
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO
MOVIMENTO – INTERUNIDADES**

BRUNA ALÉXIA CRISTOFOLETTI GRILLO

**REPERCUSSÕES ESTRUTURAIS DO EXERCÍCIO AGUDO
NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA APÓS ATROFIA MUSCULAR
EM RATOS *WISTAR***

Rio Claro - SP

2024

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DOMOVIMENTO – INTERUNIDADES**

BRUNA ALÉXIA CRISTOFOLETTI GRILLO

**REPERCUSSÕES ESTRUTURAIS DO EXERCÍCIO
AGUDO NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA APÓS ATROFIA
MUSCULAR EM RATOS *WISTAR***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências no Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do Movimento.

Orientador: Adriano Polican Ciena

Rio Claro
2024

G859r Grillo, Bruna Aléxia Cristofolletti
Repercussões estruturais do exercício agudo na junção
miotendínea após atrofia muscular em ratos Wistar / Bruna
Aléxia Cristofolletti Grillo. -- Rio Claro, 2024
68 p. : il., tabs., fotos

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

1. Músculo esquelético. 2. Telócitos. 3. Células satélites. 4.
Imobilização articular. 5. Treinamento em escada vertical. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: REPERCUSSÕES ESTRUTURAIS DO TREINAMENTO AGUDO NA
JUNÇÃO MIOTENDÍNEA APÓS ATROFIA MUSCULAR EM RATOS WISTAR

AUTORA: BRUNA ALÉXIA CRISTOFOLETTI GRILLO

ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências do Movimento,
área: Biodinâmica do Movimento pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente

PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM

Data: 26/06/2024 15:45:46-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM (Participação Virtual)

Departamento de Fisioterapia / UNESP - Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. DIOGO CORRÊA MALDONADO (Participação Virtual)

Departamento de Morfologia / Universidade Federal de São Paulo / SP



Documento assinado digitalmente

DIOGO CORREA MALDONADO

Data: 26/06/2024 19:13:54-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. AMILTON CESAR DOS SANTOS (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Morfológicas / Centro Universitário Função de Ensino Octávio Bastos



Documento assinado digitalmente

AMILTON CESAR DOS SANTOS

Data: 26/06/2024 19:25:59-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rio Claro, 26 de junho de 2024

Título alterado para:

Repercussões estruturais do exercício agudo na junção miotendínea após atrofia muscular
em ratos Wistar

DEDICATÓRIA

A todos que passaram por transtornos emocionais durante em algum momento da pós-graduação, e aqueles que me ajudaram a superar esses momentos
(Arthur, Letícia e Andressa)

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos lembrando das pessoas que fazem parte da minha vida pessoal, pois tão importantes quanto nossas vitórias profissionais, são as pessoas que estão no camarim do espetáculo da sua vida.

Dedico toda a minha gratidão a minha noiva Maria Andressa Marinho da Silva Martins, meu padrinho Arthur Feliciano Casagrande e minha amiga Letícia Mayara Violin Fernandes que me proporcionaram todo apoio emocional, iluminaram minhas ideias nos dias escuros, abraçaram minhas lágrimas e bravejaram minhas preocupações como se fossem suas. Toda a minha gratidão por construírem meu alicerce e não me deixar desistir do meu sonho.

Agradeço a minha família imensamente, pois como dizem “A melhor inspiração que você vai ter é a sua família”. Por isso agradeço a minha Mãe, Mariana Dorotéia Muller Cristofolletti, e minha Avó, Maria Aparecida Muller, que sempre tinham os melhores conselhos, além da sua forma singular de amar com marmitinhas que traziam no paladar a sensação de lar.

Uma das maiores virtudes que podemos ter é um irmão, aquela pessoa que será seu parceiro para tudo, e apesar de ser mais novo, o Rômulo Allan Cristofolletti Grillo é motivo de maior orgulho. Minha metade oposta, que também se formou em Educação Física, brilhou em uma área totalmente diferente, mas que sempre enriquece nossas discussões com apontamentos interessantes sobre esse trabalho.

Dedico um espaço para agradecer aos Pais da minha vida, pois como muitas pessoas, tive um Pai biológico ausente, mas nunca fiquei sem ter uma figura paterna, por isso agradeço ao meu verdadeiro Pai escolhido pelo coração, Elias Américo Pereira; e ao meu outro Pai, Arthur Feliciano Casagrande, que no início me adotou como Padrinho e logo em seguida me apresentou como sua Filha e me deu Avós: Albertina Feliciano Casagrande e Marcello Casagrande.

No âmbito profissional, tenho muito a agradecer ao Prof. Dr. Adriano Polican Ciena, que em uma oportunidade atípica me convidou para contribuir com a ciência através da minha 1ª iniciação científica, e desde 2017 vem acreditando no meu trabalho e incentivando minha paixão pela anatomia humana e patologias. Agradeço pelo tempo e esforço dedicado a me orientar durante esse período, pela paciência e oportunidade de crescer através das experiências que enfrentamos juntos, pois através de suas orientações descobri a minha carreira, e sempre levarei seus ensinamentos para os

novos caminhos profissionais que estão por vir.

Agradeço aos que contribuíram na execução desse trabalho: José Roberto Rodrigues da Silva por todo auxílio com a coleta do material biológico e processamento por meio das técnicas histológicas, sempre com toda a paciência mesmo diante de um protocolo exaustivo; Me. Jurandyr Pimentel Neto, solucionando meus questionamentos, participando de extensas discussões sobre os dados e próximos passos; e em especial agradeço ao Me. André Neri Tomiate, que inúmeras vezes sentou ao meu lado para encontrar a peça do quebra-cabeça que estava faltando e, ao mesmo tempo, bem diante dos meus olhos.

Antes de finalizar, deixo minha mais profunda gratidão e homenagem à Prof.^a Dr.^a Lilian Teresa Bucken Gobbi (*in memoriam*), a qual tive a honra de conhecer, inicialmente como docente da disciplina e posteriormente como uma pessoa incrível que sempre me oferecia conselhos mesmo sem precisar. Nunca esquecerei o último conselho que tive: “A pós-graduação é um caminho difícil, por isso sempre levante a cabeça e comemore cada pequena etapa concluída ou vitória alcançada”.

Finalizo agradecendo aos animais que deram sua vida em prol dos avanços da ciência, e a Pró-reitoria de Pós-graduação em parceria com a Pró-reitoria de Graduação da Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ que me contemplaram com o auxílio financeiro (Edital 23/2022).

*“É necessário se espantar, se indignar
e se contagiar, só assim é possível
mudar a realidade”*

Nise da Silveira

RESUMO

A atrofia muscular é uma condição que provoca a fragilidade do tecido musculoesquelético e sua etiologia de distúrbios hereditários ou fisiopatológicos agrava sua incidência e desenvolvimento. Especificamente nos tecidos que compõem o aparelho locomotor, como o músculo estriado esquelético e a junção miotendínea (JMT), a atrofia causa diversas alterações que implicam no comprometimento estrutural e funcional desses tecidos. O treinamento, por sua vez, promove um ambiente regenerativo capaz reverter os efeitos deletérios da atrofia, no entanto, o desfecho crônico foi o primeiro passo para compreender a plasticidade musculoesquelética e miotendínea, o próximo passo é elucidar a cronologia das adaptações agudas nas estruturas e suas correlações. Dessa forma, o objetivo do estudo foi descrever as alterações morfológicas e no período agudo de remodelamento na junção miotendínea do músculo gastrocnêmio, após a atrofia muscular causada pela imobilização articular e intervenção com o treinamento em escada vertical em ratos *Wistar*. Foram utilizados 65 ratos *Wistar* divididos em: Controle (C), não submetidos a protocolo; Treinado (T), submetidos ao treinamento resistido; Imobilizado (I), submetidos a atrofia muscular; Imobilizado Treinado (IT), submetidos a atrofia muscular e treinamento resistido. Para compreender as adaptações agudas, as amostras musculares foram coletadas em 4 Períodos: 0 horas (0h), fim da atrofia seguido pela 1ª sessão de treinamento; 24 horas (24h), 24h após o fim da atrofia e 1ª sessão de treinamento; 4 dias (4d), 4 dias após a atrofia e realização de 3 sessões de treinamento em dias alternados; e 7 dias (7d) após a atrofia e realização de 4 sessões de treinamento. A análise do ventre muscular foi realizada através da Microscopia de Luz (Hematoxilina e Eosina e Picro-Sírus Red), para a morfometria da dimensão fractal (DF) dos núcleos e quantificação tecido conjuntivo, e mediante a ATPase Miofibrilar foi mensurada a área de secção transversa (AST) das fibras tipo I e II. A JMT foi analisada por meio da Microscopia de Luz (Hematoxilina e Eosina) para evidenciação da disposição dos núcleos, além da Imunofluorescência para evidenciação dos telócitos (CD34) e células satélites (Pax7). No ventre muscular, a imobilização resultou em redução da DF (I_{0h}), aumento na área de tecido conjuntivo (I_{0h}) e reduções na AST da fibra muscular (I_{0h}, I_{24h}). Enquanto o treinamento após atrofia, promoveu aumento na DF (T_{I0h}), variações na quantificação do tecido conjuntivo (T_{I0h}, T_{I4d}, T_{I7d}) e aumento na AST das fibras (T_{I0h}, T_{I4d}, T_{I7d}). Na JMT, observamos que o treinamento repercutiu no acúmulo de núcleos, no entanto, a imobilização isolada ou associada ao treinamento, resultou em alterações menos expressivas nos núcleos; enquanto os telócitos foram encontrados em todos os grupos experimentais, com alinhamento ao longo da interface após 24 horas de treinamento e livre movimentação, além da íntima relação de proximidade com as células satélites. Concluímos que as estruturas do músculo estriado esquelético (núcleos, tecido conjuntivo e fibras musculares) demonstram a especificidade adaptativa em promover o suporte funcional e estrutural que precede a regeneração muscular. Com destaque, reforçamos a especificidade transcricional dos núcleos na JMT, e a contribuição dos telócitos no início dos processos regenerativos, devido à identificação de telócitos e sua proximidade às células satélites no período agudo de remodelação na JMT.

Palavras-chave: músculo estriado esquelético, telócitos, células satélites, imobilização articular, treinamento em escada vertical.

ABSTRACT

Muscle atrophy is a condition that causes fragility of musculoskeletal tissue and its etiology of hereditary or pathophysiological disorders aggravates its incidence and development. Specifically in the tissues that make up the locomotor system, such as skeletal striated muscle and the myotendinous junction (MTJ), atrophy causes several changes that imply structural and functional impairment of these tissues. Training, in turn, promotes a regenerative environment capable of reversing the deleterious effects of atrophy. However, the chronic outcome was the first step in understanding musculoskeletal and myotendinous plasticity; the next step is to elucidate the chronology of acute adaptations in the structures and their correlations. Thus, the study's objective was to describe the morphological changes and the acute period of remodeling in the myotendinous junction of the gastrocnemius muscle, after muscle atrophy caused by joint immobilization and intervention with vertical ladder training in *Wistar* rats. Sixty-five *Wistar* rats were divided into: Control (C), not subject to protocol; Trained (T), subjected to resistance training; Immobilized (I), subjected to muscle atrophy; Immobilized Trained (IT), subjected to muscle atrophy and resistance training. To understand the acute adaptations, muscle samples were recorded in 4 Periods: 0 hours ($0h$), end of atrophy followed by the 1st training session; 24 hours ($24h$), 24h after the end of atrophy and 1st training session; 4 days ($4d$), 4 days after atrophy and 3 training sessions on alternate days; and 7 days ($7d$) after atrophy and 4 training sessions. The analysis of the muscle belly was performed through Light Microscopy (Hematoxylin and Eosin and Picrosirius Red) for the morphometry of the fractal dimension (FD) of the nuclei and quantification of the connective tissue, and through the Myofibrillar ATPase the cross-sectional area (CSA) of the type I and II fibers was measured. The JMT was analyzed through Light Microscopy (Hematoxylin and Eosin) for evidence of the arrangement of the nuclei, in addition to Immunofluorescence for evidence of telocytes (CD34) and satellite cells (Pax7). In the muscle belly, immobilization acted in reducing FD (I_{0h}), increasing the area of the connective tissue (I_{0h}), and reducing the CSA of the muscle fiber (I_{0h} , I_{24h}). In comparison, training after atrophy promoted an increase in FD (TI_{0h}), variations in connective tissue quantification (TI_{0h} , TI_{4d} , TI_{7d}), and an increase in fiber CSA (TI_{0h} , TI_{4d} , TI_{7d}). In the MTJ, we observed that training had an impact on the set of nuclei; however, immobilization alone or associated with training, occurred in less expressive changes in the nuclei; while telocytes were found in all experimental groups, with alignment along the interface after 24 hours of training and free movement, in addition to the close relationship of proximity to the satellite cells. We conclude that the structures of skeletal striated muscle (nuclei, connective tissue, and muscle fibers) demonstrate an adaptive specificity in promoting the functional and structural support that precedes muscle regeneration. Most importantly, we reinforce the transcriptional specificity of the nuclei in the MTJ and the contribution of telocytes in the beginning of the regenerative processes, due to the identification of telocytes and their proximity to satellite cells in the acute period of remodeling in the MTJ.

Keywords: striated skeletal muscle, telocytes, satellite cells, joint immobilization, vertical ladder training.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da JMT e seus componentes	16
Figura 2. Telócitos presentes na JMT	17
Figura 3. Delineamento experimental	24
Figura 4. Representação do protocolo de imobilização articular	26
Figura 5. Representação do protocolo de treinamento em escada vertical	27
Figura 6. Preparação e fixação da amostra do músculo gastrocnêmio	28
Figura 7. Tratamento estatístico	30
Figura 8. Análise funcional do treinamento em escada vertical	32
Figura 9. Microscopia de Luz com a coloração de Hematoxilina e Eosina dos Grupos Experimentais	36
Figura 10. Complexidade de organização dos núcleos das fibras musculares	37
Figura 11. Microscopia de Luz com a coloração de Picro-Sírus Red dos Grupos Experimentais	40
Figura 12. Quantificação da área de tecido conjuntivo intramuscular	41
Figura 13. Micrografias da técnica de ATPase pH 9.4 dos Grupos Experimentais.....	43
Figura 14. Área de secção transversa (AST) dos diferentes fenótipos das fibras musculares	45
Figura 15. Microscopia de Luz com coloração de Hematoxilina e Eosina da JMT dos Grupos Experimentais.....	47
Figura 16. Imunofluorescência da JMT do Grupo Controle	48
Figura 17. Imunofluorescência da JMT do Grupo Treinado	49

Figura 18. Imunofluorescência da JMT do Grupo Imobilizado..... 50

Figura 19. Imunofluorescência da JMT do Grupo Imobilizado Treinado..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa corporal dos Grupos Experimentais33

Tabela 2. Massa muscular do músculo gastrocnêmio dos Grupos Experimentais34

LISTA DE ABREVIACÕES

AST	rea de Sec Transversa
C	Controle
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole dihidrochoryde
DF	Dimensão Fractal
HE	Hematoxilina-Eosina
I	Imobilizado
I _{0h}	Imobilizado 0 horas
IL _{24h}	Imobilizado Livre 24 horas
IL _{4d}	Imobilizado Livre 4 dias
IL _{7d}	Imobilizado Livre 7 dias
IT	Imobilizado Treinado
IT _{0h}	Imobilizado Treinado 0 horas
IT _{24h}	Imobilizado Treinado 24 horas
IT _{4d}	Imobilizado Treinado 4 dias
IT _{7d}	Imobilizado Treinado 7 dias
JMT	Juno Miotendínea
MC	Massa Corporal
MM	Massa muscular
P _{0h}	Período 0 horas
P _{24h}	Período 24 horas
P _{4d}	Período 4 dias
P _{7d}	Período 7 dias
P	Período
PBS	Phosphate Buffered Saline
PS	Picro-Srus
T	Treinado
T _{0h}	Treinado 0 horas
T _{24h}	Treinado 24 horas
T _{4d}	Treinado 4 dias
T _{7d}	Treinado 7 dias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Músculo Estriado Esquelético.....	13
2.2. Junção Miotendínea (JMT)	14
2.3. Atrofia Muscular.....	18
2.4. Treinamento Resistido.....	20
3. OBJETIVO	22
3.1. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Animais.....	23
4.2. Protocolos experimentais	25
4.2.1. Atrofia muscular (Imobilização articular).....	25
4.2.2. Treinamento em escada vertical.....	26
4.3. Massa corporal (MC)	27
4.4. Processamento das amostras	27
4.4.1. Massa Muscular (MM)	28
4.4.2. Microscopia de Luz.....	28
4.4.2.1. Dimensão Fractal (DF)	29
4.4.3. ATPase Miofibrilar	29
4.4.4. Imunofluorescência	30
4.5. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Análise Funcional do Treinamento	32
5.2. Massa Corporal (MC)	33
5.3. Massa Muscular (MM)	33
5.4. Ventre Muscular.....	34
5.4.1. Núcleos - Hematoxilina e Eosina.....	34
5.4.1.1. DF Nuclear	38
5.4.2. Tecido Conjuntivo Intramuscular - Picro Sirius-Red	39
5.4.2.1. Área de tecido conjuntivo	42
5.4.3. Fibras Musculares - ATPase Miofibrilar	43
5.4.3.1. Área de secção transversa (AST).....	45
5.5. Junção Miotendínea	46

5.5.1. Microscopia de Luz - Hematoxilina e Eosina.....	46
5.5.2. Imunofluorescência	48
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

O aparelho locomotor é composto por diversas estruturas que se destacam por suas características morfofuncionais e adaptativas, como o músculo estriado esquelético e a junção miotendínea (JMT) (SILVA et al., 2013). O músculo estriado esquelético é um tecido composto por células cilíndricas, alongadas e multinucleadas denominadas fibras musculares, as quais além de atuar na função contrátil, também são responsáveis pela manutenção postural e homeostase energética (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020).

Além das fibras musculares, o músculo estriado esquelético é composto por outras estruturas que auxiliam na função preponderante deste tecido, além de garantir a integridade estrutural e a remodelação pós natal (YOSEPH; SOKER, 2015; MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020; VIGGARS et al., 2022). Especificamente, as células satélites são células indiferenciadas e mononucleadas localizadas na periferia das fibras musculares, que permanecem em estado quiescentes, e em situação de perturbação, são ativadas, proliferam, se diferenciam e fundem entre si, com o intuito de formar ou reparar a fibra muscular (BROOKS; MYBURGH, 2014; IDE, 2014).

Na extremidade distal do músculo estriado esquelético, a região de interface com o tecido tendíneo é denominada de JMT, a qual representa uma área crucial no estudo do sistema locomotor devido à sua complexidade estrutural e funcional (JACOBSON et al., 2020; PIMENTEL NETO et al., 2020). Essencialmente, sua função primária é transferir as forças contráteis dos músculos para os tendões, com isso, essa região é submetida a estresses mecânicos constantes e, por conseguinte, é descrita frequentemente como um local de predisposição às lesões do sistema locomotor (KARLSEN et al., 2022).

Para lidar com a sobrecarga constante da contração muscular, a JMT apresenta uma organização morfológica especializada, composta por ultraestruturas, e um sistema de ancoragem complexo formado por proteínas transmembranares e subsarcolemais (YUAN et al., 2021). Além disso, essa região exibe uma notável capacidade de adaptação estrutural e molecular em resposta a diferentes estímulos, incluindo os níveis de remodelação (CURZI et al., 2016).

A plasticidade característica da JMT após os estímulos de diferentes protocolos experimentais (distrofia muscular de duchenne, menopausa, envelhecimento, diferentes protocolos de treinamento, entre outros) tem sido investigada em profundidade, devido à capacidade de remodelar a disposição, tamanho e formato de suas projeções sarcoplasmáticas, bem como nos elementos celulares localizados em suas

proximidades, como: núcleos, células satélites e telócitos; com o intuito de manter sua função preponderante (SIERRA et al., 2018; JACOB et al., 2019; MARTINEZ et al., 2021; GRILLO et al., 2021).

Em condições de atrofia muscular induzida pela descarga mecânica, a JMT sofre por extensas adaptações em suas projeções sarcoplasmáticas, que implicam na redução da área de contato entre os tecidos e comprometem a integridade estrutural e funcional dessa região (CURZI et al., 2013). Assim como ocorre na JMT, a atrofia muscular no músculo estriado esquelético resulta na diminuição das miofibras devido à perda de proteínas, organelas e citoplasma (YIN et al., 2021).

Consequentemente, essas adaptações estruturais na JMT e no músculo estriado esquelético contribuem para o declínio do sistema locomotor, que repercute negativamente na qualidade de vida ao dificultar a realização de atividades cotidianas e prolongar a recuperação após comorbidades. Portanto, é essencial implementar intervenções, como o treinamento físico, para reduzir a vulnerabilidade musculotendínea à lesões (WILBURN et al., 2021).

O treinamento físico é utilizado como uma ferramenta eficaz na prevenção e tratamento da atrofia muscular, por meio de amplas alterações no sistema locomotor, especialmente na JMT, que promovem a homeostase celular e preservam a integridade estrutural e funcional (HENRIQUEZ-OLGUIN; MENESES-VALDES; JENSEN, 2020; PIMENTEL NETO et al., 2020). Na JMT o treinamento é capaz de reverter os efeitos deletérios da atrofia muscular, devido às adaptações nos comprimentos de suas projeções com o intuito de aumentar a área de contato entre os tecidos e, consequentemente, melhorar seu desempenho funcional (KNUDSEN et al., 2015; CURZI et al., 2016).

As respostas benéficas do treinamento observadas em um contexto crônico são um efeito cumulativo das adaptações agudas de cada sessão de exercício (FURLANETTO et al., 2016). A capacidade de promover um ambiente regenerativo logo após as primeiras horas (período agudo) de intervenção do treinamento, o torna uma ferramenta eficaz para reverter as remodelações deletérias, dessa forma, descrever as alterações morfológicas e no período agudo de remodelamento na junção miotendínea do músculo gastrocnêmio, após a atrofia muscular causada pela imobilização articular e intervenção com o treinamento, fornecerá novas evidências para elucidar os mecanismos envolvidos no notável remodelamento da JMT e as possíveis contribuições dos telócitos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Músculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é um tecido dinâmico que está em constante adaptação em resposta a estímulos internos (patologias) e externos (treinamento) (SILVA et al., 2013). Reconhecido primeiramente por sua função contrátil que promove o movimento, o músculo também atua na manutenção postural, homeostase energética e produção de calor (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020).

A arquitetura muscular é caracterizada por um arranjo complexo e singular de células cilíndricas, alongadas e multinucleadas, denominadas fibras musculares (TEIXEIRA; DUARTE, 2011). As fibras musculares possuem distintas propriedades contráteis e metabólicas, dessa forma, são diferenciadas em dois principais tipos: I e II. As fibras tipo I dispõem de maior aporte sanguíneo, com ampla densidade de mitocôndrias para a ativação das vias oxidativas, e dessa forma, são fibras que se contraem por períodos mais longos com menor produção de força. Enquanto as fibras tipo II, caracterizadas por sua alta capacidade glicolítica, apresentam maior produção de força por períodos menores, no entanto, as fibras tipo II são classificadas nos subtipos: IIa (atuam no metabolismo oxidativo e glicolítico) e IIx (dependem do metabolismo glicolítico) (QAISAR; BHASKARAN; VAN REMMEN, 2016).

A homeostase mecânica do músculo é mantida por duas estruturas não contráteis, o citoesqueleto e o tecido conjuntivo intramuscular. O citoesqueleto compreende um conjunto de proteínas localizadas longitudinalmente na rede subsarcolemal e nas extremidades das fibras musculares, fornecendo um ponto de conexão e ancoragem transversal (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020). O tecido conjuntivo intramuscular fornece suporte estrutural as fibras musculares através de uma rede complexa de três envoltórios (endomísio, epimísio e perimísio), compostos por colágenos, glicoproteínas não colágenas, proteoglicanos e elastina (CSAPO; GUMPENBERGER; WESSNER, 2020). Além disso, durante a contração muscular, o tecido conjuntivo intramuscular permite uma distribuição uniforme das forças geradas pelas fibras musculares (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020).

Na periferia das fibras musculares estão localizados os mionúcleos, essenciais para a homeostase, manutenção e respostas adaptativas do músculo estriado esquelético, visto que suas atividades transcricionais atuam na síntese proteica (VIGGARS et al.,

2022). O número de mionúcleos difere de acordo com a composição da fibra muscular, no qual as fibras tipo II possuem menor número de mionúcleos em comparação com as fibras tipo I (TEIXEIRA; DUARTE, 2011).

A notável capacidade que o músculo estriado esquelético possui de se remodelar, reparar e regenerar, advém primariamente das células satélites, caracterizadas como células indiferenciadas e mononucleadas que proporcionam o crescimento muscular pós-natal (YOSEPH; SOKER, 2015). Localizadas periféricamente às fibras musculares, as células satélites permanecem em estado de quiescência em um músculo íntegro, e assim que o músculo é exposto a danos, às células satélites são ativadas e proliferam para o local alvo, onde irão se diferenciarem e fundirem entre si, com o intuito de formar uma nova fibra ou reparar a fibra danificada (BROOKS; MYBURGH, 2014; IDE, 2014).

Devido ao fato dos mionúcleos serem estruturas pós-mitóticas, eles não podem se replicar, dessa forma, as células satélites são as estruturas responsáveis pela renovação nuclear normal, uma vez que dividem seu núcleo com a fibra, a fim de fornecer suporte às demandas transcricionais (BROOKS; MYBURGH, 2014).

Além disso, a regeneração envolve a coordenação de outros tipos de células, como os progenitores fibro-adipogênicos (FAPs), macrófagos e células endoteliais, que fornecem o suporte trófico para as células miogênicas, dessa forma contribuem diretamente para um processo de recuperação bem-sucedido (QUARTA et al., 2017; WOSCZYNA; RANDO, 2018). Especificamente, os FAPs se destacam por sintetizar a fibrose transitória do tecido conjuntivo que antecede a regeneração e mantém a integridade do músculo estriado esquelético (COLLINS; KARDON, 2021).

2.2. Junção Miotendínea (JMT)

No aparelho locomotor, há uma região que ocupa lugar de destaque no âmbito científico denominada de JMT, devido à sua complexidade estrutural, molecular e funcional (YAN et al., 2022).

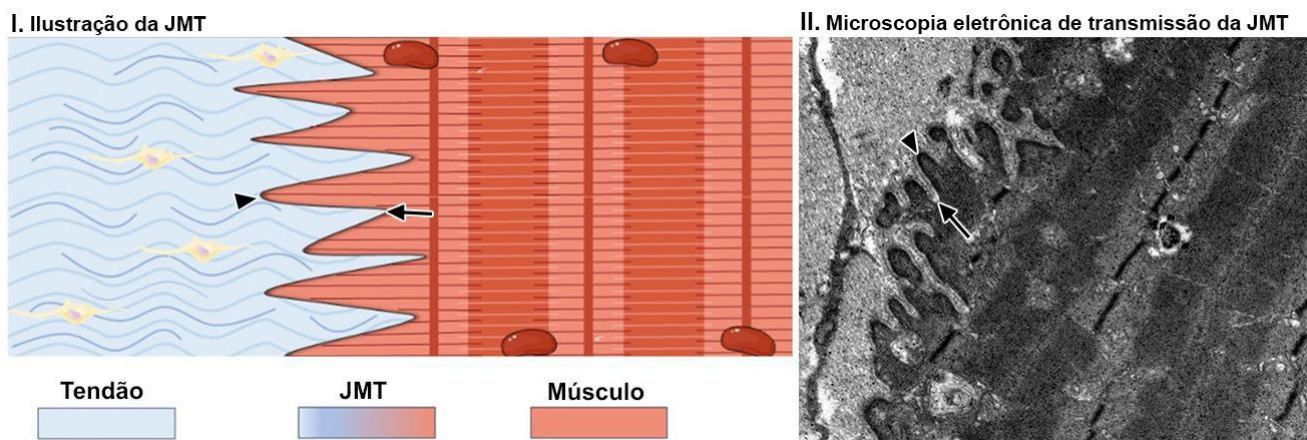
Inicialmente a JMT foi descrita como a região de interface entre o tecido muscular e tendíneo, a qual representa a zona de transição e consequentemente atua na transmissão de forças durante a contração muscular (TIDBALL, 1984). Entretanto, sua definição é amplamente discutida na literatura devido às lacunas que permeiam a complexidade de caracterizar a engenharia da JMT (TONG et al., 2024).

As caracterizações envolvem duas perspectivas sobre definição da JMT que se destacam pela sua aceitação acadêmica: a perspectiva estrutural, no qual é dita como uma zona de transição entre o músculo e o tendão, com seu funcionamento semelhante a uma “ponte”; e a perspectiva funcional, a qual é mais utilizada, que traz a compreensão de uma região especializada do aparelho locomotor, onde ocorre a comunicação músculo-tendínea e possui características ultraestruturais e funcionais distintas (GRILLO et al., 2021; YAMAMOTO et al., 2024).

Devido sua localização, a principal função da JMT é proporcionar a transmissão das forças contráteis geradas nas proteínas intracelulares para as proteínas extracelulares, essa força em seguida é transferida para o osso, e assim promove o movimento. Além disso, a JMT também atua na estabilização articular, resistência muscular e armazenamento de energia elástica (CIENA et al., 2012). Sua função primordial requer maior estabilidade estrutural para resistir a ciclos repetidos de forças gerados durante a contração muscular, dessa forma a JMT possui um arranjo morfológico especializado constituído por ultraestruturas, além de um sistema integrado de ancoragem formado por inúmeras proteínas (CHARVET; RUGGIERO; LE GUELLEC, 2012).

Ultraestruturalmente, a JMT é caracterizada por projeções das miofibrilas terminais e projeções de fibrilas de colágeno do tecido tendíneo, respectivamente as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, as quais se entrelaçam para proporcionar a área de contato miotendínea semelhante a interdigitações (Fig.1) (KNUDSEN et al., 2015). Essa organização atua como um mecanismo de membrana que fornece resistência mecânica para redução de estresses, o qual permite a distribuição vantajosa das forças durante a contração muscular (JACOB et al., 2019).

Figura 1. Representação da JMT e seus componentes ultraestruturais



Fonte: Adaptação de Tong et al., (2024). (A) Ilustração da JMT em comparação com uma micrografia da JMT realizada por meio da (B) Microscopia Eletrônica de Transmissão, interface entre o músculo e o tendão constituída por invaginações sarcoplasmáticas (setas) e evaginações sarcoplasmáticas (cabeça de seta).

O sistema integrado de ancoragem da JMT é formado por inúmeras proteínas que possuem estreita relação com as proteínas do interior das miofibrilas e do meio extracelular (MEC), e são compreendidos em dois tipos: subsarcolemal e transmembrana (CHARVET; RUGGIERO; LE GUELLEC, 2012).

No sistema subsarcolemal são encontradas proteínas como a laminina, talina, α -actinina e distrofina, as quais atuam na estabilização da membrana sarcoplasmática (CHARVET; RUGGIERO; LE GUELLEC, 2012). Enquanto, no sistema de transmembrana se destacam as integrinas e as intermediadoras da ligação do citoesqueleto celular à matriz extracelular, indispensáveis na adesão dos tecidos (FERRAZ; FERNANDEZ, 2014; YUAN et al., 2021). Dessa forma, alterações no arranjo e na homeostase dos componentes desse sistema, podem comprometer a composição e a integridade funcional e estrutural da JMT.

Todos esses aspectos estruturais demonstram a complexidade dessa interface, no entanto, o princípio que estimula a ampla investigação científica da JMT é o remodelamento característico que essa região apresenta após a intervenção de diversos protocolos experimentais, na intenção de realizar com maior eficácia sua função preponderante (SIERRA et al., 2018; JACOB et al., 2019; GRILLO et al., 2021).

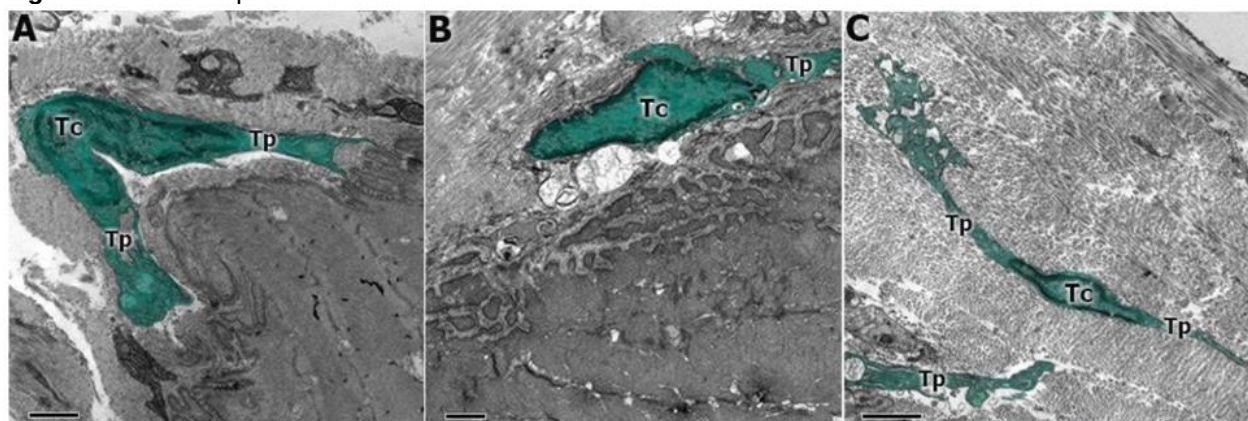
A plasticidade da JMT é relatada nas alterações da disposição, tamanho e formato de suas interdigitações, bem como nos elementos celulares localizados em suas proximidades, como: núcleos, células satélites e telócitos (PIMENTEL NETO et al., 2024; ROCHA et al., 2020a).

Na JMT, os núcleos são encontrados aglomerados, os quais desempenham papel essencial no monitoramento da excitação e alongamento, e podem ser associados com as respostas adaptativas, devido suas atividades transcricionais (ROMAN; GOMES, 2018; VIGGARS et al., 2022). Estímulos atróficos e hipertróficos, repercutem em alterações na quantidade e localização desses núcleos (MURACH et al., 2018; FARENIA et al., 2019).

As células satélites são conhecidas como precursoras miogênicas no músculo estriado esquelético, uma vez que promovem o crescimento e reparo muscular pós-natal (BROOKS; MYBURGH, 2014; IDE, 2014). Na JMT, é relatada a presença de células satélites adjacentes a interface, que indica seu auxílio na plasticidade miotendínea, no entanto, o aspecto temporal da sua quiescência, ativação e diferenciação ainda não foram elucidados (MARTINEZ et al., 2021).

Recentemente foram descobertos em íntima associação com JMT os telócitos, células intersticiais ultraestruturalmente identificados por um corpo celular ligeiramente pequeno que origina processos longos e finos, denominados de telópodes, os quais são responsáveis pela comunicação dos telócitos entre si e com outras células (Fig. 2) (MANETTI et al., 2019). O número de telópodes em cada telócito são variáveis, enquanto sua disposição irregular constroem uma rede complexa que além de fornecer suporte estrutural para o tecido e células próximas, também estabelecem junções de comunicação com outros telócitos e diferentes células (SANCHES et al., 2024).

Figura 2. Telócitos presentes na JMT.



Fonte: Adaptação de Pimentel Neto et al., (2020). Identificação dos telócitos (Tc) adjacentes à JMT e seus telópodos (Tp) através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A estrutura dos telócitos, anteriormente relatada no músculo estriado esquelético, descreve a íntima relação dos telópodes com capilares, terminações nervosas e células

satélites, que indicam sua possível contribuição na regulação e regeneração muscular (MARINI et al., 20218; POPESCU et al., 2011). Na JMT, os telócitos foram descritos próximos às estruturas adjacente a interface miotendínea, como capilares, células satélites e pericitos, além das ultraestruturas que constituem essa interface (invaginações sarcoplasmáticas e lâmina basal) através dos seus telópodes (PIMENTEL NETO et al., 2020, 2024).

2.3. Atrofia Muscular

A atrofia muscular é uma condição caracterizada pela perda de massa muscular causada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, dentre eles o envelhecimento, lesões, desuso e patologias (obesidade, diabetes, doença arterial periférica e distrofia muscular), que contribuem com a alta morbidade e mortalidade (KUNZ et al., 2013; FURLANETTO et al., 2016; MIKKELSEN et al., 2017; FAN; XIAO, 2020; WILBURN et al., 2021). Independente da origem da atrofia muscular, essa condição impacta gravemente na qualidade de vida, uma vez que reduz a mobilidade e força do indivíduo, e consequentemente, dificulta a realização de atividades diárias (WILBURN et al., 2021).

A perda de massa muscular que define a atrofia muscular, decorre de uma perda líquida de proteínas miofibrilares, organelas e citoplasma (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). A regulação da massa muscular ocorre por meio do equilíbrio entre a síntese de proteínas, necessárias para manter a arquitetura muscular, e a degradação de proteínas, indispensável para remover as proteínas danificadas que podem afetar as propriedades contráteis do músculo. Dessa forma, quando não há harmonia entre esses processos, ocasionado pela alta taxa de degradação proteica, surge a atrofia muscular (WILBURN et al., 2021; BODINE, 2022).

A hiperativação das vias de sinalização da degradação proteica na atrofia muscular incluem o sistema ubiquitina-proteassoma, sistema autofagia-lisossomo e sistema de caspase (YIN et al., 2021). A principal via responsável pela degradação proteica, a ubiquitina-proteassoma é formada pelas enzimas ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2), ligases de proteína ubiquitina (E3), ubiquitina (Ub) e proteassoma; destas a Atrogina-1 e MuRF1, ligases de ubiquitina E3 são consideradas referências para a identificação da atrofia muscular (FURLANETTO et al., 2016; JI; YEO, 2019; LIM et al., 2019).

Na morfologia do músculo estriado esquelético, a atrofia muscular provoca alterações que acarretam no comprometimento morfofuncional, como a redução do conteúdo proteico, assim há uma diminuição na área transversal da fibra, além do aumento no tecido conjuntivo intramuscular, diminuição da densidade capilar, ruptura da arquitetura tridimensional, redução da densidade mitocondrial, níveis elevados de cálcio intramuscular, apoptose nuclear e diminuição na quantidade de células satélites (BROOKS; MYBURGH, 2014; YOSHIHARA et al., 2018).

Os estímulos advindos da atrofia também possuem extensas repercussões na JMT, uma vez que as remodelações morfológicas dessa região estão relacionadas com o excesso ou ausência de estresse mecânico (CURZI et al., 2013; TONG et al., 2024; YAMAMOTO et al., 2024). A redução das projeções sarcoplasmáticas que implicam na área de interface e fixação tecido, bem como sarcômeros com maiores comprimentos e a presença de outras estruturas adjacentes, são algumas das alterações miotendíneas que prejudicam o desempenho de suas funções, e agravam sua vulnerabilidade aos estresses constantes que podem resultar em rupturas nas proteínas miofibrilares (CURZI et al., 2016; MARTINEZ et al., 2021; PIMENTEL NETO et al., 2024; TONG et al., 2024).

Apesar de diversos estímulos induzirem atrofia muscular, as respostas intracelulares são semelhantes, e com isso são utilizados vários modelos experimentais conceituados na literatura, os quais são pautados na inatividade muscular, como: imobilização articular, voo espacial e desnervação (PALMA et al., 2011). Dentre os modelos experimentais, destaca-se a imobilização articular, método que permite estudar o efeito atrófico local provocado pela descarga mecânica (SHARLO et al., 2021).

Embora a imobilização articular representa um dos modelos experimentais amplamente utilizado para elucidar os impactos da atrofia muscular, existem diversos métodos de imobilização articular: gesso nos dois membros pélvicos, tala de alumínio, dispositivo de imobilização de malha de aço e suspensão dos membros pélvicos pela cauda do animal. Todos esses modelos são eficazes na promoção da atrofia muscular, no entanto, a variabilidade desses métodos deixam a desejar na reprodutibilidade das condições de descarga mecânica por humanos (WANG et al., 2023).

Desenvolvido por Coutinho et al. (2002), o dispositivo de malha de aço permite a imobilização do membro pélvico unilateral, de modo que os membros torácicos e contralateral permanecem livres para deambular e manter um estado mais ativo, além de menos riscos de perda ou sofrimento pelos animais, mesmo utilizando o dispositivo.

Com isso, promove uma reprodução mais próxima das condições de descargas mecânicas vivenciadas por humanos.

O declínio no desempenho funcional do músculo estriado esquelético e da JMT, devido às extensas adaptações estruturais, tornam necessária a utilização de uma intervenção, como o exercício físico, com o intuito de reduzir a vulnerabilidade muscular a injúrias (CAÇÃO-BENEDINI et al., 2014). Na literatura, esse período pós-imobilização de retorno das cargas mecânicas é descrito pelo termo remobilização (WU et al., 2022).

2.4. Treinamento Resistido

A ativação da adaptação das estruturas que compõem o aparelho locomotor em direção a uma melhora morfofuncional, requer uma perturbação progressiva da sua homeostase, como a provocada pela intervenção do treinamento (FURRER et al., 2023). O treinamento físico é caracterizado pela sobrecarga mecânica, capaz de iniciar os processos regenerativos em prol de uma remodelação positiva do músculo estriado esquelético, sobretudo da JMT (HENRIQUEZ-OLGUIN; MENESES-VALDES; JENSEN, 2020; ROCHA et al., 2020b; BODINE, 2022).

O treinamento é amplamente utilizado na prevenção e tratamento de diversas morbidades, devido seu efeito sistêmico benéfico, e principalmente no sistema imune (DA MATA et al., 2024). Existem diversas modalidades de treinamento que proporcionam benefícios ao aparelho locomotor, no entanto, cada modalidade de treinamento promove adaptações específicas. O treinamento resistido ou de força, consiste na realização de poucas repetições contra uma resistência moderada ou alta, as quais resultam na hipertrofia muscular devido ao aumento da síntese proteica (MARZETTI et al., 2017; LOURENÇO et al., 2022).

O treinamento resistido possui algumas variáveis que podem ser manipuladas, e com isso, promover adaptações específicas, sendo elas: volume, intensidade, carga e intervalo de descanso (MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017). Com destaque a variável de carga, o treinamento resistido pode ser realizado com sobrecarga adicional ou sem sobrecarga (apenas com a carga da massa corporal), os quais implicam em respostas histoquímicas e morfológicas distintas, no entanto, as repercussões benéficas do treinamento permanecem (KRAUSE NETO et al., 2017; ROCHA et al., 2020b).

Especificamente no músculo estriado esquelético as principais adaptações promovidas pelo treinamento, incluem: a supressão da inflamação, crescimento radial

das fibras musculares, aumento dos núcleos e expansão mitocondrial e vascular, além da melhora da proliferação das células satélites (YIN et al., 2021; FURRER et al., 2023; HANSSON; EFTESTØL, 2023).

As respostas benéficas do treinamento já são visíveis nas primeiras horas após 1 sessão de treinamento, uma vez que reduções significativas das vias de atrofias ocorrem devido à redução dos níveis das ligases de ubiquitina 3 (MuRF-1, Atrogin-1 e Miostatina) (FURLANETTO et al., 2016). Dessa forma, as repercussões positivas do treinamento são um efeito cumulativo de das adaptações agudas de cada sessão de exercício.

Além disso, a capacidade de suprimir as cascatas de sinalização e proporcionar um ambiente regenerativo, também torna o treinamento uma ferramenta eficaz para elucidar os processos que envolvem a remodelação das estruturas que compõem o aparelho locomotor. Na JMT, o treinamento promove alterações em suas projeções sarcoplasmáticas, as quais aumentam a área de contato entre os tecidos e caminham em uma direção regenerativa, em prol da melhora do desempenho funcional da interface miotendínea (PIMENTEL NETO et al., 2020; GRILLO et al., 2021). Dessa forma, as adaptações agudas dessa região que ocorrem após o treinamento, podem fornecer subsídios para a compreensão da capacidade regenerativa singular da JMT.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as alterações morfológicas e no período agudo de remodelamento na junção miotendínea do músculo gastrocnêmio, após a atrofia muscular causada pela imobilização articular e intervenção com o treinamento em escada vertical em ratos *Wistar*.

3.1. Objetivos específicos

- Descrever as respostas adaptativas agudas na JMT provocadas pelo treinamento em escada vertical após a atrofia muscular, destacando as diferenças entre os períodos: 0 horas, 24 horas, 4 dias e 7 dias;
- Descrever a organização e a distribuição dos núcleos pela JMT;
- Quantificar as adaptações nas fibras musculares, núcleos e tecido conjuntivo após os protocolos experimentais, destacando as possíveis diferenças adaptativas entre a JMT e o ventre muscular;
- Diferenciar e mensurar a área de secção transversa das fibras musculares de acordo com seus Tipos (I e II);
- Analisar os efeitos do período agudo do treinamento em escada vertical nas células satélites em suas diferentes fases (quiescente e ativação) na JMT;
- Identificar a presença de telócitos na JMT e suas possíveis contribuições para o remodelamento inicial da JMT após a atrofia;
- Descrever as repercussões da imobilização no desempenho funcional do treinamento em escada vertical.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 65 ratos *Wistar* com 60 dias de idade submetidos divididos aleatoriamente em 4 grupos (Fig. 3):

- **Controle (C):** Os animais não foram submetidos a nenhum protocolo;
- **Treinado (T):** Os animais foram submetidos ao protocolo treinamento em escada vertical;
- **Imobilizado (I):** Os animais foram submetidos ao protocolo de atrofia muscular (imobilização articular);
- **Imobilizado Treinado (IT):** Os animais foram submetidos ao protocolo de atrofia muscular (imobilização articular) e treinamento em escada vertical.

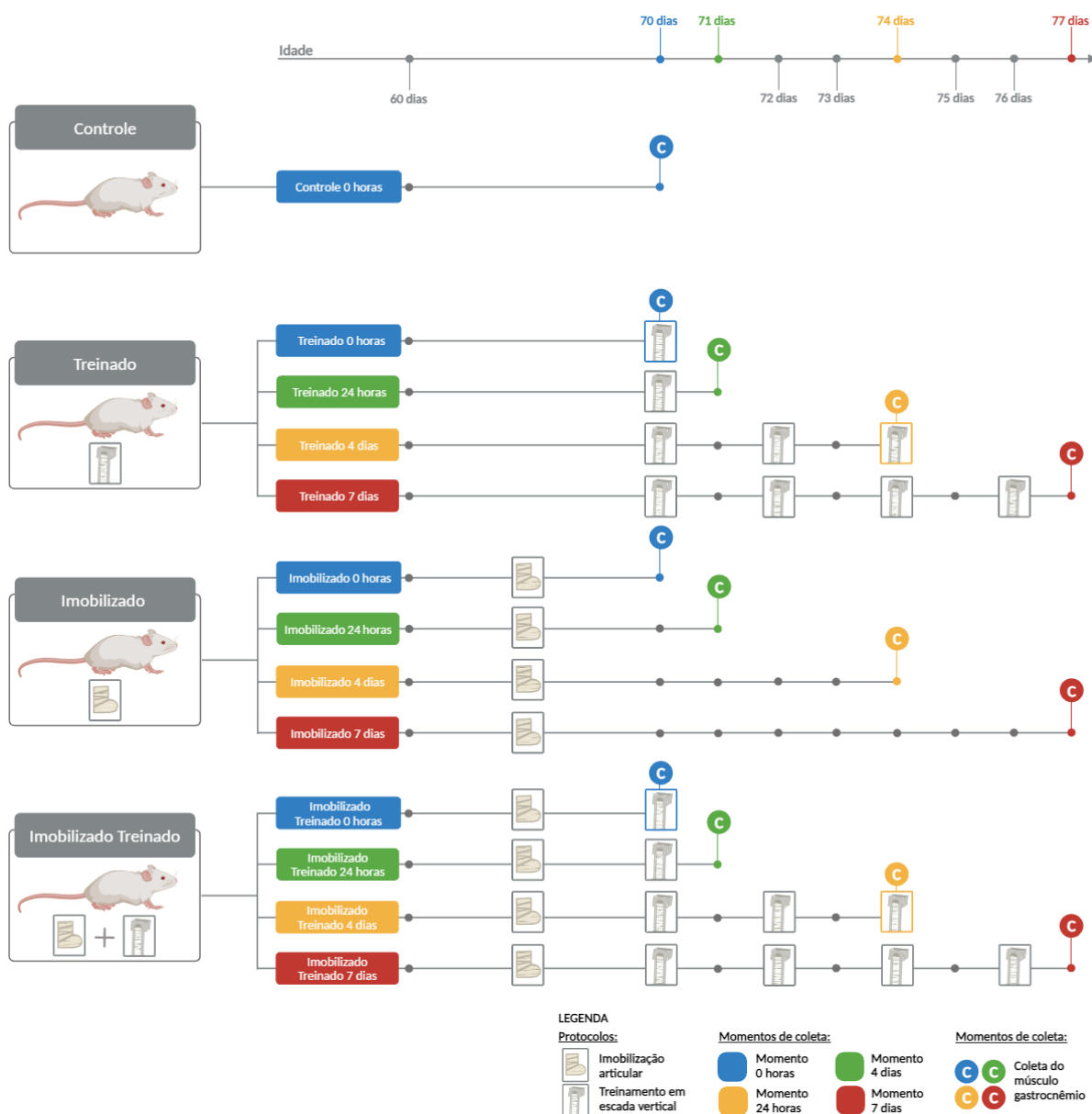
Para a análise temporal do remodelamento do músculo gastrocnêmio, sobretudo da JMT, foram realizados 4 períodos de coleta com 5 animais/grupo/período, desse modo, os animais tinham diferentes idades e níveis de intervenção dos protocolos. Os períodos de coleta realizados foram (Fig. 3):

- **Período 0 horas - P_{0h}:** aos 70 dias de idade foi finalizado o protocolo de atrofia muscular com a retirada dos dispositivos de imobilização do Grupo I e IT, e os animais dos Grupos T e IT foram submetidos à 1ª sessão do treinamento em escada vertical. De acordo com o Grupo, os animais eutanasiados nesse período formaram os subgrupos: C, T_{0h}, I_{0h} e IT_{0h};
- **Período 24 horas - P_{24h}:** aos 71 dias de idade, os animais de todos os Grupos não foram submetidos a nenhum protocolo, dessa forma, os animais dos Grupos I e IT estavam 24 horas com livre movimentação, enquanto os Grupos T e IT, completaram 24 horas da 1ª sessão de treinamento. No P_{24h}, os animais de cada Grupo formaram os subgrupos: T_{24h}, I_{L24h} e IT_{24h};
- **Período 4 dias - P_{4d}:** aos 74 dias de idade, os animais dos Grupos I e IT estavam há 4 dias com livre movimentação, e os Grupos T e IT foram submetidos as próximas sessões de treinamento em escada vertical (2ª e 3ª) com dias de descanso alternados. Ao final da 3ª sessão de treinamento (4º dia), foram coletadas as amostras coletadas dos

subgrupos: T_{4d}, IL_{4d} e IT_{4d};

- **Período 7 dias - P_{7d}**: aos 77 dias de idade, após 7 dias do fim do protocolo de atrofia muscular, os animais do Grupo I completaram 7 dias sem intervenção, apenas com movimentação livre, enquanto, os animais dos grupos T e IT, realizaram a 4ª sessão de treinamento em escada vertical (7º dia). Após a sessão de treinamento, foram coletadas as amostras de todos os animais que restaram, os quais compuseram os subgrupos: T_{7d}, IL_{7d} e IT_{7d}.

Figura 3. Delineamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora com o auxílio do Biorender. Organograma dos Grupos Experimentais com seus respectivos subgrupos, formados no período de cada coleta (*): 0 horas (azul), 24 horas (verde), 4 dias (amarelo) e 7 dias (vermelho). Controle (C), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado 24 horas (IL_{24h}), Imobilizado 4 dias (IL_{4d}), Imobilizado 7 dias (IL_{7d}), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado 4 dias (T_{4d}), Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}),

Imobilizado Treinado (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}).

Todos os animais são oriundos do Biotério Central da UNESP — Campus de Botucatu, e foram alojados em gaiolas com 5 ratos cada no Biotério do Laboratório de Anatomia Humana — Instituto de Biociências da UNESP — Campus de Rio Claro. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo claro/escuro e com ração e água “*ad libitum*”. Os procedimentos apresentados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais — CEUA do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista — Campus Rio Claro–SP (n.º1605/2022).

4.2. Protocolos experimentais

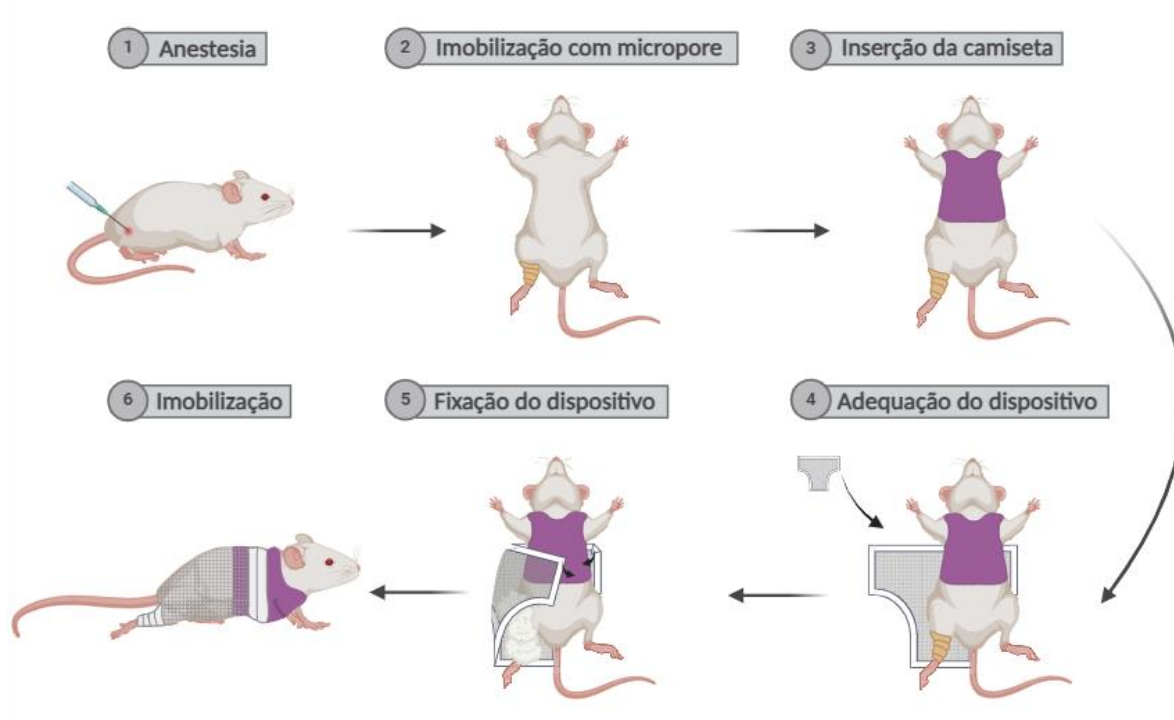
4.2.1. Atrofia muscular (Imobilização articular)

Com 60 dias de idade, os animais dos Grupos I e IT foram submetidos ao protocolo de imobilização durante 10 dias, no qual foi realizada a imobilização da articulação tíbio-társica em flexão plantar máxima do membro pélvico direito (Fig. 4).

O protocolo iniciou-se com a administração de anestésicos via intraperitoneal (Ketamina 95 mg/kg e Xilazina 12 mg/kg), para a inserção de uma camiseta de algodão em seu tronco, a qual permite livre movimentação dos membros torácicos e pélvico contralateral, além de um local para a fixação do dispositivo de imobilização. Em seguida, o membro pélvico direito foi imobilizado em flexão plantar com micropore e o dispositivo de imobilização, ao qual consiste em uma malha de aço inoxidável com um formato semelhante a um “T”. O dispositivo foi fixado com o auxílio de esparadrapo, e para preencher os espaços entre o dispositivo e o membro do animal foi adicionado algodão (COUTINHO et al., 2002). Durante todo o período de imobilização, foram mantidos 2 animais por gaiolas para promover melhor movimentação dos animais imobilizados e evitar qualquer desconforto.

Após 10 dias foram retirados os dispositivos de imobilização, no qual os animais do Grupo I permaneceram em suas respectivas gaiolas com livre movimentação dos membros torácicos e pélvicos, enquanto os animais do Grupo IT foram submetidos ao treinamento em escada vertical (ROCHA et al., 2020c).

Figura 4. Representação do protocolo de imobilização articular.



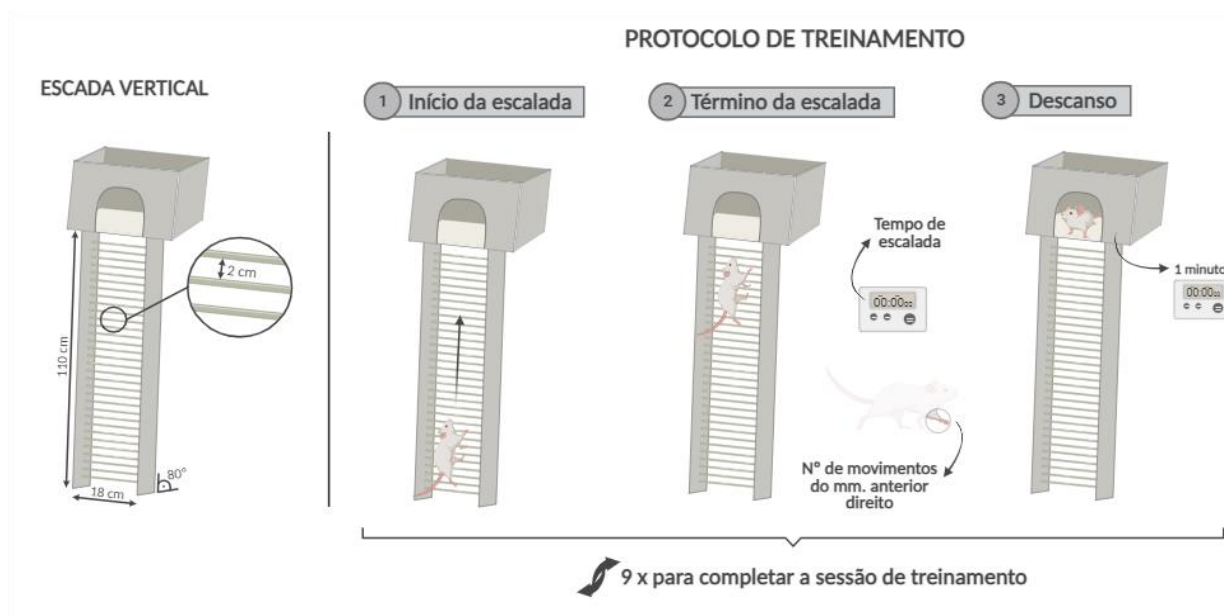
Fonte: Elaborado pela autora com o auxílio do Biorender. A imobilização articular foi realizada em 6 etapas: (1) Anestesia via intraperitoneal (Ketamina 95 mg/kg e Xilazina 12 mg/kg); (2) Imobilização da articulação tíbio-társica em flexão plantar máxima do membro pélvico direito com auxílio do micropore; (3) Inserção da camiseta, a qual será usada como fixação superior do dispositivo de imobilização; (4) Adequação do dispositivo de imobilização conforme o corpo do animal; (5) Fixação do dispositivo, etapa nas quais as extremidades laterais do dispositivo são envoltas no corpo do animal, fixadas com auxílio do esparadrapo e os espaços preenchidos com algodão; (6) Imobilização, nesta etapa é feita a inspeção da fixação do dispositivo, no qual é verificada a necessidade de reforço com esparadrapo e preenchimento com algodão.

4.2.2. Treinamento em escada vertical

Aos 70 dias de idade, os animais do Grupo T e IT foram submetidos ao protocolo de treinamento em escada vertical (110 x 18 cm, grade de 2 cm e inclinação de 80°), realizado em dias alternados durante 7 dias, totalizando até 4 sessões (Fig. 5). As sessões consistiram em 9 subidas sem sobrecarga adicional, apenas com a carga da massa corporal, e ao final de cada subida os animais tinham 60s de descanso (ROCHA et al., 2020b). Todas as sessões foram realizadas no mesmo horário do dia.

Para a análise de desempenho, foram coletados em cada sessão de treinamento o tempo de cada escalada e o número de movimentos de apreensão do membro torácico direito.

Figura 5. Representação do protocolo de treinamento em escada vertical.



Fonte: Elaborado pela autora com o auxílio do Biorender. A sessão do treinamento em escada vertical consistiu na realização de nove escaladas, no qual cada escalada por ser compreendida mediante 3 etapas: (1) Início da escalada, no qual o animal é colocado na extremidade inferior da escada vertical; (2) Término da escalada, etapa na qual o animal realizou a subida da escada vertical sendo registrado o tempo e o número de movimentos do membro torácico direito; (3) Descanso entre as repetições com duração de 1 minuto.

4.3. Massa corporal (MC)

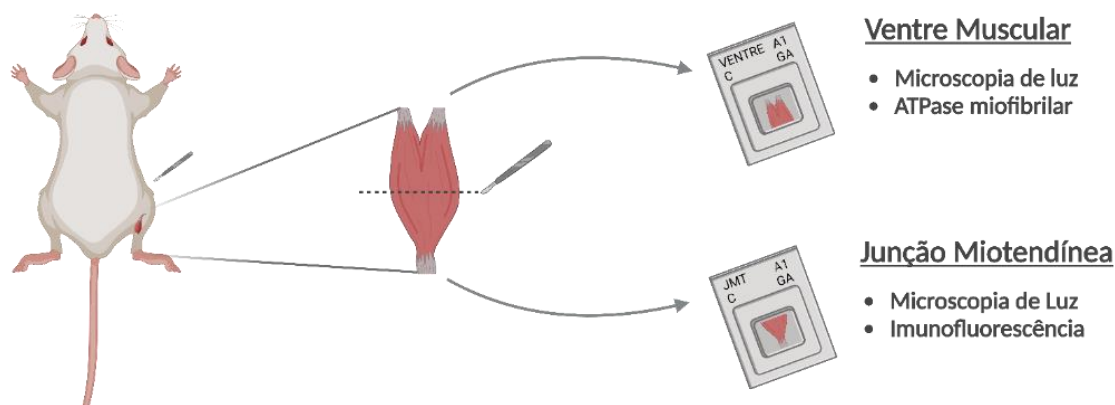
Por meio de uma balança semi analítica (Marte LC1®) foi mensurada a massa corporal dos animais em diferentes períodos: Pré-protocolo, demarcado pelo início do protocolo de atrofia muscular para os Grupos I e IT; e 4 Períodos de Coleta, delimitados pela coleta do material biológico.

4.4. Processamento das amostras

O material biológico dissecado para análise foi o músculo gastrocnêmio do membro pélvico direito. Para a dissecação, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico (Ketamina 200mg/Kg e Xilasina 50mg/Kg), no qual após a retirada do músculo gastrocnêmio, as amostras foram untados em talco neutro (Tragacanth®, SIGMA) para prevenir artefatos, estabilizados em criomoldes com auxílio da cola biológica (Tissue Tek®), criofixados em nitrogênio líquido -196° C e armazenadas no biofreezer à -80°C.

Para o processamento das técnicas de Microscopia de Luz, ATPase Miofibrilar e Imunofluorescência, foi realizada a secção transversal do músculo gastrocnêmio com o intuito de separar a extremidade proximal, para a análise do ventre muscular, e a extremidade distal, para a análise da JMT (Fig. 6).

Figura 6. Preparação e fixação da amostra do músculo gastrocnêmio



Fonte: Elaborado pela autora com o auxílio do Biorender. A amostra do músculo gastrocnêmio foi seccionada transversalmente em: porção proximal, utilizada para a análise do ventre muscular por meio da Microscopia de Luz e ATPase Miofibrilar; porção distal, processada a partir da Microscopia de Luz e Imunofluorescência para análise da JMT.

4.4.1. Massa Muscular (MM)

Após a dissecação foi mensurada a massa muscular do músculo gastrocnêmio com o auxílio da balança semi-analítica (Marte LC1[®]), antes da secção transversal para separar a porção proximal e distal.

4.4.2. Microscopia de Luz

As amostras do ventre (n=5) foram seccionadas transversalmente, e as amostras da JMT (n=5), longitudinalmente (10 μ m — Criostato HM 505 E, MICROM[®]). Os cortes transversais e longitudinais foram em lâminas histológicas, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para destaque dos componentes celulares, e Picro-Sírus Red (PS) para identificação do tecido conjuntivo intramuscular (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014; BHUTDA et al., 2017). As lâminas foram analisadas e fotografadas com o auxílio do Microscópio de Luz Leica DM750[®], no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) - UNESP campus de Rio Claro/SP.

4.4.2.1. Dimensão Fractal (DF)

Por meio das micrografias de luz, foi realizada a análise da Dimensão Fractal (DF) dos núcleos e tecido conjuntivo intramuscular com o auxílio do Software ImageJ®. A DF é um método matemático comum em análises histológicas, que mensura a complexidade estrutural de figuras geométricas irregulares por meio da similaridade (KARPERIEN et al., 2008). Esse método é realizado através da binarização da imagem, a qual todos os pontos corados nas colorações de HE e PS são identificados nas imagens, e por meio da linha de regressão, gerada a partir do número e tamanhos de quadrados necessários para cobrir a imagem, resulta em um valor de DF (GARCIA et al., 2018). O valor da DF é expresso em uma escala de 0 a 2, no qual 0 indica um estágio inferior de complexidade de organização e 2 representa um estágio superior (CURY et al., 2018). Além da DF, com a binarização das micrografias de PS, foi possível quantificar a área de tecido conjuntivo associado por meio do Software ImageJ®.

Foram selecionadas 10 imagens por amostra com ampliação de 20000X de cada coloração, totalizando 30 imagens/grupo/período, as quais foram analisadas a DF do núcleo, e quantificação da área de tecido conjuntivo intramuscular.

4.4.3. ATPase Miofibrilar

As amostras do ventre (n=5) foram seccionadas transversalmente (10 µm de espessura — Criostato HM 505E, MICROM®), incubadas durante 30 min em solução de 10 mg de ATP dissolvidos em água destilada com 10ml de glicina/tampão NaCl, CaCl₂ atingindo o pH 9.4 adicionado com Dithiothreitol. Em seguida, as secções foram lavadas em água destilada e incubadas por 7 min em 2% de cloreto de cobalto, desidratado em uma série crescente de álcoois e finalizado em xilol (ROCHA et al., 2020a KRAUSE NETO et al., 2018; MANETTI et al., 2019). As imagens foram obtidas através do Microscópio de Luz Leica DM750®, no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) - UNESP campus de Rio Claro/SP. A partir das micrografias das colorações de ATPase, foi possível diferenciar os tipos das fibras musculares em I e II.

Para a análise da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras, foram mensuradas aleatoriamente 100 fibras/grupo/período de cada tipo de fibra (I e II), com o auxílio do Software ImageJ®.

4.4.4. Imunofluorescência

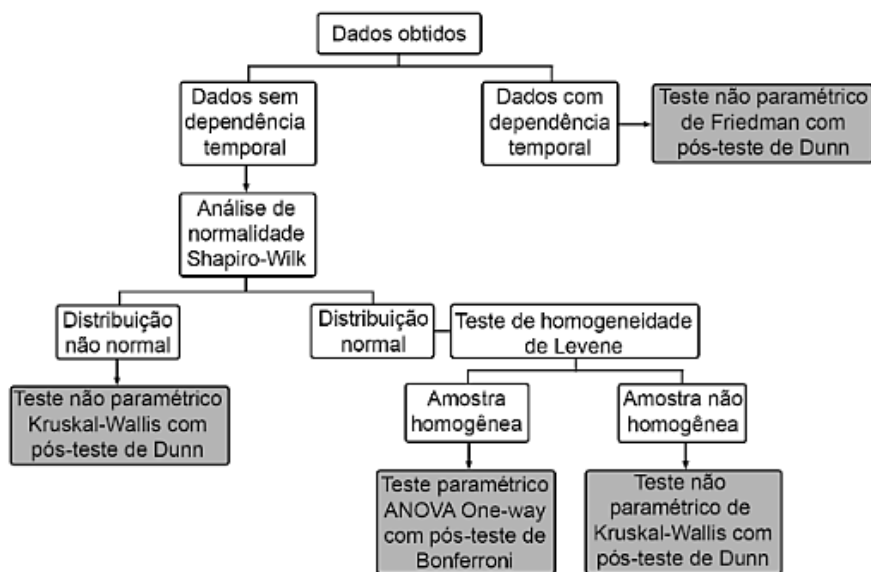
As amostras da JMT do músculo gastrocnêmio (n=5) foram seccionadas longitudinalmente (20 µm — Criostato HM 505 E, MICROM® - Laboratório de Morfologia UNESP Rio Claro/SP) e alocadas em lâminas histológicas sinalizadas, lavadas 2x em solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 1% bovine serum albumin (BSA) para bloqueio de marcação inespecífica e permeabilizadas com Triton X-100 - 0,1%. Em seguida, foi realizada a incubação da solução primária a 4°C, contendo o anticorpo primário conjugado CD34 (sc-52478, Santa Cruz Biotechnology) para identificação dos telócitos, e o anticorpo primário Pax7 (PA5-68506, Invitogen) para identificação das células satélites, ambos diluídos 1:500 em PBS. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 2x em solução de PBS com 1% de BSA, e incubadas por 1h em solução do anticorpo secundário anti-rabbit Alexa Fluor 597 (A-11012, Invitrogen) diluído em PBS (1:500). Por fim, foram finalizadas com ProLong Gold® (Molecular Probes®) contendo 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) para marcação nuclear, e armazenadas em -20°C (MANETTI et al., 2019; PIMENTEL NETO et al., 2020).

As imagens foram examinadas com o auxílio do Microscópio de Fluorescência Olympus BX61 (Shinjuku, Japão), com um sistema óptico de fluorescência UIS2, no Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) – UNESP – Campus Rio Claro, SP, Brasil.

4.5. Análise estatística

O tratamento estatístico iniciou a partir do Teste de Shapiro-Wilk para a identificação da presença ou ausência de normalidade dos dados para a escolha do teste estatístico adequado (Fig. 7). Após não identificada a normalidade dos dados de massa corporal, dimensão fractal dos núcleos, área de tecido conjuntivo intramuscular e AST das fibras musculares tipo I e II, foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Enquanto, a normalidade dos dados de massa muscular exigiu a utilização do teste ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Todos os procedimentos estatístico foram realizados com auxílio do GraphPad Prism 8®.

Figura 7. Tratamento estatístico.



Fonte: KLEIN, G. B. 2020. Organograma para a delimitação do tratamento estatístico adequado.

5. RESULTADOS

A análise morfométrica dos núcleos, tecido conjuntivo intramuscular, e perfil histoquímico das fibras musculares, evidenciando seus formatos, tamanhos, concentrações e disposições, permitiram descrever o remodelamento agudo do ventre muscular e da JMT após a atrofia muscular e intervenção do treinamento.

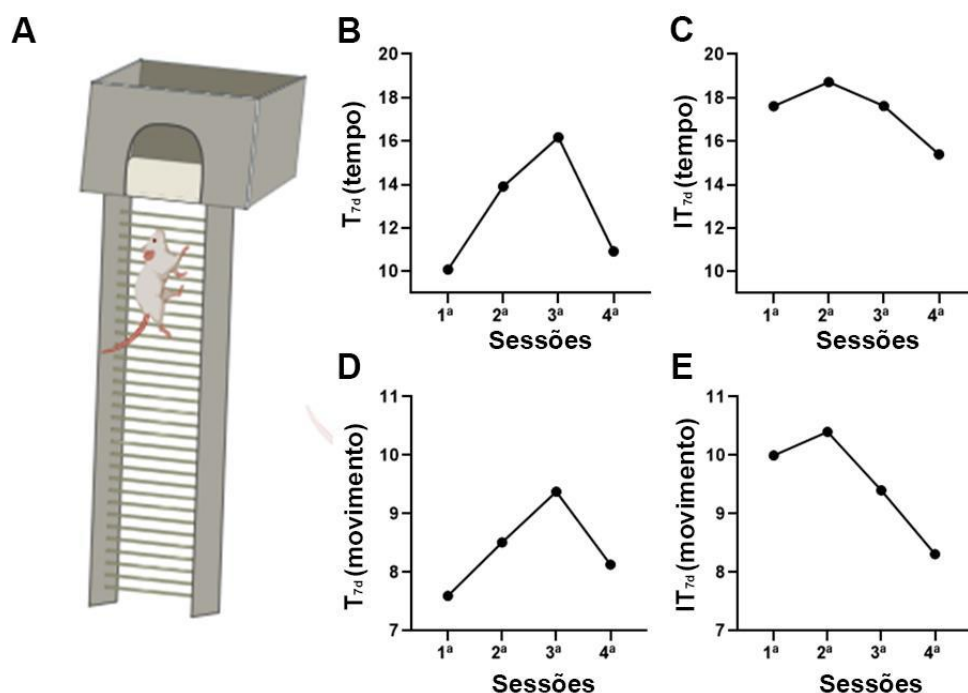
5.1. Análise Funcional do Treinamento

Em cada escalada realizada pelos animais dos Grupos T e IT foram coletados tempo e movimentos do membro torácico direito, os quais possibilitaram analisar as repercussões da atrofia no desempenho funcional durante o treinamento em escada vertical (Fig. 8).

Na 1ª sessão de treinamento, os Grupos IT_{0h}, IT_{24h}, IT_{4d} e IT_{7d}, apresentaram maior tempo e número de movimentos ($p < 0,0001$) para realizar as escaladas, respectivamente em comparação com o Grupo T_{0h}, T_{24h}, T_{4d} e T_{7d} (Fig. 8B e 8C).

Na 4ª sessão de treinamento, os Grupos IT_{4d} e IT_{7d} apresentaram maior tempo de escalada ($p < 0,0001$) em relação com o Grupo T_{4d} e T_{7d}, no entanto, sem alterações estatísticas no número de movimentos ($p > 0,05$) (Fig. 8D e 8E).

Figura 8. Análise funcional do treinamento em escada vertical.



Fonte: Elaborada pela autora com o auxílio do Biorender. A análise funcional do treinamento foi realizada através da mensuração do (A) tempo e número de movimentos do membro torácico direito utilizado para

cada escada. (B) Dados do tempo do subgrupo IT_{7d}. (C) Dados do tempo do subgrupo T_{7d}. (D) Dados do movimento do subgrupo IT_{7d}. (E) Dados do movimento do subgrupo T_{7d}.

5.2. Massa Corporal (MC)

Através dos dados obtidos da MC do gastrocnêmio foi possível descrever a evolução da massa corporal ao longo dos 4 Períodos (0 horas, 24 horas, 4 dias e 7 dias), bem como a distinta adaptação de cada grupo experimental causada pela atrofia muscular e intervenção do treinamento (Tabela 1).

Nos Grupo C, T e I não foram observadas diferenças significativas estatisticamente no valor de MC nas relações intragrupos ($p > 0,05$).

O treinamento após a atrofia muscular, não demonstrou alterações significativas nas comparações intragrupos ($p > 0,05$). Já em relação às comparações entre grupos, o IT_{0h} apresentou menor MC ($p < 0,001$) em relação ao T_{0h}.

Tabela 1. Massa corporal dos Grupos Experimentais.

MC (g)	Pré protocolo	P0h	P24h	P4d	P7d
Controle	254,80 ± 19,25	287,40 ± 19,26	-	-	-
Treinado	277,45 ± 17,72	322,00 ± 30,67	304,80 ± 12,76	314,60 ± 41,78	324,80 ± 37,32
Imobilizado	248,90 ± 21,16	229,80 ± 25,46	217,40 ± 16,01	260,40 ± 06,35	272,40 ± 27,19
Imobilizado Treinado	246,65 ± 17,72	208,20 ± 17,95***	237,00 ± 14,09	251,00 ± 18,03	269,80 ± 17,918

Fonte: Elaborada pela autora. Média e desvios padrões da massa corporal dos animais de todos os Grupos Experimentais. IT_{0h} ≠ T_{0h} ($p < 0,001$).

5.3. Massa Muscular (MM)

A análise da MM é uma variável que possibilita maior compreensão das adaptações estruturais agudas encontradas no músculo gastrocnêmio após os protocolos experimentais de atrofia muscular e treinamento em escada vertical (Tabela 2).

O Grupo T, I e IT não demonstraram diferenças estatísticas nos valores de MM na comparação intra-grupos ($p > 0,05$).

Entretanto, ao analisar a MM dos grupos submetidos aos diferentes protocolos, o Grupo T não apresentou alterações ($p > 0,05$), enquanto o Grupo I_{0h} demonstrou menor MM ($p < 0,0001$) em relação ao C. Assim como, o Grupo IT_{0h}, IT_{24h}, IT_{4d} e IT_{7d} apresentou menor MM ($p < 0,0001$), respectivamente em comparação ao T_{0h}, T_{24h}, T_{4d} e T_{7d}.

Tabela 2. Massa muscular do músculo gastrocnêmio dos Grupos Experimentais.

MM (g)	P0h	P24h	P4d	P7d
Controle	1,383 ± 0,10	-	-	
Treinado	1,548 ± 0,25	1,434 ± 0,15	1,491 ± 0,19	1,578 ± 0,14
Imobilizado	0,654 ± 0,32****	0,627 ± 0,13	0,804 ± 0,07	0,933 ± 0,09
Imobilizado Treinado	0,688 ± 0,10****	0,710 ± 0,15****	0,807 ± 0,04****	1,008 ± 0,07****

Fonte: Elaborada pela autora. Média e desvios padrões da massa muscular do músculo gastrocnêmio. $I_{0h} \neq C$ $p < 0,0001$; $I_{T_{0h}} \neq T_{0h}$ $p < 0,0001$; $I_{T_{24h}} \neq T_{24h}$ $p < 0,0001$; $T_{4d} \neq T_{4d}$ $p < 0,0001$; $T_{7d} \neq T_{7d}$ $p < 0,0001$.

5.4. Ventre Muscular

A Microscopia de Luz do ventre muscular possibilitou identificar as fibras musculares, núcleos, tecido conjuntivo, bem como a presença e disposição da vascularização do gastrocnêmio. A morfometria do formato, tamanho e disposição das estruturas e seus componentes celulares, demonstram as adaptações agudas provocadas pelo treinamento em escada vertical após a atrofia muscular.

5.4.1. Núcleos - Hematoxilina e Eosina

No Grupo C foi observada a distribuição das fibras musculares com formato poligonal, organizadas em fascículos, com seus núcleos dispostos perifericamente. Além disso, no espaço intersticial, observou-se a presença de vasos sanguíneos e um feixe nervoso (Fig. 9C).

O Grupo T_{0h} , apresentou as fibras musculares com formatos alongados e poligonais e tamanhos similares, além de disposição nuclear uniforme na região periférica. As estruturas de vascularização e inervação encontram-se próximas com maior presença de núcleos no tecido conjuntivo adjacente a essas estruturas (Fig. 9 T_{0h}).

No Grupo T_{24h} , as fibras musculares apresentam formatos arredondados e alongados, com seus núcleos periféricos. Os vasos sanguíneos foram observadas espaçadas ao longo do perimísio com maior presença nuclear adjacente. Em destaque, as artérias demonstram disposições oblíquas, evidenciadas pela ausência do lúmen e estriações (Fig. 9 T_{24h}).

O Grupo T_{4d} demonstra ampla adaptação nos tamanhos das fibras musculares, no qual as fibras menores possuem formato arredondado e as maiores com formato poligonal e alongado. Os núcleos foram observados periféricos e espaçamento nas fibras maiores, contrapondo a condensação nuclear nas fibras menores. As estruturas

vasculares e nervosas apresentam uma relação de proximidade (Fig. 9T_{4d}).

No Grupo T_{7d}, foi encontrada fibras com tamanhos e formatos similares e núcleos espaçados em sua periferia. No tecido conjuntivo adjacente as estruturas vasculares e nervosas apresentaram maior concentração nuclear, em destaque as artérias íntima relação de proximidade, devido à disposição “unidas” (Fig. 9T_{7d}).

No Grupo I_{0h}, as fibras demonstram alterações nos formatos (alongadas, ovais e poligonais) decorrentes da atrofia muscular. Em uma relação de proximidade, foram observadas as estruturas de vascularização e o feixe de fibra nervosa, além de maior concentração nuclear na ampla área de tecido conjuntivo associado (Fig. 9I_{0h}).

Após 24 horas, nota-se no Grupo IL_{24h} que as fibras musculares mantêm seus distintos formatos, no entanto, com extensa presença nuclear na periferia. A região da matriz extracelular evidencia-se vasos sanguíneos e feixes nervosos (Fig. 9IL_{24h}).

O Grupo IL_{4d}, apresenta manutenção nos formatos das fibras musculares irregulares, com extenso espaçamento entre os feixes musculares. Enquanto, a maior área de estruturas vasculares e nervosas se destaca por sua disposição ao longo de vários fascículos e com três feixes de fibras nervosas em seus diferentes diâmetros, além de uma concentração menos acentuada de núcleos do tecido conjuntivo adjacente (Fig. 9IL_{4d}).

No Grupo IL_{7d}, há maior uniformidade nas fibras musculares, em seus tamanhos e formatos arredondados. Em algumas regiões foram evidenciadas condensações nucleares com núcleos periféricos e centralizados as fibras musculares. Além disso, a associação de estruturas vasculares e nervosas, em ampla área de tecido conjuntivo (Fig. 9IL_{7d}).

Por fim, no do Grupo IT_{0h} foi observada formatos irregulares (ovais e alongados) das fibras musculares, com seus núcleos periféricos. As estruturas vasculares foram encontradas com maior densidade e proximidade, com destaque na disposição das artérias. Além da presença de um feixe de fibra nervosa (Fig. 9IT_{0h}).

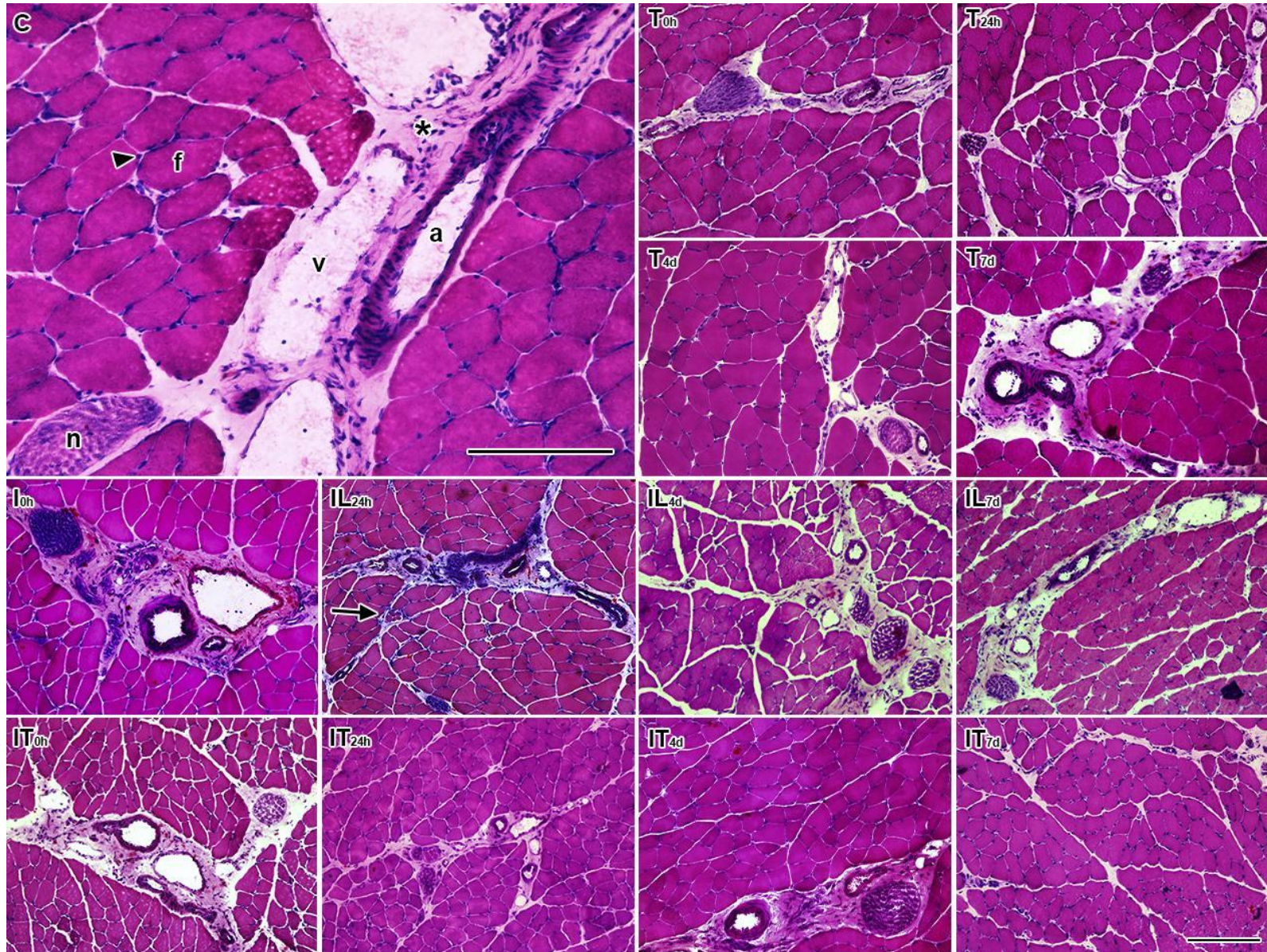
Após 24 horas, o Grupo IT_{24h} apresentou fibras musculares com formato irregular, extensa concentração de núcleos em sua periferia, com reorganização dos fascículos. Os vasos sanguíneos e feixes de fibra nervosa demonstram maior densidade e disposição espaçada no perimísio ao longo de vários fascículos. Também foi encontrado um fuso neuromuscular em proximidade (Fig. 9IT_{24h}).

No Grupo IT_{4d}, foram observadas fibras musculares com formatos e diâmetros distintos No espaço intersticial, os vasos sanguíneos e feixe de fibra nervosa apresentam

proximidade e maior concentração nuclear (Fig. 9IT_{4d}).

O Grupo IT_{7d}, apresenta fibras musculares com diâmetros irregulares, formatos poligonais e alongados, com núcleos periféricos dispostos irregularmente, além de algumas regiões de condensação nuclear. No perimísio, foram observados vasos sanguíneos e feixes de fibras nervosas espaçados ao longo de diversos fascículos. Além disso, um feixe de fibra muscular e fuso neuromuscular foi encontrado em outra região do espaço intersticial (Fig. 9IT_{7d}).

Figura 9. Microscopia de Luz com coloração de Hematoxilina e Eosina do Grupos Experimentais.



Fonte: Elaborada pela autora. Através da Microscopia de Luz com coloração de Hematoxilina e Eosina, destacamos as fibras musculares (f) com seus núcleos periféricos (cabeça de seta), além da disposição de estruturas vasculares, como as arteríolas (a) e vênulas (v), e estruturas nervosas, como o feixe de fibra nervosa (n) e o fuso neuromuscular (seta), dispostos em ampla área de tecido conjuntivo (*) no espaço intersticial. Grupos Experimentais: Controle (C), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado Livre 24 horas (IL_{24h}), Imobilizado Livre 4 dias (IL_{4d}), Imobilizado Livre 7 dias (IL_{7d}), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado 4 dias (T_{4d}), Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}), Imobilizado Treinado 4 dias (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}). Ampliações: 200x. Barras: 100 μ m

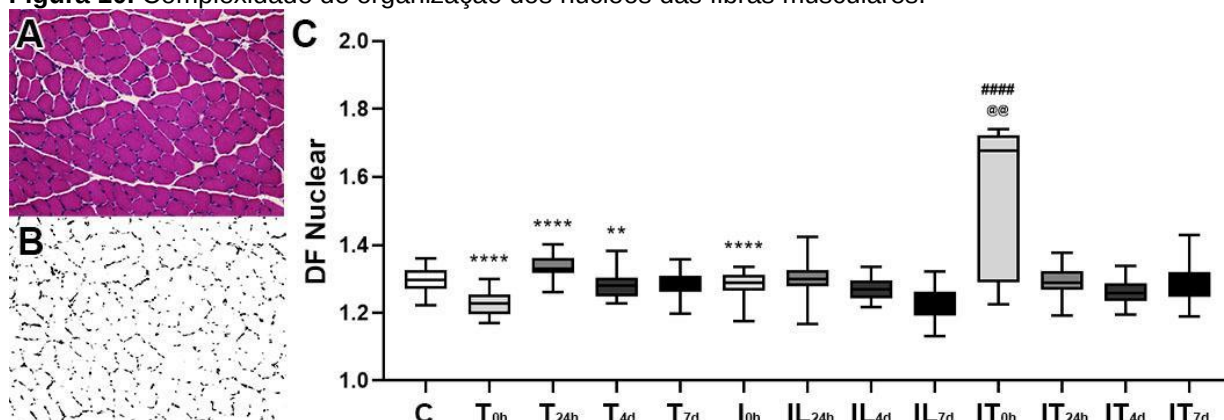
5.4.1.1. DF Nuclear

O treinamento em escada vertical resultou na menor complexidade de organização no T_{0h} ($p < 0,0001$) em relação ao Grupo C, enquanto o T_{24h} demonstrou maior complexidade de organização em comparação ao T_{0h} , e menor complexidade de organização no T_{4d} ($p < 0,01$) em relação ao T_{24h} . No Grupo T_{7d} não houve adaptações significativas ($p > 0,05$) (Fig. 10C).

A Imobilização resultou em menor complexidade de organização no I_{0h} ($p < 0,0001$) em relação ao C. Enquanto os Grupos I_{24h} , I_{4d} e I_{7d} não demonstraram alterações estatisticamente significantes ($p > 0,05$) respectivamente em comparação aos Grupos I_{0h} , I_{24h} e I_{4d} (Fig. 10C).

Com a intervenção do treinamento após a atrofia muscular, o IT_{0h} apresentou maior complexidade de organização dos núcleos, tanto em comparação ao I_{0h} ($p < 0,01$) quanto em relação ao T_{0h} ($p < 0,0001$) (Fig. 6C). No entanto, os Grupos IT_{24h} , IT_{4d} e IT_{7d} não revelaram diferenças estatísticas em comparação com os Grupos I_{24h} , I_{4d} , I_{7d} , T_{24h} , T_{4d} e T_{7d} ($p > 0,05$) (Fig. 10C).

Figura 10. Complexidade de organização dos núcleos das fibras musculares.



Fonte: Elaborada pela autora. Dimensão fractal dos núcleos das fibras musculares de todos os Grupos Experimentais (C), realizada a partir da binarização (B) das micrografias com coloração de Hematoxilina e Eosina (A). Grupos: Controle (C), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado Livre 24 horas (IL_{24h}), Imobilizado Livre 4 dias (IL_{4d}), Imobilizado Livre 7 dias (IL_{7d}), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado

4 dias (, Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}), Imobilizado Treinado (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}). Ampliações (A, B): 200X. $T_{0h} \neq C$ ($p < 0,0001$); $T_{24h} \neq T_{0h}$ ($p < 0,0001$); $T_{4d} \neq T_{24h}$ ($p < 0,01$); $I_{0h} \neq C$ ($p < 0,0001$); $IT_{0h} \neq T_{0h}$ ($p < 0,0001$); $IT \neq T$ ($p < 0,01$).

5.4.2. Tecido Conjuntivo Intramuscular - Picro Sirius-Red

No Grupo C, o tecido conjuntivo intramuscular foi evidenciado pela coloração avermelhada, no qual foi possível identificar o perímio envolvendo os fascículos musculares e o endomíio circundando as fibras musculares (Fig. 11C).

O Grupo T_{0h} evidenciou o perímio ao redor dos fascículos musculares, bem como, foi identificado o endomíio circundando as fibras musculares (Fig. 11 T_{0h}).

No Grupo T_{24} , observou-se intensificado pela coloração avermelhada o perímio circundando os fascículos e o endomíio envolta das fibras musculares (Fig. 11 T_{24h}).

O Grupo T_{4d} demonstrou identificação mais discreta do perímio e do endomíio, respectivamente ao redor dos fascículos e das fibras musculares (Fig. 11 T_{4d}).

No Grupo T_{7d} também demonstrou nítida evidência do perímio envolvendo os fascículos bem o endomíio circundando as fibras musculares (Fig. 11 T_{7d}).

O Grupo I_{0h} revelou adaptações com a identificação do perímio na coloração avermelhada ao redor dos fascículos musculares, com redução na identificação do endomíio (Fig. 11 I_{0h}).

Após 24 horas, no Grupo I_{24h} observou-se a presença de fascículos musculares menores que permitiu a melhor identificação do perímio, enquanto o endomíio demonstra identificação ao redor das fibras musculares (Fig. 11 I_{24h}).

No Grupo I_{4d} o perímio e o endomíio foram bem identificados pela coloração avermelhada, respectivamente circundando os fascículos e fibras musculares (Fig. 11 I_{4d}).

O Grupo I_{7d} revelou melhor identificação do perímio ao redor dos fascículos, além da identificação discreta do endomíio envolvendo as fibras musculares (Fig. 11 I_{7d}).

O Grupo IT_{0h} demonstrou a presença de fascículos menores com melhor identificação do perímio pela coloração avermelhada, além do endomíio circundado as fibras musculares (Fig. 11 IT_{0h}).

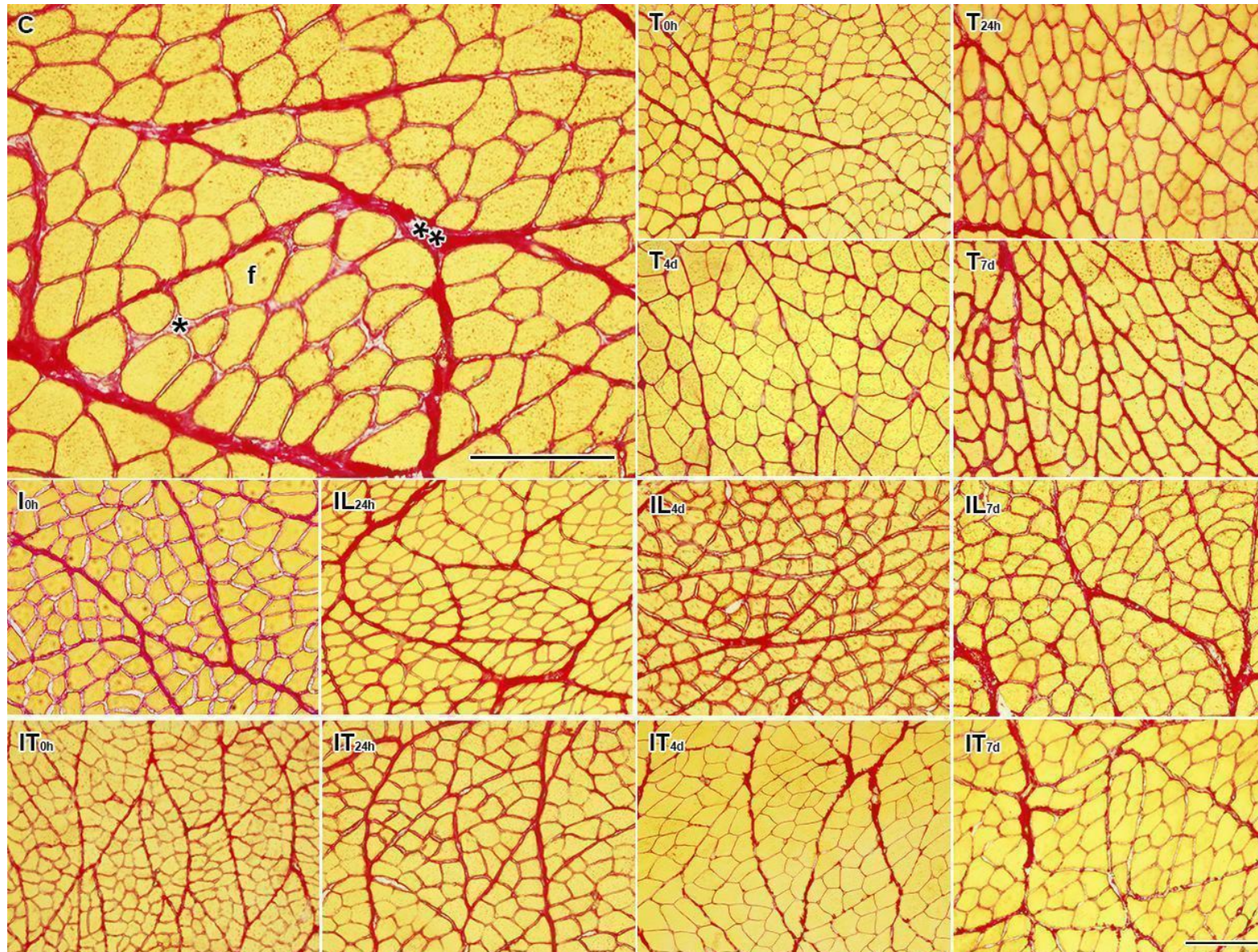
Após 24 horas, o Grupo IT_{24h} também revelou melhor identificação do perímio

ao redor dos fascículos, assim como do endomísio envolvendo das fibras musculares (Fig. 11IT_{24h}).

No Grupo IT_{4d}, foi possível identificar o perimísio e endomísio, respectivamente, ao redor dos fascículos e fibras musculares (Fig. 11IT_{4d}).

O P_{7d} do Grupo IT_{7d} apresentou melhor evidenciação do perimísio pela coloração avermelhada, além da identificação mais discreta do endomísio circundando as fibras musculares (Fig. 11IT_{7d}).

Figura 11. Microscopia de Luz com coloração de Picro Sirius-Red do Grupos Experimentais.



Fonte: Elaborada pela autora. Por meio da Microscopia de Luz com coloração de Picro-Sirius Red, destacamos as fibras musculares (f) com o endomísio (*) circundando as fibras musculares e o perimísio (**) envolvendo um feixe de fibras, de todos os Grupos Experimentais: Controle (C), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado Livre 24 horas (I_{24h}), Imobilizado Livre 4 dias (I_{4d}), Imobilizado Livre 7 dias (I_{7d}), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado 4 dias (T_{4d}), Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}), Imobilizado Treinado 4 dias (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}). Ampliações: 200x. Barras: 100 µm.

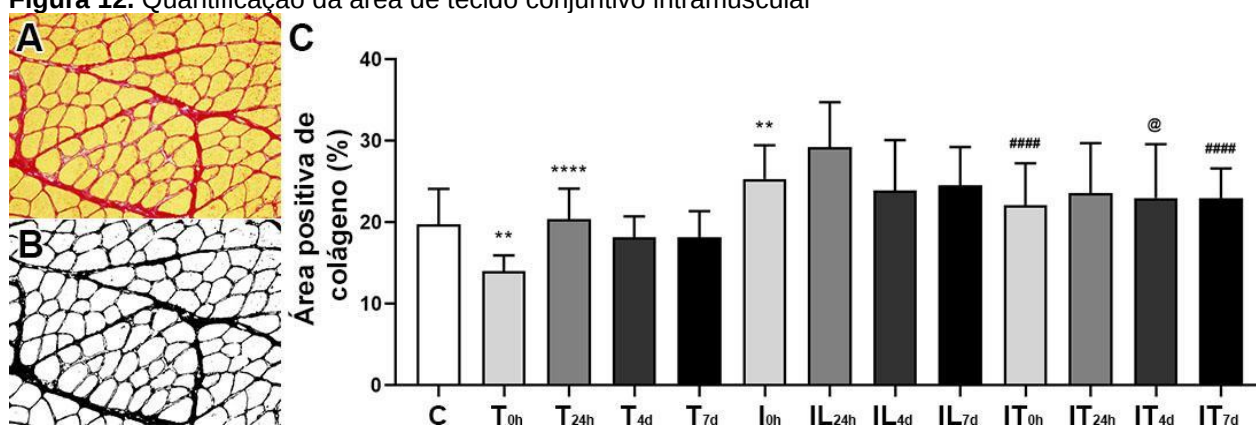
5.4.2.1. Área de tecido conjuntivo

O treinamento resultou na menor área de tecido conjuntivo ($p < 0,01$) no Grupo T_{0h} em comparação ao Grupo C, enquanto o T_{24h} apresentou maior área de tecido conjuntivo ($p < 0,0001$) em relação ao T_{0h}. No entanto, os Grupos T_{4d} e T_{7d} não revelaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) (Fig. 12C).

A quantificação da área de tecido conjuntivo após a imobilização demonstrou no Grupo I_{0h} maior área ($p < 0,01$) em relação ao C. Enquanto os Grupos I_{24h}, I_{4d} e I_{7d} não demonstraram adaptações significativas ($p > 0,05$) (Fig. 12C).

O Grupo IT_{0h} revelou maior área de tecido conjuntivo ($p < 0,0001$) em comparação ao T_{0h}, assim como no IT_{7d}, houve a maior área de tecido conjuntivo ($p < 0,0001$) em relação ao T_{7d}. O IT_{24h} e IT_{4d} não apresentaram alterações estatísticas, respectivamente aos Grupos T_{24h} e T_{4d}. Em comparação aos grupos submetidos à imobilização, no Grupo IT_{4d} observou-se maior área ($p < 0,05$) em relação ao I_{4d}, enquanto os Grupos I_{0h}, I_{24h} e I_{7d} ($p > 0,05$) (Fig. 12C).

Figura 12. Quantificação da área de tecido conjuntivo intramuscular

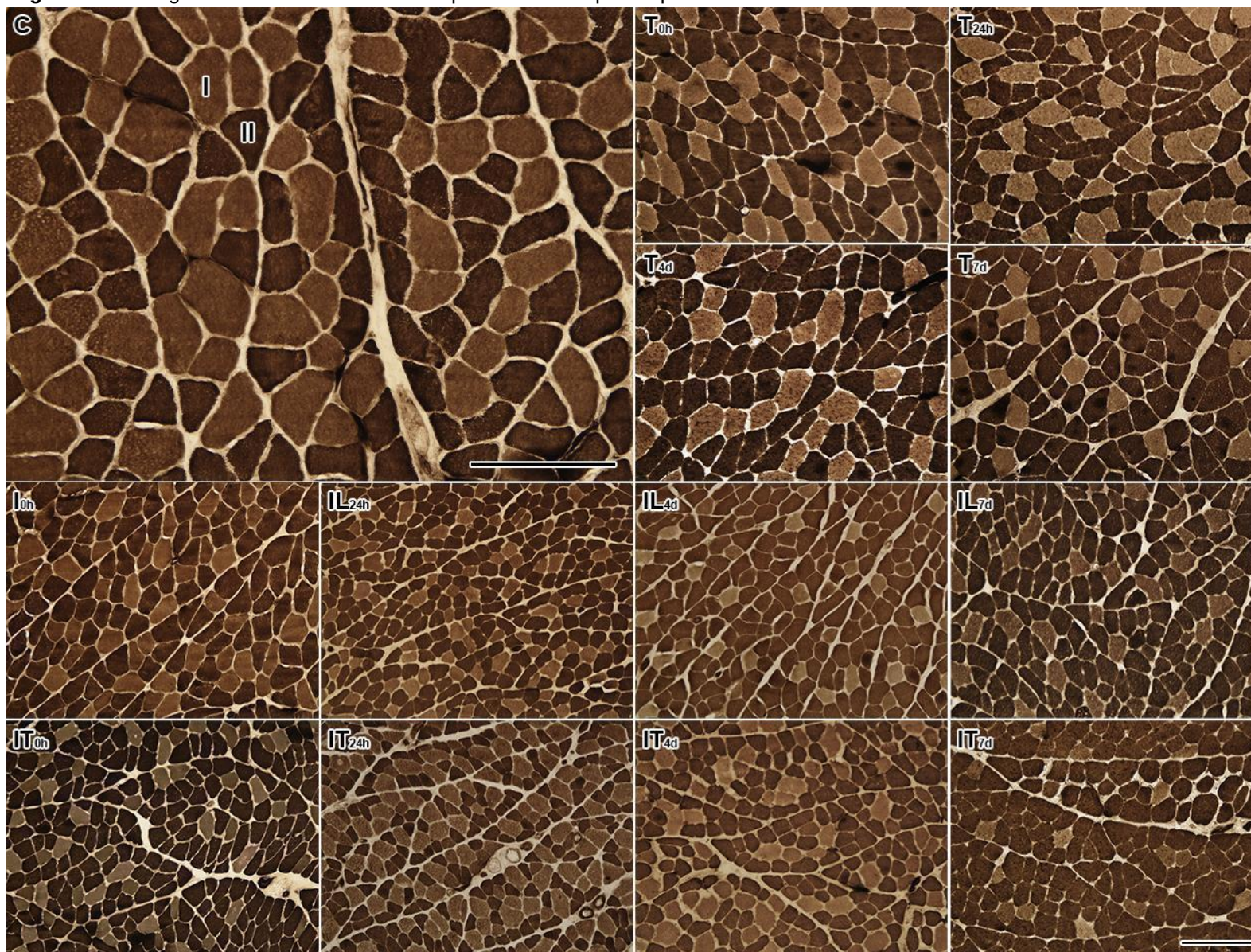


Fonte: Elaborada pela autora. Quantificação da área de tecido conjuntivo de colágeno (C) realizado por meio da binarização (B) das micrografias de Picro Sirius-Red (A). Grupos Experimentais: Controle (C), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado 4 dias (T_{4d}), Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado Livre 24 horas (IL_{24h}), Imobilizado Livre 4 dias (IL_{4d}), Imobilizado Livre 7 dias (IL_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}), Imobilizado Treinado 4 dias (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}). Ampliações (A, B): 200X. T_{0h} ≠ C ($p < 0,01$); T_{24h} ≠ T_{0h} ($p < 0,0001$); I_{0h} ≠ C ($p < 0,01$); IT_{0h} ≠ T_{0h} ($p < 0,0001$); IT_{4d} ≠ IL_{4d} ($p < 0,05$); IT_{7d} ≠ T_{7d} ($p < 0,0001$).

5.4.3. Fibras Musculares - ATPase Miofibrilar

Através da diferenciação dos fenótipos das fibras musculares foi possível identificar as fibras tipo I e II, as quais foram mensuradas e analisadas a área de secção transversa (Fig. 13).

Figura 13. Micrografias da técnica de ATPase pH 9.4 dos Grupos Experimentais.



Fonte: Elaborada pela autora. Por meio do pH 9.4 da ATPase Miofibrilar foi possível diferenciar as fibras musculares em tipo I (I) e tipo II (II) em todos os Grupos Experimentais: Controle (C), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado 4 dias (T_{4d}), Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado Livre 24 horas (I_{24h}), Imobilizado Livre 4 dias (I_{4d}), Imobilizado Livre 7 dias (I_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}), Imobilizado Treinado (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}). Ampliação: 200x. Barras: 100 μm .

5.4.3.1. Área de secção transversa (AST)

A análise da AST das fibras musculares tipo I e II demonstraram diferentes adaptações de acordo com os protocolos experimentais e fenótipos (Fig. 14).

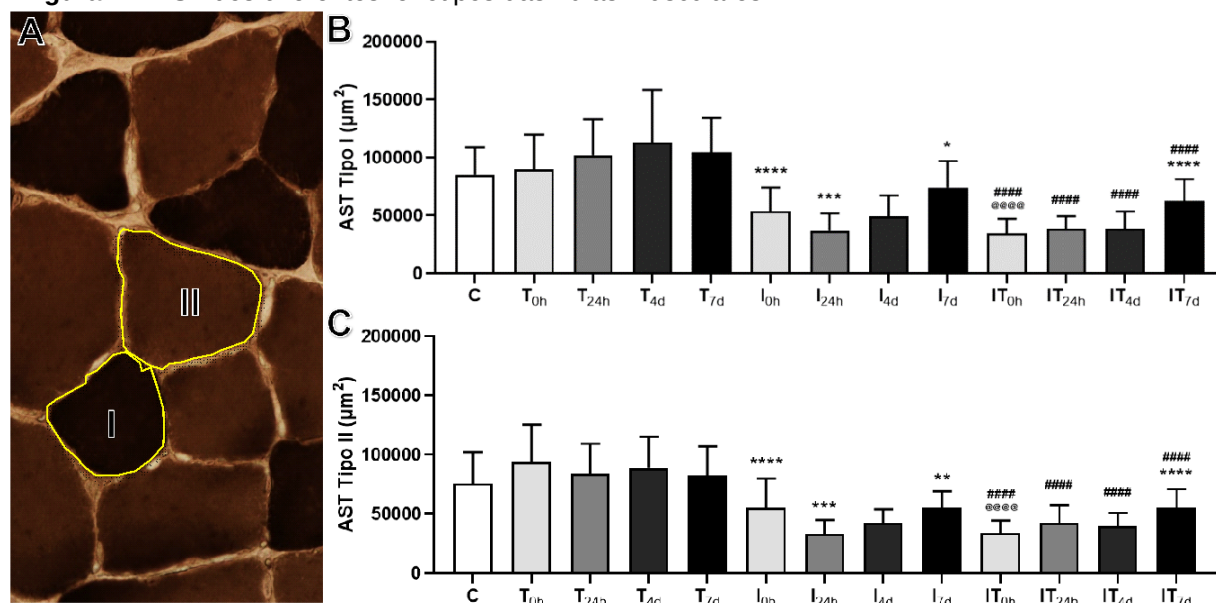
Com o treinamento, tanto as fibras tipo I quanto fibras tipo II, não demonstraram alterações no T_{0h} em comparação com o Grupo C, assim como no T_{24h} , T_{4d} e T_{7d} respectivamente em relação ao T_{0h} , T_{24h} e T_{4d} ($p > 0,05$) (Fig. 14B e C).

A imobilização resultou na diminuição da área nas fibras tipo I ($p < 0,0001$) e II ($p < 0,0001$) do I_{0h} em relação ao Grupo C, bem como no I_{24h} houve menor AST nas fibras tipo I ($p < 0,001$) e II ($p < 0,001$) em comparação ao I_{4d} . Enquanto o I_{7d} demonstrou maior AST das fibras tipo I ($p < 0,05$) e II ($p < 0,01$) em relação ao I_{4d} (Fig. 14B e C).

O Grupo IT demonstrou maior AST das fibras tipo I e II do IT_{7d} ($p < 0,0001$) em relação ao IT_{4d} . As demais comparações intragrupos não apresentaram alterações estatisticamente significantes ($p > 0,05$) (Fig. 14B e C).

Em comparação aos Grupos submetidos ao treinamento, o IT_{0h} demonstrou menor AST nas fibras tipo I ($p < 0,0001$) e tipo II ($p < 0,0001$) em relação ao T_{0h} . No IT_{24h} houve a diminuição da área nas fibras tipo I ($p < 0,0001$) e II ($p < 0,0001$) em comparação ao T_{24h} . O IT_{4d} demonstrou menor AST das fibras tipo I ($p < 0,0001$) e II ($p < 0,0001$) em comparação ao T_{4d} . No IT_{7d} observou-se menor AST nas fibras tipo I ($p < 0,0001$) e II ($p < 0,0001$) em relação ao T_{7d} (Fig. 14B e C).

Diante dos Grupos imobilizados, o Grupo IT_{0h} apresentou menor AST fibras tipo I ($p < 0,0001$) e II ($p < 0,0001$) em relação ao I_{0h} . Enquanto as demais comparações do IT_{24h} , IT_{4d} e IT_{7d} não revelaram diferenças estatísticas frente aos Grupos I_{24h} , I_{4d} e I_{7d} (Fig. 14B e C).

Figura 14. AST dos diferentes fenótipos das fibras musculares.

Fonte: Elaborada pela autora. Área de seção transversal (AST) das fibras musculares tipo I (I) e tipo II (II) realizada por meio da ATPase 9.4 (A) de todos os Grupos Experimentais: Controle (C), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado 4 dias (T_{4d}), Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado Livre 24 horas (IL_{24h}), Imobilizado Livre 4 dias (IL_{4d}), Imobilizado Livre 7 dias (IL_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}), Imobilizado Treinado 4 dias (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}). I_{0h} ≠ C (p<0,0001); IL_{24h} ≠ I_{0h} (p<0,001); IL_{7d} ≠ IL_{4d} (p<0,05); IT_{0h} ≠ T_{0h} (p<0,0001); IT_{0h} ≠ I_{0h} (p<0,0001); IT_{24h} ≠ T_{24h} (p<0,0001); IT_{4d} ≠ T_{4d} (p<0,0001); IT_{7d} ≠ T_{7d} (p<0,0001).

5.5. Junção Miotendínea

A análise das estruturas presentes na JMT (núcleos, tecido conjuntivo, telócitos e células satélites) permitiram as repercussões provocadas pela imobilização e intervenção do treinamento em escada vertical, evidenciando os as alterações que caracterizam cada período agudo de remodelação.

5.5.1. Microscopia de Luz - Hematoxilina e Eosina

No Grupo C, foi possível observar as fibras musculares longitudinais alinhadas na interface miotendínea e o tecido tendíneo, com núcleos dispostos ao longo de toda a interface e na região periférica das fibras musculares, além dos tenócitos alongados presentes nas fibras de colágeno (Fig. 15C).

O Grupo T_{0h} demonstrou maior acúmulo e distribuição nuclear, sobretudo na área de interface miotendínea. Nas fibras colágenas, os tenócitos possuem formato alongado e disposição paralela (Fig. 15T_{0h}).

No Grupo T_{24h} observou-se menor densidade dos núcleos dispersos ao longo da interface miotendínea e periferia das fibras musculares, enquanto os tenócitos apresentaram formato irregular com arranjo desorganizado nas fibras colágenas (Fig. 15T_{24h}).

O Grupo T_{4d} apresentou os núcleos com arranjo irregular, devido sua localização na extremidade das fibras musculares (interface miotendínea), periféricos e centralizados na fibra musculares, vale ressaltar que os núcleos apresentam maior acúmulo na interface miotendínea. Os tenócitos, por sua vez, apresentaram formato alongado e disposição paralela ao longo das fibras colágenas (Fig. 15T_{4d}).

O Grupo T_{7d} apresentou núcleos dispostos na interface miotendínea e sobretudo na periferia das fibras musculares, enquanto os tenócitos com formato arredondado foram observados dispersos nas fibras colágenas (Fig. 15T_{7d}).

No Grupo I_{0h} os núcleos foram encontrados com maior acúmulo na interface miotendínea, além de alguns dispersos na periferia das fibras musculares. Os tenócitos demonstraram disposição paralela nas fibras colágenas e formato alongado (Fig. 11I_{0h}).

O Grupo IL_{24h} demonstrou maior acúmulo de núcleos dispostos predominantemente na interface miotendínea, além dos tenócitos alongados e paralelos ao longo das fibras colágenas (Fig. 15IL_{24h}).

No Grupo IL_{4d}, foram observados maior densidade dos núcleos com vários grupamentos localizados por toda a interface miotendínea e periferia das fibras musculares (Fig. 15IL_{4d}).

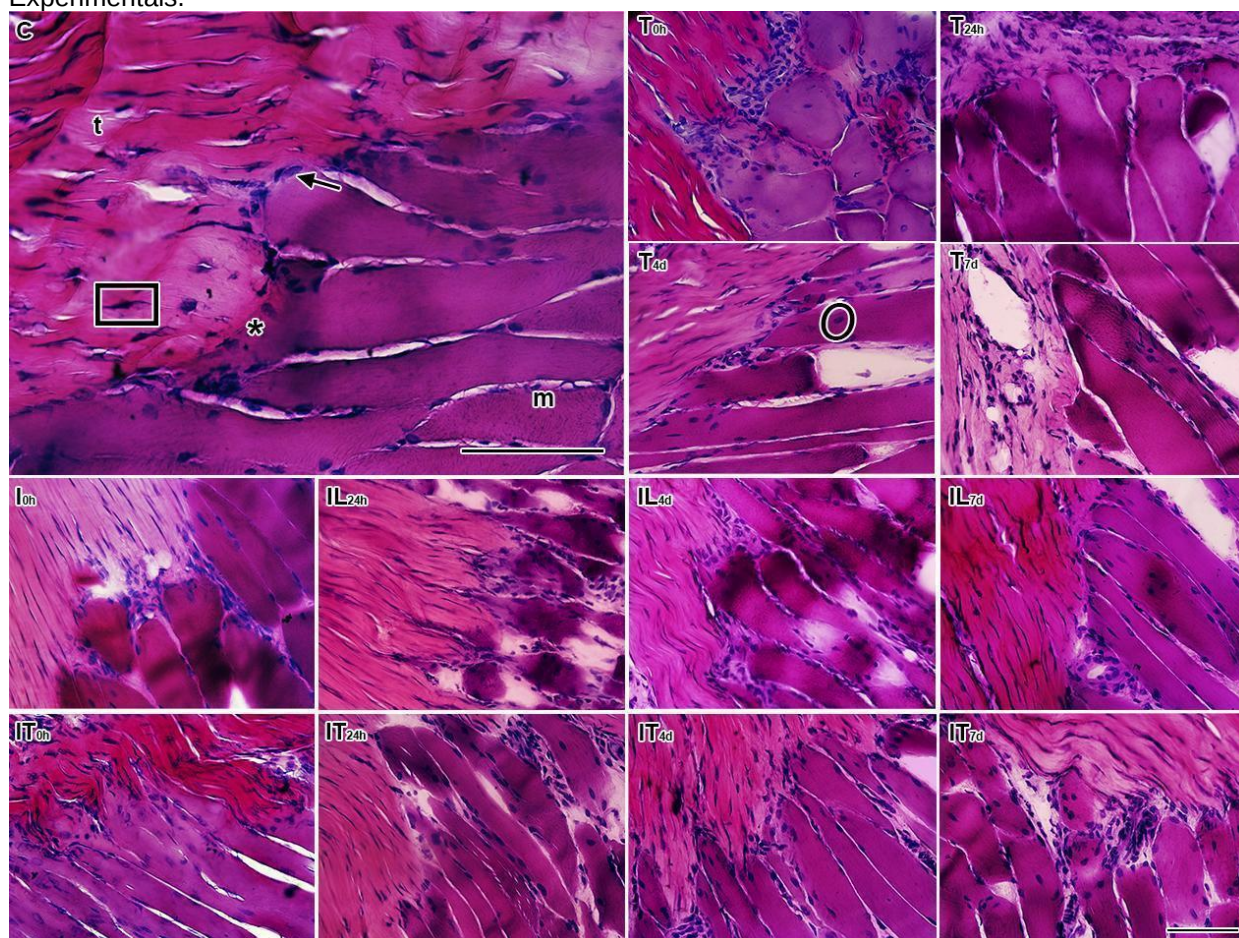
O Grupo IT_{0h} revelou maior acúmulo dos núcleos dispersos na interface miotendínea, além de periféricos e centralizados nas fibras musculares. Enquanto o tenócitos, apresentaram formatos arredondados e alongados, com arranjo irregular nas fibras colágenas (Fig. 11IT_{0h}).

No IT_{24h} observou-se menor densidade nos núcleos ao longo da interface miotendínea com pequenos grupamentos localizados na periferia das fibras musculares. Os tenócitos, por sua vez, demonstraram formato alongado e posicionamento paralelo nas fibras colágenas (Fig. 15IT_{24h}).

No Grupo IT_{4d} houve maior densidade dos núcleos com arranjo irregular na interface miotendínea e periferia das fibras musculares, enquanto nos tenócitos foram observados formatos alongados e arredondados dispostos nas fibras colágenas (Fig. 15IT_{4d}).

O Grupo IT_{7d} demonstrou acúmulo dos núcleos na interface miotendínea, além de maior densidade na periferia e alguns núcleos localizados centralizados nas fibras musculares. Enquanto os tenócitos demonstraram formato alongado e disposição paralela nas fibras colágenas (Fig. 15IT_{7d}).

Figura 15. Microscopia de Luz com coloração de Hematoxilina e Eosina da JMT dos Grupos Experimentais.



Fonte: Elaborada pela autora. Através da Microscopia de Luz com coloração de Hematoxilina e Eosina da junção miotendínea (*), região de interface entre o músculo (m) e o tendão (t), são evidenciados os núcleos localizados na interface miotendínea (seta), periféricos (cabeça de seta) e centralizados (círculo) nas fibras musculares; além dos tenócitos (quadrado) dispostos ao longo das fibras colágenas do tecido tendínea. Grupos Experimentais: Controle (C), Treinado 0 horas (T_{0h}), Treinado 24 horas (T_{24h}), Treinado 4 dias (T_{4d}), Treinado 7 dias (T_{7d}), Imobilizado 0 horas (I_{0h}), Imobilizado Livre 24 horas (IL_{24h}), Imobilizado Livre 4 dias (IL_{4d}), Imobilizado Livre 7 dias (IL_{7d}), Imobilizado Treinado 0 horas (IT_{0h}), Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}), Imobilizado Treinado 4 dias (IT_{4d}), Imobilizado Treinado 7 dias (IT_{7d}). Ampliações: 200x. Barras: 100 µm.

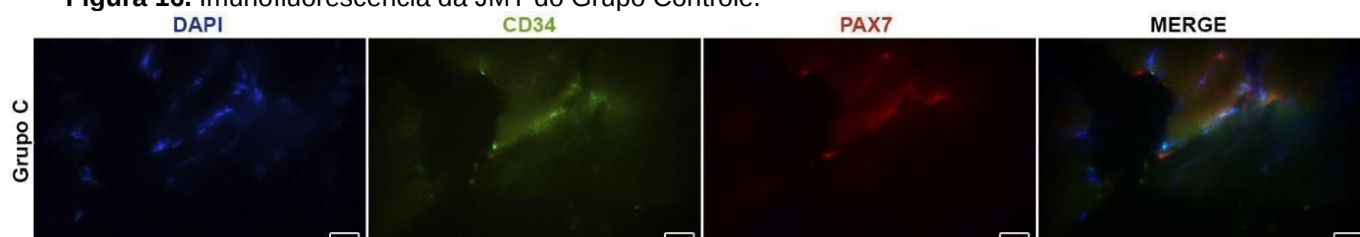
5.5.2. Imunofluorescência

Através da técnica de imunofluorescência foi possível identificar os núcleos celulares (DAPI), telócitos (CD34) e células satélites (Pax7), destacando seu

posicionamento na interface miotendínea, relação de proximidade entre as diferentes estruturas e adaptações em suas densidades (Fig. 16, 17, 18 e 19).

No Grupo C, foi possível observar os núcleos celulares presentes na interface miotendínea e periferia das fibras musculares dispostas longitudinalmente, sobretudo a relação de proximidade entre os telócitos e as células satélites na interface miotendínea (Fig. 16).

Figura 16. Imunofluorescência da JMT do Grupo Controle.



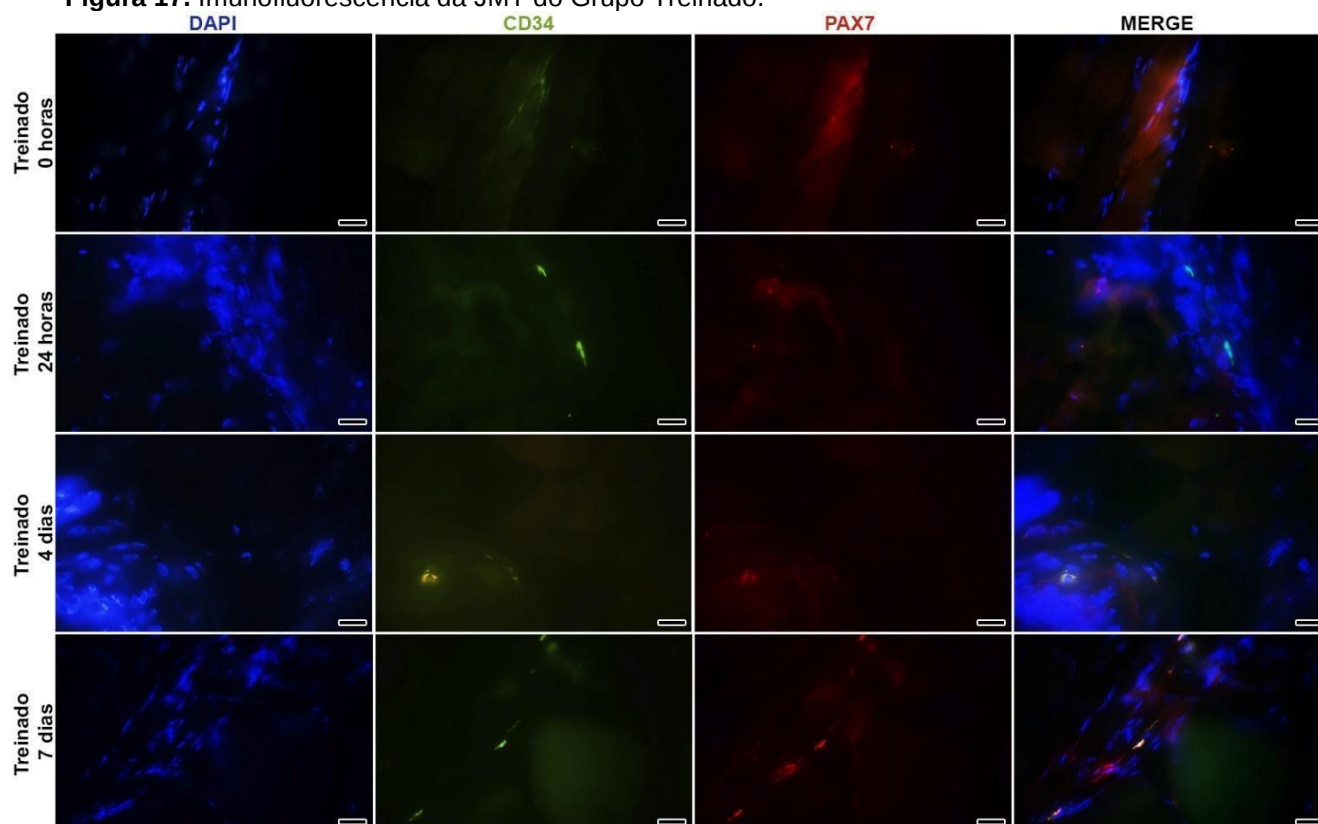
Fonte: Elaborada pela autora. Imunomarcacão da JMT do Grupo Controle (C), com identificacão dos núcleos (DAPI), telócitos (CD34+) e células satélites (PAX7), com destaque em seus posicionamentos ao longo da interface miotendínea e suas possíveis relações de proximidades. Ampliações: 600x. Barras: 10 µm.

No Grupo T_{0h}, os núcleos dispostos ao longo da área de interaçã musculotendínea e periferia das fibras musculares. Em destaque, os telócitos são evidenciados na interface miotendínea com proximidade entre si, enquanto as células satélites não demonstram reativas a imunomarcacão (Fig. 17T_{0h}).

O T_{24h}, demonstra os telócitos em alinhamento destacados na interface miotendínea, e ausência da imunomarcacão positiva das células satélites (Fig. 17T_{24h}).

No T_{4d} também foi observado maior densidade dos núcleos na interface miotendínea, com ênfase nos telócitos e células satélites em proximidade nessa região (Fig. 17T_{4d}).

O T_{7d} apresenta alta atividade nuclear, no entanto menos expressiva que os períodos anteriores, em evidência a presença de vários telócitos na JMT em proximidade com várias células satélites (Fig. 17T_{7d}).

Figura 17. Imunofluorescência da JMT do Grupo Treinado.

Fonte: Elaborada pela autora. Imunomarcacão da JMT do Grupo Treinado (T) e seus subgrupos, para identificação dos núcleos (DAPI), telócitos (CD34) e células satélites (PAX7), com destaque em seus posicionamentos ao longo da interface miotendínea e suas possíveis relações de proximidades. Ampliações: 600x. Barras: 10 µm.

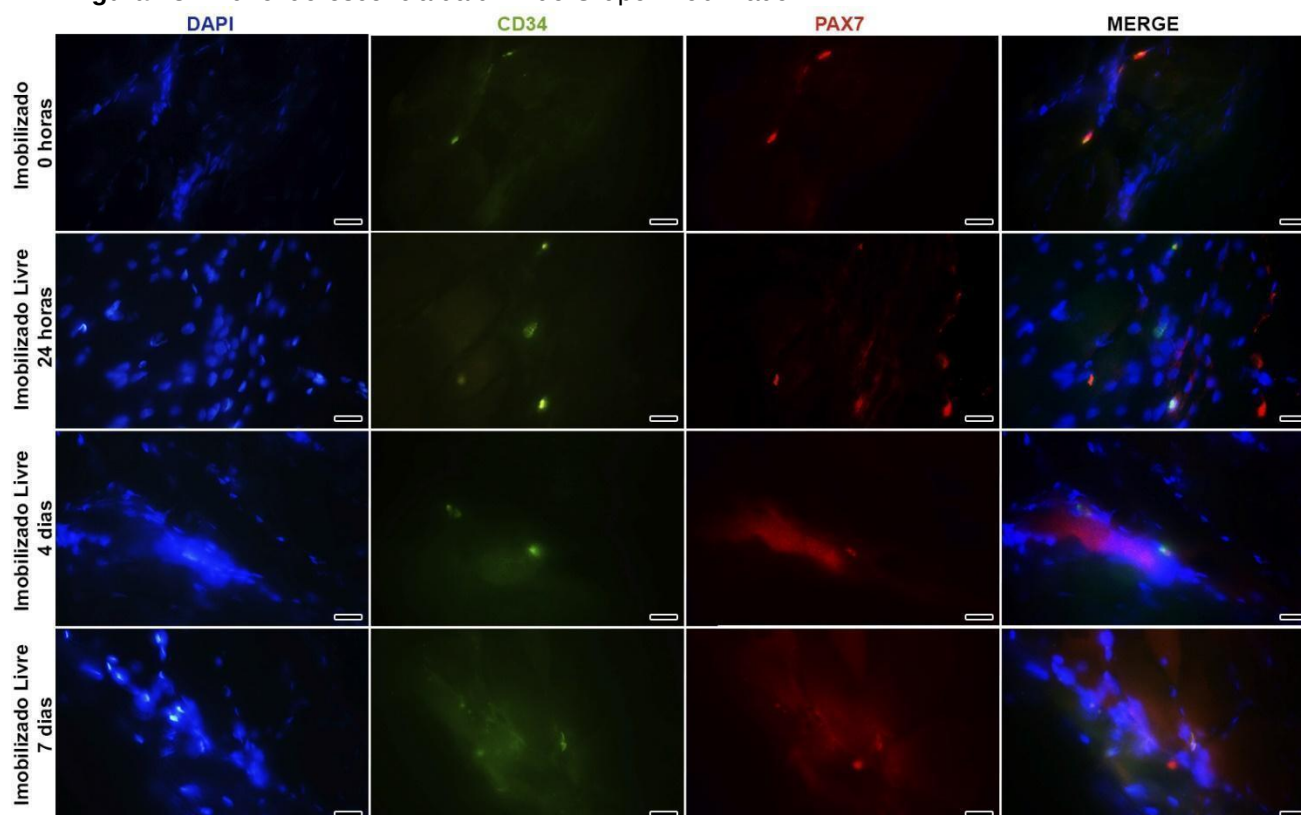
No Grupo I_{0h} observou-se extensa atividade dos núcleos, sobretudo na região de interface musculotendínea, com destaque nos telócitos evidenciado na JMT em proximidade com as células satélites (Fig. 18 I_{0h}).

O IL_{24h} apresenta alta atividade nuclear ao longo da interface miotendínea e fibras musculares. Os telócitos, por sua vez, são identificados na JMT, enquanto as células satélites são destacadas algumas em proximidade com os telócitos e outras presentes no tecido tendíneo (Fig. 18 IL_{24h}).

No IL_{4d} os núcleos demonstram alta densidade na interface miotendínea, além da presença na periferia das fibras musculares. Os telócitos são evidenciados espaçados entre si na extremidade da fibra muscular que constitui a interface miotendínea, com posicionamento próximo de uma célula satélite (Fig. 18 IL_{4d}).

O IL_{7d} apresentou a atividade nuclear em acúmulo na interface miotendínea. A presença dos tenócitos foi identificada na JMT, além da proximidade com as células satélites evidenciadas nessa região (Fig. 18 IL_{7d}).

Figura 18. Imunofluorescência da JMT do Grupo Imobilizado.



Fonte: Elaborada pela autora. Imunomarcção da JMT do Grupo Imobilizado (I) e seus subgrupos, para identificação dos núcleos (DAPI), telócitos (CD34) e células satélites (PAX7), com destaque em seus posicionamentos ao longo da interface miotendínea e suas possíveis relações de proximidades. Ampliações: 600x. Barras: 10 µm.

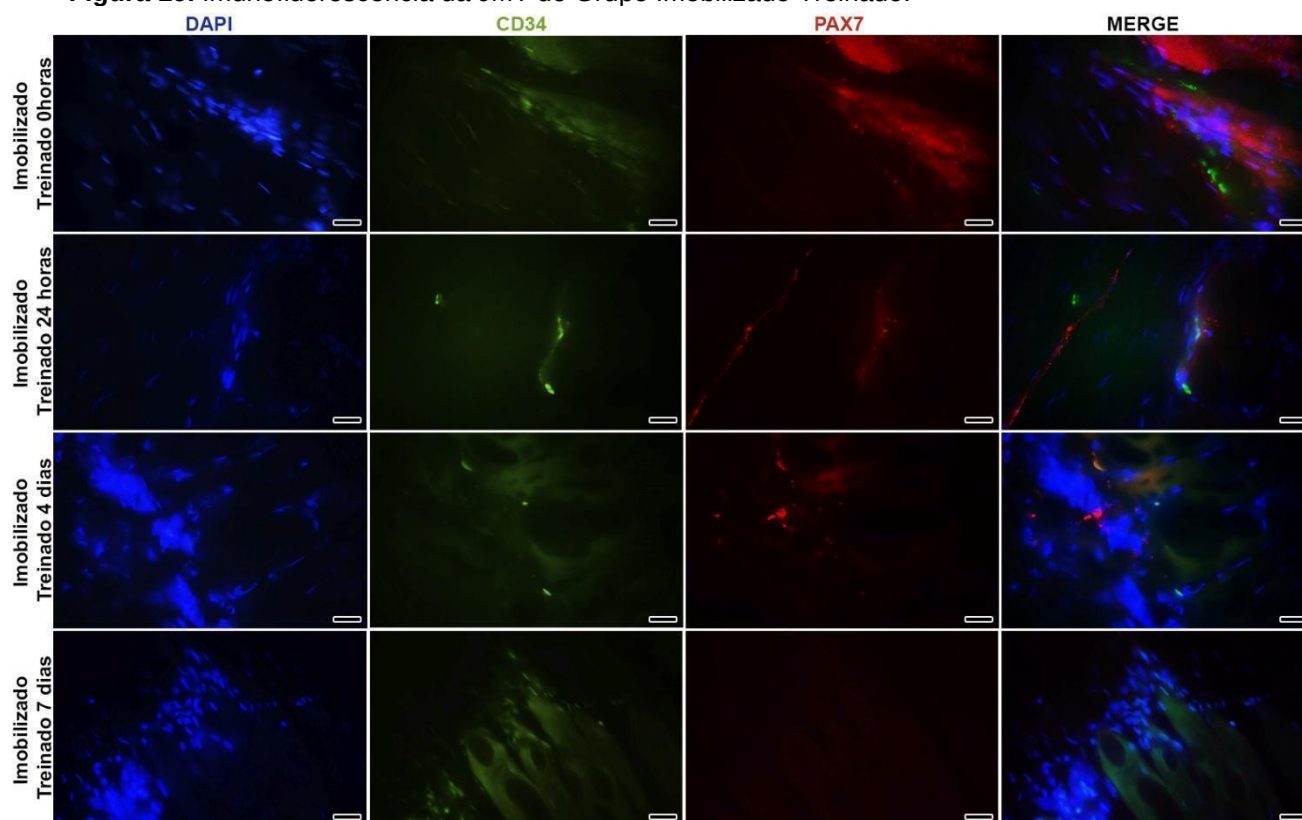
No Grupo IT_{0h} a presença dos núcleos foram mais expressivos na região de interface musculotendínea. Os telócitos foram encontrados em acúmulo na JMT, no entanto não identificada as células satélites não demonstraram reatividade a imunomarcção (Fig. 19IT_{0h}).

No IT_{24h} os núcleos foram observados menos expressivos, no entanto com posicionamento aglomerado na extremidade da fibra muscular que constitui a região de interface musculotendínea. Os telócitos foram encontrados na região da JMT com proximidade entre si, além de um telócitos mais distante disposto na área do tecido tendíneo (Fig. 19IT_{24h}).

O IT_{4d} demonstrou maior densidade dos núcleos, dispostos em aglomerados pela JMT. Os telócitos destacados demonstram seu posicionamento espaçado entre si ao longo da JMT, além da proximidade com as células satélites (Fig. 19IT_{4d}).

No IT_{7d}, os aglomerados de núcleos foram observados dispostos por toda interface miotendínea, assim como os telócitos apresentam maior densidade e sua íntima relação com a JMT. As células satélites não foram observadas nessa região (Fig. 19IT_{7d}).

Figura 19. Imunofluorescência da JMT do Grupo Imobilizado Treinado.



Fonte: Elaborada pela autora. Imunomarcacão da JMT do Grupo Imobilizado Treinado (IT) e seus subgrupos, para identificação dos núcleos (DAPI), telócitos (CD34) e células satélites (PAX7), com destaque em seus posicionamentos ao longo da interface miotendínea e suas possíveis relações de proximidades. Ampliações: 600x. Barras: 10 µm.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram descritas as adaptações agudas dos componentes estruturais do ventre muscular e JMT, após utilizar o treinamento como intervenção para as repercussões deletérias causadas pela atrofia muscular, evidenciando o acompanhamento das alterações iniciais em cada estrutura, com o intuito de fornecer novas evidências para elucidar o notável e desconhecido processo adaptativo da JMT.

A utilização do treinamento a longo prazo para reverter os efeitos prejudiciais da atrofia é comprovada como eficaz em diversos estudos (PALMA et al., 2011; POLLEZALLI et al., 2019; MARTINEZ, ET AL., 2021; HONDA et al., 2022). Dentre as repercussões da atrofia atenuadas pelo treinamento, a capacidade funcional do músculo é reduzida, devido à rigidez muscular provocada pela superexpressão de colágeno, também conhecida como fibrose (HONDA et al., 2022). Dessa forma, o maior tempo e número de movimentos do Grupo IT em relação ao Grupo T, é explicado pela redução da extensibilidade muscular que acomete na menor mobilidade articular.

O foco deste trabalho envolve as adaptações que precedem e iniciam a regeneração da JMT, tanto em um ambiente saudável quanto em um ambiente prejudicado pela atrofia muscular, desse modo, foi avaliada a massa muscular para determinar a efetividade do modelo experimental escolhido para desencadear a atrofia muscular. A imobilização articular por 10 dias resultou na redução da massa muscular em 47% (I_{0h}), que corrobora com os achados de Kim et al. (2018) que descreveram uma extensa diminuição no músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* imobilizados.

A imobilização articular provoca a atrofia muscular por meio da inatividade, uma vez que períodos prolongados de desuso repercutem na perda de massa de grupos musculares isolados, sobretudo músculos inertes na posição encurtada, como é o caso do gastrocnêmio no presente estudo (DEVAL et al., 2020).

No período de retorno da carga mecânica também denominado de remobilização, ocorre o aumento de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias, as quais provocam a disfunção mitocondrial e desencadeia a inflamação, além de regular a autofagia através do sistema ubiquitina-proteassoma até os 7 dias iniciais da remobilização em modelo experimental (SLIMANI et al., 2012; WANG et al., 2023). Em nossos dados, observamos menor massa muscular nos períodos iniciais de remobilização (I_{0h} e I_{24h}) após 10 dias de imobilização, que corroboram com o agravamento da atrofia muscular no período agudo de remobilização.

A via atrófica da ubiquitina-proteassoma é regulada por MURF-1 e Atrogin-1, a qual é responsável pela proteólise exacerbada. Após uma sessão de treinamento moderado, ocorre a diminuição do conteúdo proteico de MURF-1, no entanto, após 6 horas o conteúdo aumenta novamente (KIM; KIM; SONG, 2012; DA MATA et al., 2024). A menor massa do músculo gastrocnêmio no T_{0h} , assim como o aumento progressivo da massa muscular no T_{24h} , T_{4d} e T_{7d} pode ser explicada pela momentânea redução das vias atróficas e aumento nas vias hipertróficas.

Um método geométrico que obtém destaque no âmbito científico é a DF, devido sua eficácia em quantificar a arquitetura de diversos tecidos, visto que permite a mensuração das estruturas de um tecido como um todo. A DF considera a disposição das estruturas, dessa forma através de uma linha de regressão realiza a quantificação da distribuição dos pixels. Um aspecto diferencial que garante a efetividade da DF, é a padronização na mensuração de pontos binarizados, os quais reduzem os erros de quantificação manual (FÁVERO et al., 2019).

A DF expressa suas análises em uma escala de 0 a 2, onde 0 representa um estágio inferior e 2 um estágio superior na complexidade de organização das estruturas analisadas (CURY et al., 2018). A remodelação tecidual é demonstrada por alterações nas estruturas, desse modo adaptações no formato, densidade e disposição podem afetar a arquitetura desse tecido, a qual é representada pela DF.

Na coloração de HE são evidenciados os núcleos, sem distinção de núcleos celulares (fibroblastos e células satélites) (LOURENÇO et al., 2022). Desse modo, a menor complexidade de organização imediatamente após uma sessão de treinamento (T_{0h}) pode indicar a remodelação dinâmica dos núcleos, uma vez que em seguida é observado uma crescente no valor de DF no T_{24h} , T_{4d} e T_{7d} . Nossos achados correlacionam com Von Walden et al. (2020) que descreveram a menor proporção de mionúcleos como resposta aguda ao treinamento resistido, a qual indica a proliferação aguda e infiltração de células mediadas pelo treinamento como responsável pelos níveis aumentados de núcleos (LOURENÇO et al., 2022).

Os mionúcleos possuem papel fundamental na coordenação transcricional, no qual seu posicionamento e disposição está diretamente relacionado com seu desempenho. A localização periférica dos mionúcleos permite o posicionamento estratégico próximo à membrana plasmática e o centro da fibra muscular, facilitando a comunicação e transporte transcricional. De acordo com a teoria do domínio mionuclear, a disposição periférica, especificamente o espaçamento entre eles, prediz a quantidade de citoplasma

amparada funcionalmente por cada mionúcleo (HANSSON et al., 2020; HANSSON; EFTESTØL, 2023)

As condições atroficas promoveram ampla adaptação na disposição mionuclear devido ao agrupamento, uma vez que alguns mionúcleos se aproximam e dão origem a espaçamentos, denominado por Hannson et al., (2020) como lacunas, as quais implicam em grandes volumes citoplasmáticos por núcleo que acometem a atividades transcricional e a síntese proteica, resultando na deterioração fisiológica das fibras musculares por meio da disfunção mionuclear. Especificamente na DF, a menor complexidade de organização observada após a imobilização por 10 dias (I_{0h}), indica a relação com o agrupamento mionuclear que altera a disposição, e sugere o comprometimento da função mionuclear.

O treinamento resistido é utilizado para estabelecer um ambiente favorável para a hipertrofia muscular, no qual, o acréscimo mionuclear é uma das adaptações indispensáveis para o crescimento das fibras musculares. O retorno da carga mecânica imediato por meio de 1 sessão de treinamento resistido resultou no maior valor de DF, que implica na maior organização dos mionúcleos, devido às adaptações que o treinamento resistido provoca na quantidade mionuclear e a expansão de seus domínios (MURACH et al., 2017).

A característica adaptativa do tecido conjuntivo intramuscular é de relevância notável para diversos estudos, devido sua contribuição na comunicação de outras células (células satélites) que fornecem subsídios para a remodelação musculoesquelética (GUMPENBERGER et al., 2020). O treinamento resistido agudo desencadeia a formação de uma matriz de transição a partir de um rápido processo catabólico que precede os processos anabólicos, assim como observamos a menor área de tecido conjuntivo imediatamente após uma sessão de treinamento (T_{0h}), enquanto que, nos demais períodos analisados (T_{24h} , T_{4d} e T_{7d}), houve uma crescente na área de tecido conjuntivo, o que corroboram com a rápida ativação das vias de síntese de colágeno, que ocorrem com o intuito de reforçar a estrutura desse tecido (CSAPO et al., 2020).

Além de sua característica ímpar na remodelação, o tecido conjuntivo possui um arranjo semelhante a uma rede no entorno das fibras musculares, com isso fornece suporte mecânico para outras estruturas, como vasos sanguíneos e nervos (KRITIKAKI et al., 2021). A deposição excessiva e a disposição desorganizada das fibras de colágeno são amplamente relatadas com a atrofia muscular, e as principais consequências que rodeiam essa remodelação é a diminuição do fornecimento sanguíneo a nível capilar e

o aumento da rigidez do tecido muscular (MAYER et al., 2021; LUBIN; ZIDI, 2024). Desse modo, o aumento na área positiva de tecido conjuntivo após 10 dias de imobilização articular (I_{0h}) reflete negativamente na integridade do suprimento sanguíneo e nas propriedades contráteis do músculo gastrocnêmio.

A composição do tecido conjuntivo intramuscular frente a imobilização retrata a remodelação negativa nesse tecido, uma vez que a imobilização intensifica a síntese e disposição irregular do colágeno tipo I e III, responsáveis pela formação de fibrilas de colágeno, além de reduzir a síntese do colágeno tipo V, o qual atua como principal componente da membrana basal, juntos essas adaptações repercutem na rigidez e vulnerabilidade desse tecido (KRITIKAKI et al., 2021; MAVROPALIAS et al., 2023; HOLWERDA et al., 2024). Dessa forma, a exacerbada presença de tecido conjuntivo observada com a imobilização (I_{0h}) denotam um tecido fragilizado, que acometem a qualidade estrutural e funcional do tecido muscular como um todo.

Contrapondo a expectativa de inúmeras pesquisas, a interrupção dos estímulos atroficos não atenua remodelação perturbada dos componentes do tecido conjuntivo muscular, visto que é relatado o processo contínuo de síntese e desorganização das fibras colágenas (MAVROPALIAS et al., 2022). Esses dados corroboram com nossos achados, no qual 24 horas após o término do protocolo de atrofia (IL_{24h}), ocorre o aumento acentuado da área de tecido conjuntivo em relação ao período imediato que foi retirado o dispositivo de imobilização, e consequentemente prediz da fragilidade desse tecido no período agudo de remobilização.

O treinamento resistido desencadeia rapidamente (1 - 6 horas) alterações nos níveis de expressão dos genes envolvidos (MMP3, MMP15 e TIMP1), e com isso contribui para a renovação da estrutura, composição dos componentes do tecido conjuntivo intramuscular (GUMPENBERGER et al., 2020). A interrupção do processo deletério que resulta na rigidez muscular após o treinamento, repercute positivamente no ponto de vista funcional do músculo estriado esquelético, visto que a rigidez do tecido não-contrátil prejudica a expansão radial das fibras musculares, e consequentemente afeta o encurtamento durante a contração concêntrica do treinamento resistido (AZIZI et al., 2017). Dessa forma, a menor área positiva de colágeno do Grupo IT_{0h} e IT_{24h} em comparação com o Grupo I indicam a efetividade do treinamento resistido em inibir a progressão das alterações que resultam na fragilidade estrutural e funcional do tecido conjuntivo intramuscular.

O protocolo de treinamento utilizado foi o treinamento resistido realizado com auxílio de uma escada vertical, escolhido a partir dos princípios de: reprodutibilidade, protocolo experimental semelhante aos protocolos de intervenção para atrofia muscular em humanos; técnica do movimento, contrações concêntricas e excêntricas; resultado, protocolo com efeito crônico de hipertrofia muscular comprovado na literatura. Entretanto, em nosso estudo, o treinamento foi implementado sem carga adicional à massa corporal, assim como foram analisadas as repercussões agudas. Diante disso, as alterações inexpressivas estatisticamente observadas no Grupo T_{0h}, T_{24h}, T_{4d} e T_{7d} indica o desenvolvimento inicial da hipertrofia muscular que manifesta adaptações acentuadas a partir de 2-3 semanas de treinamento (COUNTS et al., 2017).

A carga mecânica provocada pela contração muscular resulta na ativação de vias que repercutem em diversas sinalizações que inibem as vias catabólicas e regulam a biogênese e renovação mitocondrial, o redox extracelular que consequentemente reduz a produção de espécies reativas de oxigênio e regula positivamente as enzimas antioxidantes. Em contrapartida, a descarga mecânica, a imobilização implica em um estado homeostático perturbado devido à fissão da membrana mitocondrial, hiperativação das vias do sistema ubiquitina-proteassoma, e hiperativação de outras vias que resultam no aumento das espécies reativas de oxigênio, além da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, que implicam no estresse oxidativo (JI; YEO, 2019).

A literatura dispõe de inúmeras pesquisas que retratam o diâmetro reduzido como um sinal clássico da descarga mecânica, com diferenças na intensidade das estruturas afetadas (CAÇÃO-BENEDINI et al., 2014; DEVAL et al., 2020; HONDA et al., 2022; HOLWERDA et al., 2024). No presente estudo, a imobilização articular repercute na acentuada redução da AST nas fibras musculares tipo I e II (I0h), que corroboram com os achados de outros estudos que relataram a atrofia muscular provocada pela suspensão de membros inferiores, imobilização por gesso e caquexia (WU et al., 2022; WYART et al., 2020; KUMAR et al., 2023). A menor área transversal das fibras musculares implica diretamente na produção de força, desse modo, nossos achados predizem a redução da força muscular de ratos Wistar imobilizados por 10 dias (I0h).

Entretanto, a interrupção da ausência de carga não é acompanhada pela ausência da continuidade na redução transversal das fibras musculares, assim como foi observado em nosso estudo, no qual as fibras musculares tipo I e II, demonstraram notável redução da AST após 24 horas com livre movimentação do membro pélvico anteriormente imobilizado.

Do ponto de vista morfológico, a composição da fibra muscular pode ser compreendida em fração miofibrilar e proteica. A fração miofibrilar corresponde a maior parte da fibra, formada por inúmeras proteínas miofibrilares (miosina, actina, troponina, alfa-actina, miopaladina, titina, nebulina, entre outras). Enquanto a fração sarcoplasmática é constituída pelo sarcoplasma, organelas, componentes celulares (mitocôndrias e retículo sarcoplasmático), macromoléculas (ribossomos, glicogênio e gotículas lipídicas) e enzimas (ROBERTS et al., 2020). Diante disso, o músculo estriado esquelético pode apresentar dois tipos de hipertrofia: a miofibrilar, crescimento radial por meio do acréscimo proporcional de proteínas e espaço sarcoplasmático; e a sarcoplasmática, expansão do conteúdo sarcoplasmático acompanhado do aumento no volume de organelas dispostas no sarcoplasma (VAN et al., 2022).

A hipertrofia sarcoplasmática é descrita como uma etapa que precede a hipertrofia miofibrilar, e com isso, é estabelecida como um processo transitório, que indica o início da remodelação do tecido muscular em direção ao crescimento radial e sarcomérico das fibras musculares (HAUN et al., 2019; ROBERTS et al., 2020). A partir disso, postulamos que o aumento inicial das fibras tipo I e II pelo treinamento resistido após a atrofia muscular (IT_{0h} e IT_{24h}), decorre da expansão dos componentes não-miofibrilares. Nossos achados são sustentados por Burd et al. (2010) que descreveram o treinamento resistido como estimulador da síntese de proteínas sarcoplasmáticas após 4 e 24 horas da sessão.

A JMT é uma região de interface que obtém destaque devido a remodelação estrutural diante de diferentes estímulos, como: patologias, diferentes modalidades de treinamento, envelhecimento, e sobretudo o desuso causado pela imobilização (CURZI et al., 2016; PIMENTEL NETO et al., 2020; ROCHA et al., 2020; GRILLO et al., 2021; MARTINEZ et al., 2021). A notável característica adaptativa dessa região comprovam a especialização de suas remodelações para manter sua função preponderante, com isso a JMT obtém destaque diante dos componentes do aparelho locomotor, e consequentemente elucidar a coordenação de elementos celulares envolvidos se torna indispensável (JACOB et al., 2019).

Adjacentes a região miotendínea, diversos elementos celulares são descritos após a intervenção de protocolo experimentais em período crônico, como os núcleos. De acordo com sua localização ao longo da fibra muscular, os núcleos se especializam nos sinais originários do seu posicionamento, e consequentemente expressam atividades transcricionais específicas para fornecer suporte às necessidades de cada região. Diante

desses aspectos, a alta densidade nuclear observada no Grupo T_{0h} e T_{24h} predizem o processo inicial de adaptações provocadas pelo treinamento resistido.

No músculo estriado esquelético, a atrofia muscular repercute no desequilíbrio da renovação proteica e mionuclear, que resulta no acréscimo mionuclear prejudicado e consequentemente, implica na perda de mionúcleos. No entanto, nossos resultados demonstraram maior densidade nuclear na JMT (IL_{24h}, IL_{4d} e IL_{7d}), que sugere a atividade nuclear diferenciada nessa região (WEBSTER et al., 2020). Esses achados se correlacionam com Williams et al. (2022) que descreveram os núcleos presentes na JMT como transcricionalmente distintos.

Em contrapartida, a intervenção do treinamento após a imobilização articular demonstra ligeiro aumento na densidade mionuclear a partir da 3ª sessão de treinamento. Nossos achados podem ser compreendidos como a especificidade nuclear, visto que outro estudo relatou dois subtipos de núcleos na JMT com distintos genes expressos, no qual demonstram diferentes comportamentos (aglomerados vs distanciamento) e especificidade de acordo com ambiente regenerativo ou conturbado (KIM et al., 2018b).

Recentemente, Pimentel Neto et al., (2020) descreveram a presença dos telócitos da JMT em condições normais e após o modelo experimental de treinamento resistido, no qual seu posicionamento na JMT adjacente às células satélites sugerem a contribuição dos telócitos na regeneração muscular. O delineamento experimental do presente estudo focou no período agudo de remodelação, dessa forma, apesar de prevista a presença de telócitos na interface miotendínea, foram observadas alterações nos telócitos a partir da 1ª sessão de treinamento.

As extensões do corpo celular dos telócitos, os telópodos, conectam entre si e com outras células próximas que permitem a conexão celular e com isso, constroem uma rede intersticial tridimensional (MANETTI et al., 2019). Esses achados se correlacionam com nossos resultados, visto que os telócitos demonstraram alinhamento ao longo da interface miotendínea em todos os Grupos Experimentais, que indica o auxílio dos telócitos na estabilização estrutural da JMT.

O papel dos telócitos nos processos regenerativos tem sido proposto devido sua proximidade com terminações nervosas, vasos sanguíneos, células satélites e miofibras em remodelação (MANETTI et al., 2019; POPESCU et al., 2011; SANCHES et al., 2024). Especificamente na JMT, os telócitos são descritos próximos às células satélites, mitocôndrias e vesículas extracelulares que predizem a atividade parácrina para regular

a remodelação nessa região (PIMENTEL NETO et al., 2020; PIMENTEL NETO et al., 2024). A correlação entre telócitos e células satélites se correlaciona com nossos achados, que demonstraram a proximidade entre essas células em todos os Grupos Experimentais positivos para Pax7.

As células precursoras miogênicas, comumente denominadas de células satélites, permanecem em estado quiescente e expressam Pax7, no entanto, em situações de dano tecidual são ativadas, passam pela proliferação e fusão com o intuito de isso promover a regeneração desse tecido (BELLAMY et al., 2014; BAZGIR et al., 2016). No presente estudo a imunomarcagem das células satélites na JMT foi realizada no estado quiescente (Pax7), no qual foi observada o acompanhamento no aumento do número de telócitos e aumento em células satélites em todos os Grupos Experimentais, com maior 24 horas após o treinamento ou livre movimentação. Estes achados reforçam a possível contribuição do telócito na regeneração da JMT.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que o músculo estriado esquelético apresenta remodelação estrutural deletéria após a imobilização por 10 dias, enquanto a intervenção aguda do treinamento em escada vertical promoveu repercussões distintas em suas estruturas, no qual as adaptações dos núcleos, tecido conjuntivo intramuscular e fibras musculares demonstram a especificidade adaptativa em promover o suporte funcional e estrutural que precede a regeneração muscular. Em destaque, o treinamento demonstrou sua importância no período imediato da remobilização, ao inibir a extensa progressão dos efeitos atroficos. Enquanto que na JMT, demonstramos a especificidade da região devido às adaptações agudas provocadas pelo treinamento, as quais indicam o desenvolvimento de uma regeneração estrutural em direção ao retorno do estado saudável. Além disso, reforçamos a especificidade transcricional dos núcleos na JMT e a contribuição dos telócitos no início dos processos regenerativos, devido à identificação de telócitos e sua proximidade às células satélites na JMT no período agudo de remodelação.

REFERÊNCIAS

- AZIZI, E. et al. Resistance to radial expansion limits muscle strain and work. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 16, n. 5, p. 1633–1643, 2017.
- BAZGIR, B. et al. Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. **Cell Journal**, v. 18, n. 4, p. 473–484, 2016.
- BELLAMY, L. M. et al. The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- BHUTDA, S. et al. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. **Bio-protocol**, v. 7, n. 21, 2017.
- BODINE, S. C. The role of mTORC1 in the regulation of skeletal muscle mass. **Faculty Reviews**, v. 11, n. 32, 2022.
- BROOKS, N. E.; MYBURGH, K. H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: The response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. **Frontiers in Physiology**, v.5, n. 99, 2014.
- CAÇÃO-BENEDINI, L. O. et al. Immobilization and therapeutic passive stretching generate thickening and increase the expression of laminin and dystrophin in skeletal muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 6, p. 483–491, 2014.
- 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.
- 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.
- CIENA, A. P. et al. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastric muscle and intermediate tendon in adults rats. **Micron**, v. 43, n. 2, p. 258–262, 2012.
- COLLINS, B. C.; KARDON, G. It takes all kinds: Heterogeneity among satellite cells and fibro-adipogenic progenitors during skeletal muscle regeneration. **Development**, v. 148, n. 21, 2021.
- COUNTS, B. R. et al. Muscle growth: To infinity and beyond?. **Muscle & nerve**, v. 56, n. 6, p. 1022-1030, 2017.
- COUTINHO, E. L. et al. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1329-1332, 2002.
- CSAPO, R.; GUMPENBERGER, M.; WESSNER, B. Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological

Roles? A Narrative Review. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. 253, 2020.

CURY, S. S. et al. 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. et al. Morphological changes of myotendinous junction generated by muscle disuse atrophy. **Microscopie**, p. 46–52, 2013.

CURZI, D. et al. Effect of different exercise intensities on the myotendinous junction plasticity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.

DA MATA, G. E. et al. Acute exercise modulates Trim63 and Bmal1 in the skeletal muscle of IL-10 knockout mice. **Cytokine**, v. 175, 2024.

DEVAL, C. et al. Mitophagy and mitochondria biogenesis are differentially induced in rat skeletal muscles during immobilization and/or remobilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, 2020.

FAN, Z.; XIAO, Q. Impaired autophagic flux contributes to muscle atrophy in obesity by affecting muscle degradation and regeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 525, n. 2, p. 462–468, 2020.

FARENIA, R. et al. Changes in biomarker levels and myofiber constitution in rat soleus muscle at different exercise intensities. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 458, n. 1–2, p. 79–87, 2019.

FÁVERO, P. F. et al. Differential fractal dimension is associated with extracellular matrix remodeling in developing bovine corpus luteum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 516, n. 3, p. 888–893, 2019.

FERRAZ, F. B.; FERNANDEZ, J. H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudo clínicos. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 9, n. 2, p. 25–34, 2014.

FURLANETTO, R. et al. Acute resistance exercise reduces increased gene expression in muscle atrophy of ovariectomised arthritic rats. **Menopause Review**, v. 15, n. 4, p. 193–201, 2016.

FURRER, R. et al. Molecular control of endurance training adaptation in male mouse skeletal muscle. **Nature Metabolism**, v. 5, n. 11, p. 2020–2035, 2023.

GARCIA, T. A. et al. Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. **Tissue and cell**, v. 54, p. 120–126, 2018.

GRILLO, B. A. C. et al. Myotendinous Junction Components of Different Skeletal Muscles Present Morphological Changes in Obese Rats. **Microscopy and Microanalysis**, v. 27, n. 3, p. 598–603, 2021.

GUMPENBERGER, M. et al. Remodeling the skeletal muscle extracellular matrix in older age effects of acute exercise stimuli on gene expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–17, 2020.

HANSSON, K. A. et al. Computational Assessment of Transport Distances in Living Skeletal Muscle Fibers Studied In Situ. **Biophysical Journal**, v. 119, n. 11, p. 2166–2178, 1 dez. 2020.

HANSSON, K. A.; EFTESTØL, E. Scaling of nuclear numbers and their spatial arrangement in skeletal muscle cell size regulation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 34, n. 8, 2023.

HAUN, C. T. et al. Muscle fiber hypertrophy in response to 6 weeks of high-volume resistance training in trained young men is largely attributed to sarcoplasmic hypertrophy. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, 2019.

HENRIQUEZ-OLGUIN, C.; MENESES-VALDES, R.; JENSEN, T. E. Compartmentalized muscle redox signals controlling exercise metabolism – Current state, future challenges. **Redox Biology**, v. 35, p. 101473, 2020.

HOLWERDA, A. M. et al. One Week of Single-Leg Immobilization Lowers Muscle Connective Protein Synthesis Rates in Healthy, Young Adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 56, n. 4, p. 612–622, 2024.

HONDA, Y. et al. Muscle contractile exercise through a belt electrode device prevents myofiber atrophy, muscle contracture, and muscular pain in immobilized rat gastrocnemius muscle. **PLoS ONE**, v. 17, n. 9, 2022.

IDE, B. N. Hipertrofia muscular esquelética humana induzida pelo exercício físico. **Revista Ciências em Saúde**, v. 1, n. 2, 2014.

JACOB, C. DOS S. et al. 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.

JACOBSON, K. R. et al. Comparative analysis of the extracellular matrix proteome across the myotendinous junction. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 10, p. 3955–3967, 2020.

Jl, L. L.; YEO, D. Mitochondrial dysregulation and muscle disuse atrophy. **F1000Research**, v. 8, 2019.

KARLSEN, A. et al. The proteomic profile of the human myotendinous junction. **iScience**, v. 25, n. 2, 2022.

KARPERIEN, A. et al. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. **Clinical Ophthalmology**, v. 2, n. 1, p. 109-122, 2008.

KIM, J. C. et al. Concurrent treatment with ursolic acid and low-intensity treadmill exercise improves muscle atrophy and related outcomes in rats. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 427–436, 2018a.

KIM, N. et al. Role of dihydrotestosterone in whole-body energy utilization during acute running exercise in mice. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 7–11, 2018b.

- KIM, Y. A.; KIM, Y. S.; SONG, W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 229–235, 2012.
- KNUDSEN, A. B. et al. 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.
- KRAUSE NETO, W. et al. Aging induces changes in the somatic nerve and postsynaptic component without any alterations in skeletal muscles morphology and capacity to carry load of wistar rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 688, 2017.
- KRAUSE NETO, W. et al. 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, 2 jan. 2018.
- KRITIKAKI, E. et al. Exercise training-induced extracellular matrix protein adaptation in locomotor muscles: A systematic review. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1022, 2021.
- KUMAR, A. et al. Atenolol Ameliorates Skeletal Muscle Atrophy and Oxidative Stress Induced by Cast Immobilization in Rats. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, 2023.
- KUNZ, R. I. et al. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. **Publication UEPG: Ciencias Biologicas e da Saude**, v. 19, n. 2, p. 123–129, 2013.
- LIM, J. P. et al. Inter-muscular adipose tissue is associated with adipose tissue inflammation and poorer functional performance in central adiposity. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 81, p. 1–7, 2019.
- LOURENÇO, Í. et al. Previous short-term use of testosterone propionate enhances muscle hypertrophy in Wistar rats submitted to ladder-based resistance training. **Tissue and Cell**, v. 75, 2022.
- LUBIN, P.; ZIDI, M. Mechanical properties change of immobilized skeletal muscle in short position measured by shear wave elastography and pure shearing test. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 150, 2024.
- MANETTI, M. et al. Morphological evidence for telocytes as stromal cells supporting satellite cell activation in eccentric contraction-induced skeletal muscle injury. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- MARTINEZ, G. Z. et al. Morphological Changes in the Myotendinous Junction of mdx Mice. **Microscopy and Microanalysis**, v. 27, n. 5, p. 1290–1294, 2021.
- MARZETTI, E. et al. Physical activity and exercise as countermeasures to physical frailty and sarcopenia. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. 1, p. 35–42, 2017.
- MAVROPALIAS, G. et al. Exercise builds the scaffold of life: muscle extracellular matrix biomarker responses to physical activity, inactivity, and aging. **Biological Reviews**, v. 98, n. 2, p. 481–519, 2023.

MAYER, W. P. et al. Consequences of ankle joint immobilisation: insights from a morphometric analysis about fibre typification, intramuscular connective tissue, and muscle spindle in rats. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 156, n. 6, p. 583–594, 1 dez. 2021.

MEO, S. DI; IOSSA, S.; VENDITTI, P. Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 3, p. R159–R181, 2017.

MIKKELSEN, U. R. et al. Skeletal muscle morphology and regulatory signalling in endurance-trained and sedentary individuals: The influence of ageing. **Experimental Gerontology**, v. 93, p. 54–67, 1 jul. 2017.

MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v.12, n. 1, 2020.

MURACH, K. A. et al. Differential requirement for satellite cells during overload-induced muscle hypertrophy in growing versus mature mice. **Skeletal Muscle**, v. 7, n. 1, 2017.

MURACH, K. A. et al. Myonuclear domain flexibility challenges rigid assumptions on satellite cell contribution to skeletal muscle fiber hypertrophy. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1–7, 2018.

PALMA, L. D. et al. 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.

PIMENTEL NETO, J. et al. Myotendinous junction adaptations to ladder - based resistance training : identification of a new telocyte niche. **Scientific Reports**, n. 0123456789, p. 1–8, 2020.

PIMENTEL NETO, J. et al. The telocytes relationship with satellite cells: Extracellular vesicles mediate the myotendinous junction remodeling. **Microscopy Research and Technique**, v. 10, n. 1, 2024.

POPESCU, L. M. et al. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: Implication for muscle regeneration. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 6, p. 1379–1392, 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.

QUARTA, M. et al. Bioengineered constructs combined with exercise enhance stem cell-mediated treatment of volumetric muscle loss. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

ROBERTS, M. D. et al. Sarcoplasmic Hypertrophy in Skeletal Muscle: A Scientific “Unicorn” or Resistance Training Adaptation? **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

ROCHA, L. C. et al. Repercussions on sarcomeres of the myotendinous junction and the myofibrillar type adaptations in response to different trainings on vertical ladder. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 10, p. 1190–1197, 2020a.

ROCHA, L. C. et al. Repercussions on sarcomeres of the myotendinous junction and the myofibrillar type adaptations in response to different trainings on vertical ladder. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 10, p. 1190–1197, 2020b.

ROCHA, L. C. et al. Remodeling of the skeletal muscle and postsynaptic component after short-term joint immobilization and aquatic training. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 6, p. 621–628, 1 dez. 2020c.

ROMAN, W.; GOMES, E. R. Nuclear positioning in skeletal muscle. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 82, p. 51–56, 2018.

SANCHES, B. D. A. et al. Telocytes: current methods of research, challenges and future perspectives. **Cell and Tissue Research**, v. 396, n. 2, 1 maio 2024.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in Mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SHARLO, K. et al. Effects of Various Muscle Disuse States and Countermeasures on Muscle Molecular Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, 2021.

SIERRA, L. R. et al. 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. et al. 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. et al. The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 11, p. 1335–1347, 2012.

TEIXEIRA, C. E.; DUARTE, J. A. Myonuclear domain in skeletal muscle fibers. A critical review. **Archives of Exercise in Health and Disease**, v. 2, n. 2, 2011.

TIDBALL, J. G. Myotendinous junction: Morphological changes and mechanical failure associated with muscle cell atrophy. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 40, n. 1, p. 1–12, 1984.

TONG, S. et al. A Comprehensive Review of Muscle–Tendon Junction: Structure, Function, Injury and Repair. **Biomedicines**, v. 12, n. 2, 2024.

VIGGARS, M. R. et al. Automated cross-sectional analysis of trained, severely atrophied and recovering rat skeletal muscles 1 using MyoVision 2.0 2. **Journal of Applied Physiology**, v. 132, n. 3, p. 593–610, 2022.

VON WALDEN, F. et al. The myonuclear DNA methylome in response to an acute hypertrophic stimulus. **Epigenetics**, v. 15, n. 11, p. 1151–1162, 2020.

WANG, F. et al. The worsening of skeletal muscle atrophy induced by immobilization at the early stage of remobilization correlates with BNIP3-dependent mitophagy. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 24, n. 1, 2023.

WEBSTER, J. M. et al. **Inflammation and Skeletal Muscle Wasting During Cachexia. Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

WILBURN, D. et al. Shared and distinct mechanisms of skeletal muscle atrophy: A narrative review. **Ageing Research Reviews**, v. 71, p. 101463, 2021.

WOSCZYNA, M. N.; RANDO, T. A. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. **Developmental Cell**, v. 46, n. 2, p. 135-143, 2018.

WU, Y. F. et al. Optimization of a pericyte therapy to improve muscle recovery after limb immobilization. **Journal of Applied Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1020–1030, 1 abr. 2022.

WYART, E. et al. Cachexia, a systemic disease beyond muscle atrophy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8592, 2020.

YAMAMOTO, Y. et al. Regeneration process of myotendinous junction injury induced by collagenase injection between Achilles tendon and soleus muscle in mice. **Anatomical Science International**, v. 99, n. 1, p. 138–145, 2024.

YAN, R. et al. Discovery of Muscle-Tendon Progenitor Subpopulation in Human Myotendinous Junction at Single-Cell Resolution. **Research**, v. 2022, jan. 2022.

YIN, L. et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. **Pharmacological research**, v. 172, p. 105807, 2021.

YOSEPH, B.; SOKER, S. Redefining the satellite cell as the motor of skeletal muscle regeneration. v. 03, n. 05, p. 76–82, 2015.

YOSHIHARA, T. et al. Effect of a combination of astaxanthin supplementation, heat stress, and intermittent reloading on satellite cells during disuse muscle atrophy. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 19, n. 11, p. 844–852, 2018.

YUAN, C. et al. Potential cross-talk between muscle and tendon in Duchenne muscular dystrophy. **Connective Tissue Research**, v. 62, n. 1, p. 1–13, 2021.