente do exercício físico, esta resposta adaptativa é positiva para melhor desempenho muscular, como apresentado por Paul et al. (2002).

Verificamos da mesma forma no grupo T o aumento da complexidade e área positiva de tecido conjuntivo, que é comprovado devido aumento de força gerada adjacente do miofilamento durante o exercício físico, proveniente do sarcolema ao citoesqueleto para maior transmissão de força transversal, que repercute no endomísio e perimísio apresentado por Knudsen et al. (2015). Como descrito por Qaisar (2016), também diante ao treinamento ocorre aumento da densidade de capilares e fusos neuromusculares localizados no endomísio, que em nosso estudo foi mensurado juntamente na análise devido a localização destas estruturas.

Compreendemos que a imobilização articular acarreta em atrofia, que acompanha efeitos deletérios em todo tecido muscular, diante disto, associamos as alterações observadas de redução da complexidade das fibras musculares, como efeitos fibróticos, descrito por Jarvinen et al. (2002), bem como também aponta a redução da capilarização musculoesquelética decorrente da atrofia muscular.

A imobilização articular apresentou aumento da complexidade dos mionúcleos como efeito da atrofia muscular, caracterizada pela redução de AST das fibras, estes resultados não corroboram como descrito na literatura por Gundersen e Bruusgaard (2008) sobre apoptose dos mionúcleo na atrofia, entretanto, estes autores ainda demonstram a limitação que os demais núcleos associados aos efeitos da atrofia muscular como as células satélites não foram diferenciadas em nossas análises. Entretanto Garcia et al. (2018) com análise de dimensão fractal descreve o aumento da desorganização mionuclear em modelo de lesão.

No ventre muscular o período pós imobilização sem nenhuma intervenção demonstrou um retorno da organização das fibras, sem diferença na organização mionuclear, porém com significativa redução do tecido conjuntivo, os efeitos fibróticos apresentado anteriormente, possivelmente devido à alta plasticidade do tecido muscular descrita por Chargé e Rudnicki (2004), que ao estímulo de regeneração após a retirada do dispositivo de imobilização.

O treinamento após a imobilização articular demonstrou efeitos no ventre muscular de aumento da complexidade de organização das fibras musculares e sem alteração dos mionúcleos, estes resultados são semelhantes ao grupo apenas treinado. Podemos associar estes resultados aos efeitos do exercício físico descrito por Frontera e Ochala (2015), que o tecido muscular possui alterações estruturais e

metabólicas induzidas por vias que contribuem a regeneração e adaptação muscular ativadas pelo treinamento.

Enquanto no tecido conjuntivo no grupo IT não houveram alterações em sua organização e quantidade, seu volume total pode ter reduzido e ocorrido um aumento da capilarização como descrito por Kannus et al. (1996) em estudo com exercício de baixa intensidade após imobilização, e ainda parâmetro benéficos podem ter se reestabelecidos como descrito por Gomes et al. (2016) em seu estudo também com remobilização através do treinamento aquático que apresentou retorno da massa e da força muscular com a intervenção.

O músculo gastrocnêmio possui maior predominância de fibras Tipo II que proporcionam maior produção de força de contração e maior capacidade plástica como demonstrado por Jarvinen et al. (2002), observamos em nossos resultados do grupo S que mais de 50% é composto por fibras musculares do Tipo IIx, seguido das fibras Tipo I e Tipo IIa.

O treinamento aeróbio é conhecido por apresentar evidentes relações com fibras Tipo I, devido a maior rede de vascularização, maior densidade mitocondrial, maior período do pico de tensão, melhor capacidade de resistência a fadiga, porém, não apresenta alterações na AST como apresentado por Qaisar et al. (2016), enquanto em nossos resultados no grupo T observamos decréscimo em todos os tipos fibras, possivelmente, devido aos animais já apresentarem a menor massa corporal analisada. O treinamento aeróbio também não promoveu alterações evidentes em relação a densidade/volume das fibras musculares, que permanece proporcional ao grupo S.

Com a imobilização articular demonstramos extensa redução da AST e sem alteração de sua densidade dos 3 tipos de fibras musculares analisadas, que corroboram com as descrições de Frontera e Ochala (2015), que definem a atrofia muscular por desuso como redução de tamanho e perda de organelas, citoplasma e proteínas, devido ao desequilíbrio da síntese e degradação, que promovem o decréscimo na qualidade dos elementos contrácteis em ambos os tipos de fibras, I e II.

Com período de remobilização sem intervenção, grupo IL, a AST apresentou acréscimo também em todos os tipos de fibras musculares, entretanto ainda reduzido em relação ao controle, estes resultados corroboram com os encontrados por Slimani et al. (2015) no músculo tibial anterior em período de 10 dias pós

imobilização, estas evidências apresentadas demonstram que mesmo o músculo esquelético possuindo grande habilidade plástica a diversos estímulos sua recuperação após atrofia muscular por desuso é demorada.

O treinamento aquático como remobilização demonstrou efetivo retorno da AST com acréscimo da área de todos os tipos de fibras musculares analisadas, inclusive com significativa melhora em relação ao período sem treinamento (grupo IL) nas fibras Tipo I e IIa, que corroboram com as descrições de Machida e Booth (2004) que as fibras musculares na idade dos animais analisados apresentam eficácia na recuperação principalmente associado ao aumento de mionúcleos, fatores estimulantes de células satélites que promovem sua ativação e diferenciação, estes autores também relatam a influência do aumento do influxo de Ca^{2+} para este retorno.

Observamos também que o treinamento aquático apresentou diferenças na composição das fibras musculares em relação ao grupo sem nenhuma intervenção (IL), nas fibras Tipo I quais possuem maior densidade de mitocôndrias e rede de vascularização que podem promover melhoras para a atrofia muscular, associamos ao treinamento aquático promover estes estímulos de forma mais expressiva devido as constantes contrações musculares, devido aumento de proteínas contrácteis descrito por Hawley et al. (2014).

Em relação ao comprimento dos sarcômeros, observamos que o ventre possui maiores comprimentos que em relação a região da JMT, Moo et al. (2018) descreve a alteração dos comprimentos em diferentes locais musculares e confirmou a não-uniformidade dos comprimentos em uma mesma fibra muscular.

Com o treinamento revelamos maiores comprimentos dos sarcômeros em ambas as regiões, autores já relatam variação do comprimento dos sarcômeros devido sua localização dentro de um mesmo miofilamento descrito por Ertbjerg e Puolanne (2017), e Sierra et al. (2018) descreve maiores comprimentos sarcoméricos localizados na região da JMT devido aumento da tensão exercida.

Os efeitos imobilizatórios de aumento no comprimento dos sarcômeros foram demonstrados no ventre e nos sarcômeros distais, que corroboram com o estudo de Gibbons et al. (2018) devido a redução das proteínas contrácteis influenciada pela redução da demanda contráctil e desorganização estrutural do miofilamento que decorre em aumento do comprimento, além dos aspectos que analisamos

morfologicamente de desorganização dos sarcômeros devido alteração das proteínas contrácteis constituintes.

Com o período de remobilização sem intervenção observamos que enquanto o sarcômeros do ventre apresentaram redução, os sarcômeros da região miotendínea apresentaram aumento, resultado esperado devido as evidências de Rassier et al. (2017) que este período demonstra recuperação parciais dos movimentos de deambulação do animal na gaiola e assim recuperação do período de desequilíbrio proteico de síntese e degradação que pode proporcionar retorno da força elástica com as pontes cruzadas.

Enquanto com a remobilização aquática apresentaram os sarcômeros do ventre e proximais com comprimentos reestabelecidos, porém, no sarcômero distal o aumento foi evidente, possivelmente devido a associação na variabilidade na formação e disposição sarcomérica diante da atividade crônica exercida pelo músculo (MOO et al., 2016). Além da prática de atividade física como o alongamento já é descrita por Riley et al. (2004) por apresentar efeitos benéfico aos sarcômeros como melhora da redução dos filamento de actina e miosina e da deterioração muscular.

Os componentes estruturais da JMT, apresentam adaptações diferenciadas em relação aos protocolos adotados, estes resultados demonstram a alteração da área de contato músculo-tendínea e que a relação comprimento e espessura com o treinamento foi efetiva, diante da capacidade adaptativa deste complexo amplos estudos são associados nesta região para melhora da qualidade muscular associado a processos de reabilitação, como Sierra et al. (2018) e Jacob et al. (2019).

Nos aspectos morfológicos da JMT com o treinamento, observamos as disposições e formatos dos fibroblastos em grande quantidade e adjacente ao complexo musculo-tendíneo, que demonstra a alta atividade celular no local, estes resultados corroboram com os de Curzi et al. (2015), que descreveram as adaptações proteicas de ancoragem da JMT, que apresenta a capacidade do exercício físico em modular a interface músculo-tendão necessária para a transmissão de força, além disso, Kojima et al. (2008) ainda apresenta a maior interação miotendínea com o treinamento aeróbio ao revelarem no modelo maior quantidade de ramificações.

O grupo T, em análise ultraestrutural dos componentes da JMT resultaram expressivo aumento dos comprimentos das invaginações e evaginações

sarcoplasmáticas, e aumento da espessura das evaginações e sem alteração nas invaginações, promove otimização da transmissão de força e prevenção a lesões no local. Estes resultados corroboram com os achados de Curzi et al. (2012), sobre o exercício aeróbio em esteira promover alterações no ângulo e ramificação das projeções dos “finger-like process” em resposta ao aumento de tensão, com invaginações sarcoplasmáticas que adentram profundamente o ventre muscular. Curzi et al. (2016) ainda descrevem que as invaginações formam uma rede de tendões que se comunicam, que corrobora com nossos resultados de aumento de 34% do perímetro de contato porém sem significância.

Foi possível revelar o efeito da imobilização articular na região da JMT, onde houve presença reduzida de fibroblastos, que são comumente observados dispostos próximos a JMT em extensa quantidade como demonstrado em estudo de Curzi et al. (2013a), nossos resultados indicam a redução da produção de elementos da MEC, como proteínas que ligam a lâmina própria à fibras colágenas.

No tecido conjuntivo associado a JMT com a imobilização apresentou-se desorganizado principalmente no tecido tendíneo em interação com o tecido muscular, possivelmente devido ao período de inatividade muscular acarretar na alteração da conformação de ligantes extracelulares e de propagação de força, como a integrina transmembranar descrito por Olsen, Nicoll e Fry (2019), devido ao musculoesquelético apresentar extrema sensibilidade a estímulos mecânicos tanto quanto a sua ausência no período imobilizatório.

Não observamos efeitos da imobilização em relação ao comprimento mas sim em evidente aumento da espessura das invaginações e evaginações, que significam uma região de interação com baixa complexidade, conseqüente reduzido perímetro de contato em 40% que atenuam a interação entre os tecidos muscular e tendíneo, que corroboram com os resultados de Curzi et al. (2013b) nesta análise, e reduzem a magnitude de transmissão da tensão aplicada da AST para a interface proporcionando pré disposição a lesões por força de cisalhamento como apresentado por Palma et al. (2011).

Revelamos que a superfície entre os terminais do miofilamento e a MEC, a lâmina basal, apresenta redução da espessura com a imobilização, em estudo de Kannus et al. (1992) também em modelo de atrofia muscular por desuso observaram um espessamento da lâmina basal, que não corroboram com nossos achados, entretanto o controle utilizado foi a perna contralateral, estes autores também

observaram aumento de colágeno tipo II na JMT, além da redução do conteúdo de glicoaminoglicanas e proteoglicanas da MEC, fatores que apresentam menor estabilidade e transmissão de força no local.

Todavia a morfologia geral da JMT é alterada com a atrofia induzida pela imobilização articular, como podemos observar um mionúcleo na região, efeito comumente observado no desenvolvimento miofibrilar ou na recuperação de inflamações e miopatias descritos nestes modelos por Cury et al. (2018) e Perillo e Folker (2018), entretanto não analisado na região da JMT, compreendemos que a localização mionuclear é determinada diante da sua função, possivelmente apresentava-se no local em detrimento dos estímulos de remodelamento associado a atrofia muscular.

A região miotendínea demonstrou reorganização da JMT no período pós imobilização sem intervenção e com grande quantidade de fibroblastos na região, que indica maior atividade celular no local, entretanto o arranjo do tecido tendíneo demonstra orientação verticalizada em relação ao tecido muscular, como é necessário para a transmissão de força uniforme no complexo músculo-tendão como apresenta Knudsen (2015) em modelo de JMT em 3D.

O período de remobilização sem intervenção não apresentou efeitos de aumento no comprimento das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas em relação a imobilização, apenas em relação a espessura das evaginações observamos aumento e poucas ramificações, conseqüentemente não observamos alteração no perímetro de contato. Em estudo com grupo imobilizado sem intervenção semelhante realizado por Carvalho et al. (2009) ocorreu a redução das propriedades mecânicas do músculo no período pós-imobilização, que caracterizam o tecido muscular com frágil arquitetura e suscetível a lesões, e em estudo de Jarvinen et al. (2005) com efeitos deletérios na força.

A região da JMT apresentou extensa reorganização com o período pós imobilização associado a intervenção com treinamento aquático, que demonstrou grande atividade celular na região com grande concentração de mionúcleos e fibroblastos em direção a JMT, estas características são descritas por Curzi (2013a) pela íntima relação com o desenvolvimento da interface musculo-tendínea, principalmente pela adaptação dos “elementos elásticos” que influenciam no angulo de penetração do tendão na região.

A remobilização aquática se demonstrou efetiva na reversão dos efeitos deletérios nos componente da JMT, com aumento dos comprimentos e redução da espessura, demonstrando também amplo perímetro de contato entre os tecidos com aprofundamento das invaginações e melhor transmissão de força que proporciona uma interface que minimiza a concentração de estresse que geralmente decorre em lesão no local, como também apresentado em remobilização por alongamento por Vesilceac et al. (2011).

Observamos que a remobilização aquática promoveu espessamento significativo da lâmina basal, Curzi et al. 2016 apresenta alterações nesta ultraestrutura decorrentes do treinamento aeróbio semelhantes as encontradas em nosso estudo, devido sua grande densidade de proteínas ligantes e de ancoragem dos miofilamento de actina, além das alterações colágenas da MEC que influencia no desempenho da JMT como apresentado também por Subramanian e Schilling (2015).

Os benefícios do treinamento no período pós-imobilização no tecido muscular foram descritos por proporcionar a reversão de efeitos deletérios decorrentes da imobilização e melhora nas propriedades biomecânicas muscular corroborando com Silva et al. (2013), onde demonstramos alterações em relação ao efeito da imobilização articular, além da plasticidade diferenciada do grupo IL, demonstrando o treinamento como um efetivo método de aumento da área de contato dos tecidos musculotendíneo que pré dispõe esta região a redução da ancoragem de proteínas contrácteis que sofrem atrofia e pré-disposição á lesões neste período.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluímos através dos modelos experimentais analisados que ocasionam em alterações morfoquantitativas no ventre muscular e JMT do músculo gastrocnêmio, descritas a seguir:

- O treinamento de natação promove no ventre muscular alterações na organização dos mionúcleos e do tecido conjuntivo associado, bem como também apresentou aumento da atividade celular na região da JMT, e aumento dos comprimentos das invaginações e evaginações, que promovem maior área de ancoragem e melhor desempenho na transmissão de força pelo complexo músculo-tendão;
- A imobilização articular decorreu em atrofia muscular caracterizada pela redução da AST e alterações em toda organização dos elementos do ventre muscular associado a fibrose intramuscular, além do aumento dos comprimentos sarcômericos na região. Na JMT a imobilização articular apresentou redução da atividade celular e aumento da espessura das ultraestruturas, bem como redução de todo perímetro de contato da JMT;
- A remobilização livre demonstrou no ventre reestabelecimento da organização miofibrilar e mionuclear, enquanto no tecido conjuntivo e AST mesmo com redução não retornou aos parâmetros iniciais. A JMT apresentou aumento da atividade celular, entretanto com ausência de alterações ultraestruturais benéficas para a transmissão de força que pode promover aumento da pré-disposição a lesão no local.
- A remobilização aquática demonstrou efetividade na adaptação dos elementos do ventre muscular, sua complexidade de organização e AST de todos os tipos de fibras, bem como apresentou o retorno das alterações no comprimento dos sarcômeros. A JMT demonstrou intensa remodelação, com aumento da atividade celular, também significativo no sarcômero distal, e aumento das ultraestruturas das JMT, como as projeções sarcoplasmáticas, perímetro de contato e lâmina basal, estas adaptações promovem diversos benefícios para a efetiva reabilitação e prevenção de lesões na transmissão de força do músculo para o tendão. Demonstramos então que a remobilização através do treinamento aquático é efetiva como método de reabilitação para os

remodelamentos decorrentes da atrofia muscular por desuso que repercutem no complexo local de transmissão de força do aparelho locomotor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPELL, H. J. Muscular Atrophy Following Immobilisation: A Review. **Sports Medicine**, v. 10, n. 1, p. 42–58, 1990.
- BANZ, W. J.; MAHER, M. A.; THOMPSON, W. G.; BASSETT, D. R.; MOORE, W.; ASHRAF, M.; KEEFER, D. J.; ZEMEL, M. B. Effects of resistance versus aerobic training on coronary artery disease risk factors. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 4, p. 434–440, 2003.
- BHUTDA, S.; SURVE, M.; ANIL, A.; KAMATH, K.; SINGH, N.; MODI, D.; BANERJEE, A. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. **Bio-Protocol**, v. 7, n. 21, 2017.
- BOLINA, C. de S.; BOLINA-MATOS, R. D. S.; ALVES, P. H. D. M.; CURY, D. P.; CIENA, A. P.; WATANABE, I. S. 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.
- BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. The use and abuse of muscle histochemistry. **Histochemistry**, p. 121–144, 1974.
- CAÇÃO-BENEDINI, L. O.; RIBEIRO, P. G.; GOMES, A. R. S.; YWAZAKI, J. L.; MONTE-RASO, V. V.; PRADO, C. M.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat. **Acta Histochemica**, v. 115, n. 5, p. 460–469, 2013.
- CAMPOS, G. E. R.; LUECKE, T. J.; WENDELN, H. K.; TOMA, K.; HAGERMAN, F. C.; MURRAY, T. F.; RAGG, K. E.; RATAMESS, N. A.; KRAEMER, W. J.; STARON, R. S. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: Specificity of repetition maximum training zones. **European Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 1–2, p. 50–60, 2002.
- CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 6, p. 655–658, 2014.
- CARVALHO, L. C.; POLIZELLO, J. C.; PADULA, N.; FREITAS, F. C.; SHIMANO, A. C.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. **Acta Ortop Bras**, v. 17, n. 5, p. 269–272, 2009.
- CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 209–238, 2004.
- CHARVET, B.; RUGGIERO, F.; LE GUELLEC, D. The development of the myotendinous junction. A review. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 2, n. 2, p. 53–63, 2012.

CIABATTARI, O.; DAL PAI, A.; DAL PAI, V. Effect of swimming associated with diet on the anterior tibial muscle of rats: Morphological and histochemical study. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 2, p. 121–125, 2005.

CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; ALVES, P. H. M.; BOLINA-MATOS, R. S.; JOSÉ DIAS, F.; ISSA, J. P. M.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Histochemical and ultrastructural changes of sternomastoid muscle in aged wistar rats. **Micron**, 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, n. 9, p. 1292–1296, 2012.

CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; ALMEIDA, S. R. Y.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. sei. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011–1014, 2010.

CLARK, B. C. Neuromuscular Changes with Aging and Sarcopenia. **The Journal of Frailty & Aging**, v. 8, n. 1, p. 1–3, 2018.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FANÇA, 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.

CRETOIU, D.; PAVELESCU, L.; DUICA, F.; RADU, M. Myofibers. v. 1088, 2018.

CURY, S. S.; FREIRE, P. P.; MARTINUCCI, B.; SANTOS, V. C.; OLIVEIRA, G.; FERRETTI, R.; DAL-PAI-SILVA, M.; PACAGNELLI, F. L.; DELELLA, F. K.; CARVALHO, R. F. Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 1, p. 109–115, 2018.

CURZI, D. Ultrastructural study of myotendinous junction plasticity: from disuse to exercise. **Sport Sciences for Health**, v. 12, n. 3, p. 279–286, 2016.

CURZI, D.; AMBROGINI, P.; FALCIERI, E.; BURATTINI, S. Morphogenesis of rat myotendinous junction. **Muscle, Ligaments and Tendons Journal**, v. 3, n. 4, p. 275–280, 2013a.

CURZI, D.; BALDASSARRI, V.; DE 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**, v. 30, n. 4, 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. p. 46–52, 2013b.

CURZI, D.; SALUCCI, S.; MARINI, M.; ESPOSITO, F.; AGNELLO, L.; VEICSTEINAS, A.; BURATTINI, S.; FALCIERI, E. How physical exercise changes rat myotendinous junctions: An ultrastructural study. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, n. 2, p. 117–122, 2012.

CURZI, D.; SARTINI, S.; GUESCINI, M.; LATTANZI, D.; PALMA, M. D.; AMBROGINI, P.; SAVELLI, D.; STOCCHI, V.; CUPPINI, R.; FALCIERI, E. Effect of different exercise intensities on the myotendinous junction plasticity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.

DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, M. R.; VILORIA, M. I. V.; NATALI, 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.

DURO, C. C.; CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; RIGHETTI, M. M. S.; GRISOLIA, D. F.; ISSA, J. P. M.; SILVA, M. C. P.; WATANABE, I. S. 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, n. 11, 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, 2017.

FORESTO, C. S.; PAULA-GOMES, S.; SILVEIRA, W. A.; GRAÇA, F. A.; KETTELHUT, I. do C.; GONÇALVES, D. A. P.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological and molecular aspects of immobilization-induced muscle atrophy in rats at different stages of postnatal development: the role of autophagy. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 3, p. 646–660, 2016.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Behavior Genetics**, v. 45, n. 2, p. 183–195, 2015.

GARCIA, T. A.; TAMURA OZAKI, G. A.; CASTOLDI, R. C.; KOIKE, T. E.; TRINDADE CAMARGO, R. C.; SILVA CAMARGO FILHO, J. C. Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. **Tissue and Cell**, v. 54, n. September, p. 120–126, 2018.

GIBBONS, M. C.; SINGH, A.; ENGLER, A. J.; WARD, S. R. The role of mechanobiology in progression of rotator cuff muscle atrophy and degeneration. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 2, p. 546–556, 2018.

GOMES, N.; SOUZA, K.; RABELO, M.; FORTES, J.; BARBOSA, L.; CRAVEIRO, R.; FILHO, F.; JUNIOR, F.; CECCATTO, V. Aquatic Therapy in Bone Mineral Density in Rats After Paw Disuse By Immobilization. **International Journal of Therapies and Rehabilitation Research**, v. 5, n. 5, p. 161, 2016.

GUNDERSEN, K.; BRUUSGAARD, J. C. Nuclear domains during muscle atrophy: Nuclei lost or paradigm lost? **Journal of Physiology**, v. 586, n. 11, p. 2675–2681,

2008.

HAWLEY, J. A.; HARGREAVES, M.; JOYNER, M. J.; ZIERATH, J. R. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738–749, 2014.

JACOB, C. S.; ROCHA, L. C.; PIMENTEL NETO, J.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Effects of physical training on sarcomere lengths and muscle-tendon interface of the cervical region in an experimental model of menopause. **European Journal of Histochemistry**, v. 63, n. 3, p. 131–135, 2019.

JÄRVINEN, T. A. H.; JÄRVINEN, T. L. N.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle Injuries. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 5, p. 745–764, 2005.

JÄRVINEN, T. A. H.; JÓZSA, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T. L. N.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 23, n. 3, p. 245–254, 2002.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 10, n. 6, p. 312–320, 2000.

KANNUS, P.; JÄRVINEN, T.; SIEVANEN, H.; JÄRVINEN, M. Effects of immobilization, three forms of remobilization, and subsequent deconditioning on bone mineral content and density in rat femora. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 9, p. 1339–1346, 1996.

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 of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 84, n. 4, p. 1418–24, 1998.

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, n. 3, p. 387–394, 1992.

KINNEY, M. C.; DAYANIDHI, S.; 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 and Nerve**, v. 55, n. 3, p. 384–392, 2017.

KJAER, E. Textbook of Sports Medicine : Basic. p. 1461, 2003.

KNUDSEN, A. B.; LARSEN, M.; MACKEY, A. L.; HJORT, M.; HANSEN, K. K.; QVORTRUP, K.; KJÆR, M.; KROGSGAARD, M. R. The human myotendinous junction: An ultrastructural and 3D analysis study. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 25, n. 1, p. e116–e123, 2015.

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, n. 3, p. 233–239, 2008.

KOSTROMINOVA, T. Y.; REINER, D. S.; HAAS, R. H.; INGERMANSON, R.; MCDONOUGH, P. M. Automated methods for the analysis of skeletal muscle fiber size and metabolic type. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 306, p. 275–332, 2013.

KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; BOCALINI, D.; NUCCI, R. A. B.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Total training load may explain similar strength gains and muscle hypertrophy seen in aged rats submitted to resistance training and anabolic steroids. **Aging Male**, v. 21, n. 1, p. 65–76, 2018.

KUNZ, R. I.; CORADINI, J. G.; SILVA, L. I.; BERTOLINI, G. R. F.; BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. F. C. Effects of immobilization and remobilization on the ankle joint in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 10, p. 842–849, 2014a.

KUNZ, R. I.; CORADINI, J. G.; SILVA, L. I.; KAKIHATA, C. M. M.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BERTOLINI, G. R. F.; RIBEIRO, L. D. F. C. Morfologia dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos Wistar imobilizados e remobilizados em meio aquático. **ConScientiae Saúde**, v. 13, n. 4, p. 1–7, 2014b.

KUNZ, R. I.; CORADINI, J. G.; SOARES, C. L. R.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BERTOLINI, G. R. F.; RIBEIRO, L. de F. C. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 123–129, 2013.

KUNZ, R. I.; SILVA, L. I.; COSTA, J. R. G.; SOARES, C. L. R.; BERTOLINI, G. R. F.; BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. de F. C. Alterações histomorfométricas na articulação do joelho de ratos Wistar após remobilização em meio aquático. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 22, n. 3, p. 317–24, 2015.

LE MOAL, E.; PIALOUX, V.; JUBAN, G.; GROUSSARD, C.; ZOUHAL, H.; CHAZAUD, B.; MOUNIER, R. Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 27, n. 5, p. 276–310, 2017.

LEE, B. A.; OH, D. J. Effect of regular swimming exercise on the physical composition, strength, and blood lipid of middle-aged women. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 11, n. 5, p. 266–71, 2015.

LIEBER, R. L.; ROBERTS, T. J.; BLEMKER, S. S.; LEE, S. S. M.; HERZOG, W. Skeletal muscle mechanics, energetics and plasticity. **Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2017.

MACHIDA, S.; BOOTH, F. W. Regrowth of Skeletal Muscle Atrophied from Inactivity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 1, p. 52–59, 2004.

MACINTOSH, B. R. Recent developments in understanding the length dependence

of contractile response of skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 6, p. 1059–1071, 2017.

MARTONE, A. M.; MARZETTI, E.; CALVANI, R.; PICCA, A.; TOSATO, M.; SANTORO, L.; DI GIORGIO, A.; NESCI, A.; SISTO, A.; SANTOLIVUDO, A.; LANDI, F. Exercise and Protein Intake: A Synergistic Approach against Sarcopenia. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

MOO, E. K.; FORTUNA, R.; SIBOLE, S. C.; ABUSARA, Z.; HERZOG, W. In vivo sarcomere lengths and sarcomere elongations are not uniform across an intact muscle. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1–9, 2016.

MOO, E. K.; HERZOG, W. Single sarcomere contraction dynamics in a whole muscle. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

NASCIMENTO, C. C. F.; PADULA, N.; MILANI, J. G. P. O.; SHIMANO, A. C.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle to swimming, immobilization and rehabilitation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 818–824, 2008.

NATALI, L. H.; SILVA, T. S.; CIENA, A. P.; PADOIN, M. J.; ALVES, É. P. B.; ARAGÃO, F. A.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos da corrida em esteira em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 6, p. 490–493, 2008.

OH, Y. S.; KIM, H. J.; RYU, S. J.; CHO, K. A.; PARK, Y. S.; PARK, H.; KIM, M.; KIM, C. K.; PARK, S. C. Exercise type and muscle fiber specific induction of caveolin-1 expression for insulin sensitivity of skeletal muscle. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 39, n. 3, p. 395–401, 2007.

OJIMA, K. Myosin: Formation and maintenance of thick filaments. **Animal Science Journal**, p. 1–7, 2019.

OLSEN, L. A.; NICOLL, J. X.; ANDREW, FRY, C. The skeletal muscle fiber: a mechanically sensitive cell. **European Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 2, p. 333–349, 2019.

PALMA, L. D.; 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, n. 1, p. 105–109, 2011.

PAUL, A. C.; ROSENTHAL, N. Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. **The Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 4, p. 751–760, 2002.

PERILLO, M.; FOLKER, E. S. Specialized Positioning of Myonuclei Near Cell-Cell Junctions. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. November, p. 1–10, 2018.

PESTANA, P. R. D.; ALVES, A. N.; FERNANDES, K. P. S.; JUNIOR, J. A. S.; FRANÇA, 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 musculoesquelético de rato. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 6, p. 419–422, 2012.

PETRINI, A. C.; PEZOLATO, V. A.; RAMOS, D. M.; ALBERTO, C.; PERTILLE, A. Long-term aquatic training triggers positive electrical alterations and other parameters in adult female rats. n. 477686, 2015.

POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C.; FREITAS, F. C.; PADULA, N.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological effects of resumption of loading after immobilization of skeletal muscles in lengthened position in female rats Juliana. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 15, n. 1, p. 73–79, 2011.

QAISAR, R.; BHASKARAN, S.; VAN REMMEN, H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 56–67, 2016.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775–777, 2005.

RAQUEL, H. A.; MASSON, G. S.; BARNA, B. F.; ZANLUQUI, N. G.; PINGE-FILHO, P.; MICHELINI, L. C.; MARTINS-PINGE, M. C. Swimming training modulates nitric oxide-glutamate interaction in the rostral ventrolateral medulla in normotensive conscious rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 221, p. 1–10, 2016.

RASSIER, D. E. Sarcomere mechanics in striated muscles: from molecules to sarcomeres to cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 313, n. 2, p. C134–C145, 2017.

RILEY, D. A.; BAIN, J. L. W.; ROMATOWSKI, J. G.; FITTS, R. H. Skeletal muscle fiber atrophy: altered thin filament density changes slow fiber force and shortening velocity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 2, p. C360–C365, 2004.

SAID, R. S.; MUSTAFA, A. G.; ASFOUR, H. A.; SHAQOUR, E. I. Myogenic Satellite Cells: Biological Milieu and Possible Clinical Applications. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2017.

SAMUKAWA, M.; HATTORI, M.; SUGAMA, N.; TAKEDA, N. The effects of dynamic stretching on plantar flexor muscle-tendon tissue properties. **Manual Therapy**, v. 16, n. 6, p. 618–622, 2011.

SIERRA, L. R.; FÁVARO, G.; CERRI, B. R.; ROCHA, L. C.; ALMEIDA, S. R. Y.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Myotendinous junction plasticity in aged ovariectomized rats submitted to aquatic training. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 8, p. 816–822, 2018.

SILVA, L. I.; MEIRELES, A.; NASCIMENTO, C. M.; ROCHA, B. P.; ROSA, C. T.; RIBEIRO, L. D. F. C.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BERTOLINI, G. R. F. Avaliação de parâmetros histomorfométricos em sóleos de ratos submetidos à remobilização por salto em meio aquático. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 3, p.

219–222, 2013.

SLIMANI, L.; VAZEILLE, E.; DEVAL, C.; MEUNIER, B.; POLGE, C.; DARDEVET, D.; BÉCHET, D.; TAILLANDIER, D.; MICOL, D.; LISTRAT, A.; ATTAIX, D.; COMBARET, L. The delayed recovery of the remobilized rat tibialis anterior muscle reflects a defect in proliferative and terminal differentiation that impairs early regenerative processes. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, n. March, p. 73–83, 2015.

SPIERTS, I. L. Y.; AKSTER, H. A.; VOS, I. H. C.; OSSE, J. W. M. Local differences in myotendinous junctions in axial muscle fibres of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Experimental Biology**, v. 199, n. 4, p. 825–833, 1996.

SWEENEY, H. L.; HAMMERS, D. W. Muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2018.

TIAN, Z. L.; JIANG, S. K.; ZHANG, M.; WANG, M.; LI, J. Y.; ZHAO, R.; WANG, L. L.; LI, S. S.; LIU, M.; ZHANG, M. Z.; GUAN, D. W. Detection of satellite cells during skeletal muscle wound healing in rats: time-dependent expressions of Pax7 and MyoD in relation to wound age. **International Journal of Legal Medicine**, v. 130, n. 1, p. 163–172, 2016.

TIDBALL, J. G. Force transmission across muscle cell membranes. **Journal of Biomechanics**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 43–52, 1991.

TROTTER, J. A.; BACA, J. M. The muscle-tendon junctions of fast and slow fibres in the garter snake: ultrastructural and stereological analysis and comparison with other species. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 8, n. 6, p. 517–526, 1987.

VASILCEAC, F. A.; RENNER, A. F.; TEODORO, W. R.; MATTIELLO-ROSA, S. M. The remodeling of collagen fibers in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatology International**, v. 31, n. 6, p. 737–742, 2011.

VIEIRA, L.; LOVISON, K.; KUNZ, R. I.; ANTUNES, J. S.; BERTOLINI, G. R. F.; BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. de F. C.; VIEIRA, L.; LOVISON, K.; KUNZ, R. I.; ANTUNES, J. S.; BERTOLINI, G. R. F.; BRANCALHÃO, R. M. C.; RIBEIRO, L. de F. C. Resistance exercise recovers the structure of cartilage and synovial membrane of the ankle joint of rats after sciatic compression. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, n. 3, p. 2234, 2017.

VOLPI, F. S. A.; CASAROLLI, L. M.; PUDELL, C.; MENON, T.; CIENA, A. P.; ALVES, É. P. B.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos da remobilização em duas semanas com natação sobre o músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 3, p. 168–170, 2008.

WHITE, Z.; TERRILL, J.; WHITE, R. B.; MCMAHON, C.; SHEARD, P.; GROUNDS, M. D. Voluntary resistance wheel exercise from mid-life prevents sarcopenia and increases markers of mitochondrial function and autophagy in muscles of old male and female C57BL / 6J mice. **Skeletal Muscle**, p. 1–21, 2016.

YOSHIHARA, T.; MACHIDA, S.; KUROSAKA, Y.; KAKIGI, R.; SUGIURA, T.; NAITO, H. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. **Journal of Physiological Sciences**, v. 66, n. 4, p. 337–343, 2016.

ZAMMIT, P. S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 72, p. 19–32, 2017.

ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle fiber type: Influence on contractile and metabolic properties. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004.