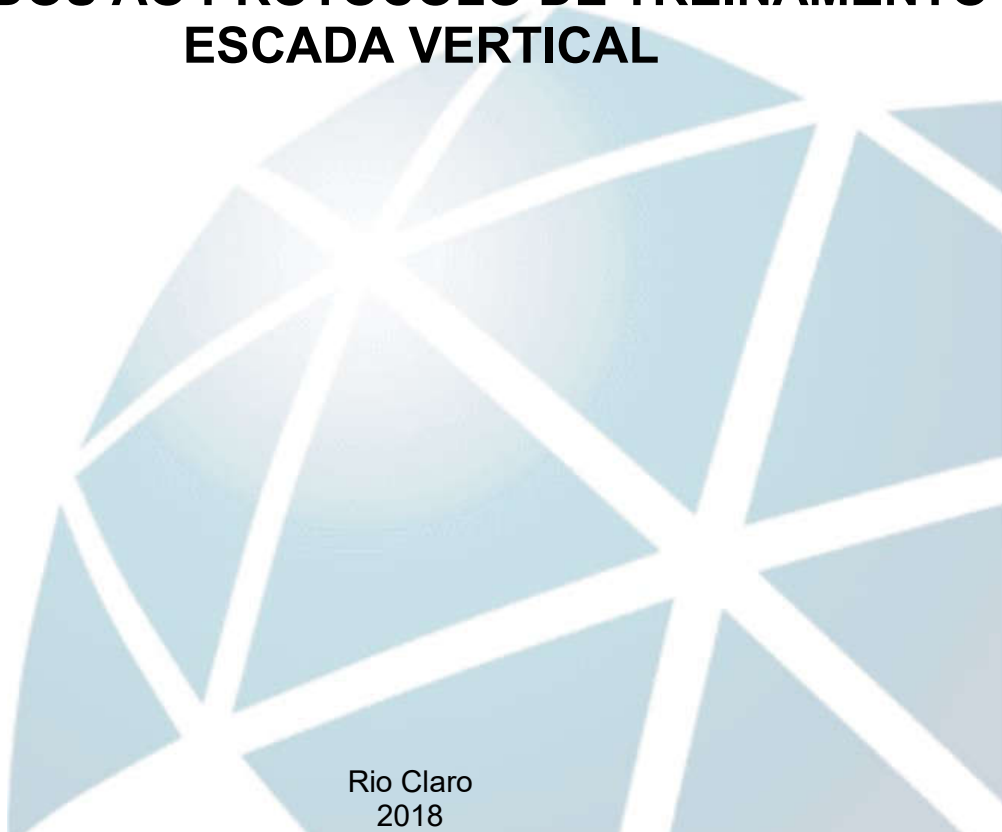

EDUCAÇÃO FÍSICA

Jossei Soares de Sant' Ana

**ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS NA JUNÇÃO
MIOTENDÍNEA DO SÓLEO DE RATOS WISTAR ADULTOS
SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE TREINAMENTO EM
ESCADA VERTICAL**



Rio Claro
2018

Jossei Soares de Sant' Ana

ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DO
SÓLEO DE RATOS WISTAR ADULTOS SUBMETIDOS AO
PROTOCOLO DE TREINAMENTO EM ESCADA VERTICAL

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para
obtenção do grau de Bacharel em Educação
Física.

Rio Claro
2018

A532a Ana, Jossei Soares de Sant'
ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DO
SÓLEO DE RATOS WISTAR ADULTOS SUBMETIDOS AO
PROTOCOLO DE TREINAMENTO EM ESCADA VERTICAL / Jossei
Soares de Sant' Ana. -- Rio Claro, 2018
42 p. + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Educação Física) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio
Claro

Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Junção Miotendínea. 2. Treinamento Resistido. 3. Sóleo. 4.
Escalada. 5. Morfologia. I. Título.

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

Dedico este trabalho aos meus ancestrais africanos e baianos e para aqueles que me apoiam e estão ao meu lado, ontem, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que me abençoou com a oportunidade de realizar uma graduação pública de qualidade e me deu forças e capacidade para transpor os obstáculos e atingir os objetivos durante estes quatro anos.

Agradeço a minha mãe, meu alicerce pessoal e em quem deposito toda minha confiança. Quero trilhar meus caminhos para alegrá-la com forma de pagar minha dívida eterna, com toda minha fé, paixão, determinação, responsabilidade, lealdade e respeito. Eu te amo muito Sonia Maria de Oliveira Soares.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Adriano Polican Ciena e a todos os integrantes do LAMAF, especialmente Jurandyr Pimentel Neto, meu grande e querido amigo, por todas as horas de trabalho e diversão que passamos juntos, muito obrigado irmão.

E a todos aqueles que fizeram parte da minha construção pessoal como ser humano; minha namorada, amigos e professores, estes são peças fundamentais para qualquer estudante e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro e o Instituto de Biociências por todo trabalho e suporte prestado durante este período.

A todos os professores do Departamento de Educação Física os quais tenho grande carinho e respeito.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Biociências e do Departamento de Educação Física, especialmente aos técnicos do Laboratório de Morfologia, José Roberto Rodrigues da Silva e Eduardo Custódio por todo trabalho e empenho.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a comunidade que fez parte da construção do conhecimento, mostrando que este deve ter livre acesso, através dos projetos de extensão universitária com idosos e crianças, festivais realizados em disciplinas e todas as atividades que agregam valores ao graduando por meio da participação da população.

RESUMO

A junção miotendínea (JMT) é a área de transmissão de força do tecido muscular estriado esquelético para o tecido ósseo, por meio dos tendões, esta região associada a exercícios físicos acomete alterações morfológicas no tecido conjuntivo e muscular, além de apresentar menor índice de lesões desportivas. O objetivo do presente estudo consistiu em analisar as características morfológicas da junção miotendínea do sóleo de ratos Wistar adultos submetidos ao protocolo de exercício físico resistido em escada vertical. Foram utilizados 30 ratos com 90 dias de idade divididos aleatoriamente em três grupos, (n=10): Grupo Sedentário (S); Grupo Treinado (T) e Grupo Treinado/Sobrecarga (TS). Através das técnicas: microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, de maneira a evidenciar, características estruturais morfológicas, aspectos tridimensionais dos elementos estruturais e ultraestruturais e morfoquantitativos. A partir destas técnicas e das mensurações realizadas durante o período de treinamento, obtivemos resultados positivos correlacionando média de massa corpórea e aspecto dos treinamentos experimentais. Observamos no Grupo S características teciduais, estruturais e ultraestruturais da JMT, com tecido conjuntivo pouco desenvolvido e poucos núcleos dos tenócitos próximos a interface, e também invaginações sarcoplasmáticas pouco ramificadas. No Grupo T descrevemos aumento de densidade nas células presentes na interação músculo-tendão, principalmente no tecido conjuntivo com a presença de fibras colágeno mais delgadas e melhor organizadas. Com relação ao Grupo TS a atividade celular gradativamente maior pode ser notada, observamos um aumento na incidência dos núcleos dos tenócitos alinhados próximos e perifericamente ao tecido muscular, que teve ganho de magnitude longitudinalmente em suas fibras. Além de uma síntese celular proveniente especificamente do modelo experimental de hipertrofia observada ultraestuturalmente na JMT. Portanto este trabalho contribuiu para revelar as características da junção miotendínea quando induzida a exercícios físicos e exercícios físicos resistidos, demonstrando a existência de especificidade no treinamento a nível celular.

Palavras Chave: Junção Miotendínea, Sóleo, Escalada, Hipertrofia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia de Luz.	28
Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura.	29
Figura 3. Microscopia Eletrônica de Transmissão.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa Corpórea dos Grupos Experimentais.....	25
Tabela 2. Massa Muscular do Sóleo.	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Massa Corpórea dos Animais Entre Cada Período.	26
Gráfico 2. Teste de Capacidade de Carga Máxima Carregada.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Tecido Muscular	11
1.2 Tecido Conjuntivo	13
1.3 Junção Miotendínea	14
1.4 Atividade Física e Exercício Físico	16
2. OBJETIVO GERAL	18
2.1 Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Mensuração da Massa Corpórea e Massa Muscular	19
3.2.1 Massa Corpórea	19
3.2.2 Massa Muscular	20
3.3 Protocolo de Treinamento	20
3.3.1 Escada Vertical	20
3.3.2 Adaptação ao Treinamento	20
3.3.3 Teste de Capacidade de Carga Máxima Carregada	21
3.3.4 Treinamento Experimental	21
3.4 Microscopia de Luz	22
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	22
3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Massa Corpórea	25
4.2 Massa Muscular – Sóleo	26
4.3 Análise do Teste de Capacidade de Carga Máxima Carregada	26
4.4 Microscopia de Luz	27
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	28
4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão	29
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	41

ANEXO B – MENÇÃO HONROSA.....	42
--------------------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido Muscular

O tecido muscular esquelético dos vertebrados tem sua origem nas células mesodérmicas paraxial e ao iniciar o processo de desenvolvimento através da formação dos mioblastos, existe após oito meses de vida embrionária a concentração de miotubos, consequentemente ocorre o surgimento das miofibrilas, um tecido composto por células multinucleadas e capazes de sintetizar um grande número de proteínas contráteis que desempenham funções para apoiar nos tensionamentos musculares (RIGORD, 2009; MINGUETTI, 1986).

O músculo estriado esquelético compõe cerca de 30-50% de toda a massa corpórea do ser humano e é o mais abundante na maioria dos mamíferos. Em diferentes estágios de vida podem existir formas de uma célula muscular se desenvolver, e pode ser por meio da hipertrofia, um aumento na magnitude das fibras musculares, e por hiperplasia, uma síntese de novas células. Outra capacidade do tecido muscular é a regeneração, através das células satélites que após serem ativadas, vão diferenciar-se para fundir e formar células responsáveis em restaurar o músculo (ROWLERSON, 2001; GONZALEZ-FREIRE, 2016; LE MOAL, 2017).

Através de tecido conjuntivo as fibras musculares estão agrupadas em três diferentes níveis de bainha, o endomísio componente básico que envolve cada miofibrila. Para envolver um conjunto de miofibrilas, os caracterizados fascículos, a estrutura responsável é o perimísio e por fim, o epimísio, com uma bainha mais forte e resistente necessária para agrupar todos os fascículos, consequentemente todo o ventre muscular (JARVINEN, 2005).

A força de contração do tecido muscular é regulada através de uma subunidade presente nos miofilamentos, os chamados sarcômeros, estes são delimitados pela Linha Z e contém ultraestruturas responsáveis pelo encurtamento das fibras musculares, que ocorre por conta das proteínas contráteis, actina e miosina, presentes nas bandas A e bandas I respectivamente. Por conta desta estrutura altamente ordenada é possível gerar força e movimentos rápidos, duas especificidades dos músculos (CRAIG; PADRÓN, 2004).

A contração muscular é uma função músculo esquelética que depende dos filamentos de actina e miosina desempenhando uma hidrólise de ATP que transforma a energia química em energia mecânica. Além disso, os filamentos dos sarcômeros necessitam de um preciso alinhamento dos arranjos que compõem e ativam estas duas proteínas, as chamadas proteínas acessórias, como por exemplo; tropomiosina e troponinas, proteínas associadas nos filamentos de actina que em conjunto com as cabeças de miosina formam as pontes cruzadas, α -actinina encontrada principalmente na Linha Z, miomesina e proteína-M, responsáveis por conectar titina e miosina, a titina tem papel fundamental como proteína presente paralelamente aos filamentos de miofibrilas (TAJSHARGHI, 2009; CLARK, 2002).

Um organismo que interfere principalmente na contração voluntária é a unidade motora. Composta por um neurônio que contém sua parte terminal ramificada, este inerva-se nas fibras musculares para realizar a contração por meio de um estímulo químico. Para cada músculo existe uma relação entre neurônios e fibras musculares, ou seja, quanto maior a precisão de movimento que o músculo necessita, menor o número de fibras inervadas por um neurônio (ROSS; PAWLINA, 2008; KRAUSE, 2015).

Outra característica a ser ressaltada sobre o tecido muscular são suas predominâncias de tipos de fibras, que variam de acordo com a análise feita, e só podem ser classificadas a partir da demonstração do método em específico, mesmo que haja uma correlação entre as tipificações e suas diferentes terminologias. Para realizar a classificação de uma fibra oxidativa e glicolítica é necessária uma reação metabólica com a enzima succinato de hidrogenase e a partir do método histoquímico, pode-se classificar as fibras de tipo I, tipo II e seus subtipos, com a afinidade ácida e básica dos pH's, respectivamente. Através do método bioquímico é possível correlacionar em sua maioria fibras de contração lenta e oxidativa a fibras do tipo I, entretanto nem sempre fibras de contração rápida glicolíticas são fibras do tipo IIb e fibras de contração rápida e oxidativas-glicolíticas são tipo IIa (MINAMOTO, 2005).

O músculo sóleo está presente no interior da fáscia na região posterior da perna e apresenta aponeurose medial e lateral, decorrentes da parede anterior de seu epimísio que está direcionado distalmente no tecido muscular, ainda na parte central deste músculo esquelético apresenta-se um tendão intramuscular que é responsável para a formação do tendão do calcâneo (PADRET, 2015).

1.2 Tecido Conjuntivo

Classificado como tecido conjuntivo propriamente dito denso modelado, os tendões são compostos por moléculas de tropocolágeno que em agrupamento formam as fibrilas e consequentemente as fibras colágenas. Cada molécula de colágeno é constituída por três tipos de polipeptídios nomeados por cadeias α (alfa) que agrupadas resultam em uma hélice tríplice com aproximadamente 300 nm de comprimento e 1.5 nm de diâmetro. É importante destacar que o tecido conjuntivo está presente em diversos lugares do nosso organismo, como por exemplo, tecidos cartilaginosos, na córnea dos olhos, nas paredes arteriais, pele e tendões principalmente, que apresentam definições de acordo com sua posição anatômica ao longo de todo o corpo e modulações de suas propriedades morfológicas, moleculares e mecânicas de acordo com a especialização do tecido (GARTNER; HIATT, 2014; KADLER, 1996; BIRCH, 2007).

A matriz extracelular (MEC) que compõe o tecido tendíneo assegura uma conexão entre a célula do músculo e o tecido ósseo. Na MEC ocorre síntese protéica através de sinais mecânicos que iniciam uma cascata de expressão gênica, transcrição, tradução e modificação do processo de pós tradução para integrar estes eventos. Com isso, fibrilas colágeno e sarcômeros apresentam alongamento e atividade contrátil a medida que os tecidos compartilham caminhos de sinalização, que garantem uma transformação e adaptação coordenada desta atividade de alongamento e contração nas estruturas, que não estão bem descritas na literatura (KJAER, 2004).

Ainda sobre a MEC podemos afirmar sua importância em situar alta interatividade entre as macromoléculas, que realizarão proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação e adesão, por meio dos fibroblastos, sendo este responsável pela síntese de colágeno tipo I que compõe os tendões. Os tipos de fibras colágenos são diversas, como colágeno tipo I, III, IV e outros, que estão presentes também no epimísio, perimísio e endomísio, tecido conjuntivo que reveste os músculos, essa interação entre estes tecidos é importante para tolerar a absorção de mecanismos de forças através da integridade dos arranjos fibrilares de colágeno, fibras musculares e MEC (VARGA, 1995; DIDERIKSEN, 2014; KJAER, 2004).

Cerca de 60% da matriz extracelular do tendão é composta por fibras colágeno tipo I, que conta ainda com pouquíssima vascularização em sua região e um número reduzido de tenócitos, que se apresentam mitoticamente inativos (KOSTROMINOVA, 2009)

Por estar entreposto aos ossos e músculos o tecido tendíneo tem grande responsabilidade em transmitir a força entre as duas estruturas por meio dos tendões proximais e distais, origem e inserção, presentes em cada músculo. Estas fixações tendinosas tem um aspecto branco brilhante com textura fibro-elástica, proporcionando uma grande resistência a cargas mecânicas, devido à disposição em paralelo das fibras colágeno tipo I, em sua maioria (KANNUS, 2000;).

Existem estruturas especializadas no tecido conjuntivo que são fundamentais e estão localizadas nas superfícies de contato com o osso e o músculo, nomeadas de junção ósseo-tendínea e junção miotendínea. Ao ocorrer uma tensão, a capacidade do tecido de readaptar-se acontece por conta da sua flexibilidade frente ao ambiente exigido por diversas atividades, da mesma maneira, quando desempenha sua principal função de gerar movimentos articulares através da força muscular, estes tendões requerem relativa capacidade inextensível sob cargas fisiológicas. Outra especialidade funcional do tendão é armazenagem e liberação da energia de deformação elástica, o que favorece a eficiência da locomoção (BALDINO, 2016; BIRCH, 2007).

1.3 Junção Miotendínea

A junção miotendínea (JMT) é uma região de união entre músculo e tendão altamente especializada com grande interação entre as células dos dois tecidos. Ao se fazer a análise funcional separadamente, os filamentos do tecido muscular produzem força e o tecido tendíneo, por meio das fibras de colágeno carrega a carga gerada passivamente, com isso caracteriza a transmissão de força das proteínas contráteis extracelulares para as proteínas de conexão intracelular (KANNUS, 1992; TROTTER, 2002).

A junção miotendínea está presente na extremidade distal do tecido muscular em relação ao ventre, com diversas alterações estruturais na função, disposição e composição química desta interface (SIERRA, 2018).

Esta área de interface é delimitada pela matriz extracelular e por dobras do sarcolema, o que resulta em invaginações e evaginações, necessárias para o aumento da área de contato entre as ultraestruturas da junção miotendínea e caracterizam os processos celulares nomeados “finger-like process” que morfologicamente são identificados por filamentos de actina, que se estendem desde a última linha Z e se conectam a proteínas do subsarcolema (CIENA, 2012; KOJIMA, 2008; CHARVET, 2012).

Por conta desta interação em que a matriz extracelular se liga com o sarcolema quando as proteínas da lâmina basal se ancoram com miofilamentos de actina, como talina e vinculina, através da Linha Z, ocorrem condições favoráveis a diversas alterações fisiológicas e patológicas. Estas modulações na região da JMT podem ser provocadas por cargas de treinamento aeróbio e por conta de alongamento induzido do membro, que geram uma tensão através da actina e miosina na contração muscular, principalmente excêntrica (CURZI, 2015; KOJIMA, 2008).

O desenvolvimento da JMT ocorre a partir das contrações e força gerada pelas células musculares durante as últimas semanas de vida intrauterina e as primeiras do período neonatal. As interações entre os mioblastos e elementos da matriz extracelular influenciam diretamente na morfogênese da junção miotendínea que também é modulada por sinalização local via distribuição de ácido retinóico (CIENA, 2012; RODRIGUEZ-GUZMAN, 2007).

Um dos papéis desempenhado pelas interdigitações consiste em um trabalho mecânico de correlação músculo-tendínea para controlar, posicionar e estabilizar as articulações, armazenar e liberar energia elástica. Além de apresentar alterações teciduais através da transmissão de força, que resulta em variações em magnitude, frequência e duração da carga suportada pela membrana celular (TROTTER, 2002; TIDBALL, 1991).

A disposição das fibras musculares na região da JMT pode ser caracterizada pela presença de fibras de contração lenta ao longo do tecido muscular, terminando estas próximas a interface músculo-tendão, em contrapartida, as fibras de contração rápida estão próximas do tendão, para que desempenhem seu papel de transmitir a força gerada proporcionalmente ao endomísio e fibras musculares adjacentes (CURZI, 2013).

Lesões músculo esqueléticas são recorrentemente associadas a região da junção miotendínea, pois estudos com humanos e modelos experimentais mostram

esta suscetibilidade, que pouco é compreendido e estudado a respeito desta relação (SHARAFI, 2011).

Pesquisas que apontam lesões musculares de diversas atividades esportivas, através de imagens radiográficas, relacionam como a JMT é superiormente afetada por traumas em comparação com o ventre muscular. Na literatura há pouco conhecimento existente entre a relação de exercícios com a plasticidade tecidual e vias de sinalização da JMT, dificultam a compreensão das respostas da JMT ao exercício muscular que reduzam as lesões e riscos durante a atividade de treinamento ou resulte em reabilitação funcional após trauma nos tendões (CURZI, 2016).

1.4 Atividade Física e Exercício Físico

A atividade física faz-se presente desde a antiguidade, com finalidade de atender as necessidades da época, como por exemplo; atividades militares, religiosas, educacionais e ações utilitárias do período histórico. Paralelamente à evolução de nossa sociedade ao longo da história, ocorreu o desenvolvimento da Ciência do Treinamento Desportivo, utilizada nas olimpíadas da Grécia Antiga, em exércitos feudais (Idade Média) e na idade moderna até o início do século XX, com o começo da periodização sistemática na Alemanha e URSS. Atualmente é imprescindível para o homem no combate e prevenção do estresse, ansiedade, sedentarismo, obesidade e diversas doenças (SIGOLI & DE ROSI, 2004; MINOZZO, 2008; SEQUEIROS, 2005; ANTUNES, 2006).

Apesar da similaridade entre atividade física e exercício físico, existe a importância em contextualizar as diferenças entre os conceitos. Ambos adotam o princípio de realizar qualquer movimento através dos músculos esqueléticos que proporcionem gastos energéticos, entretanto, somente o exercício físico é planejado, estruturado, repetido e intencional com um propósito final a ser alcançado (CASPERSEN, 1985; CHEIK, 2003).

De fato o exercício físico pode ser compreendido e classificado de duas formas, em aeróbio e anaeróbio, basicamente trata-se respectivamente de um treino de baixa intensidade e prolongada duração e de alta intensidade e intermitentemente. Esta intensidade está relacionada à tensão muscular que resulta em diferentes adaptações através de ambas as classificações de treinamentos

como; aumento mitocondrial, densidade capilar e, com o exercício resistido conseguimos obter síntese de proteínas miofibrilares, aumento da contratilidade e hipertrofia muscular (KHAMOUI, 2016).

O treinamento resistido é um importante método para a hipertrofia muscular e aperfeiçoamento da força, para isso o programa de treinamento necessita ser realizado progressivamente e se atentar as variáveis do exercício; intensidade, volume, duração e frequência, com propósito de produzir contínuo aumento de força e do tamanho do músculo estriado (KRAEMER et. al., 2002; MANGINE, 2015).

Diversos estudos foram publicados durante os anos com fim de examinar uma ou mais variáveis sobre o treinamento resistido e o suporte que ele proporciona para evoluções progressivas na força e desempenho muscular, estes corroboraram com a ampliação sobre o conhecimento que se tinha sobre o assunto. As contribuições literárias ao estarem preocupadas com os objetivos do indivíduo, capacidade física e seu nível de treino, provocam adaptações positivas em diversas capacidades físicas e mensurações da performance motora (RATAMESS et. al., 2009)

Existe uma relação em ganhos de força muscular e hipertrofia ao prescrever os exercícios sistematicamente, com a finalidade de incrementar os conceitos de princípio de sobrecarga e a proporcionalidade de esforço e recuperação. Para que isso ocorra pode ser usada a periodização linear, que é dividida em ciclos; macrociclos, mesociclos e microciclos, mas nem mesmo esta afirmação está bem estabelecida, já que estudos mostram similaridade nos ganhos entre grupos não periodizados (PRESTES, 2009; FONSECA, 2014).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo consistiu em analisar as características morfológicas da junção miotendínea do músculo sóleo em ratos *Wistar* submetidos ao protocolo de exercício resistido em escada vertical.

2.1 Objetivos Específicos

- Revelar as características estruturais da junção miotendínea do sóleo através do método de microscopia de luz com as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picro-Sírus;
- Descrever aspectos tridimensionais da junção miotendínea do sóleo pelo método de microscopia eletrônica de varredura;
- Demonstrar os elementos ultraestruturais das organelas citoplasmáticas e da matriz extracelular através da microscopia de transmissão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos *Wistar* adultos com 90 dias de idade, que ao serem divididos aleatoriamente em três grupos experimentais:

- **Grupo Sedentário (S)** (n=10): os animais não foram submetidos ao protocolo de treinamento.

- **Grupo Treinado (T)** (n=10): os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento sem a sobrecarga.

- **Grupo Treinado Sobrecarga (TS)** (n=10): os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento, com adição de sobrecarga progressivamente.

Todos os animais foram originários do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu e mantidos em gaiolas com 5 ratos cada no Biotério Setorial do Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF) do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Rio Claro.

A temperatura foi controlada a 23 ± 2 °C em períodos claros/escuro de 12 horas e todos os animais alimentados com ração e água “ad libitum”. Os procedimentos apresentados nesse estudo foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA) (nº 3873) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro-SP.

3.2 Mensuração da Massa Corpórea e Massa Muscular

3.2.1 Massa Corpórea

A massa corpórea dos animais foram mensuradas semanalmente (Balança digital SF – 400 TOMATE) durante o período experimental. Para a elaboração das sobrecargas, foram utilizadas no grupo TS pesos de chumbo, fixados a região proximal da cauda do rato, equivalentes a massa corporal de cada animal, os quais foram aferidos e corrigidos semanalmente. Com os dados obtidos foi realizada a análise estatística através do *software GraphPad 6.0*, adotou-se o método *ANOVA Two way* e pós teste de *Bonferroni*, o nível de significância estabelecido foi de $p<0,05$.

3.2.2 Massa Muscular

A massa do músculo sóleo foi mensurada após a dissecação dos animais, com auxílio de uma balança semi-analítica (Marte LC-1), e os dados foram prontamente registrados no *software Microsoft Office Excel* para obtenção da média de massa muscular e desvio padrão de cada grupo. Com os dados obtidos foi realizada a análise estatística através do *software GraphPad 6.0*, adotou-se o método *ANOVA One way* e pós teste de *Bonferroni*, o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

3.3 Protocolo de Treinamento

3.3.1 Escada Vertical

A escada vertical utilizada no protocolo de treinamento para realização das escaladas, tem como dimensões; 100 x 110 cm de altura, 2 cm de espaçamento entre os degraus, 80° de inclinação vertical em relação ao solo, em seu topo se encontra um alojamento quadrado (20 x 20 x 20 cm), onde os animais permanecem temporariamente durante o período de descanso entre as escaladas (séries) e no solo um compartimento foi encaixado a base da escada para direcionar a trajetória do animal para que possa ser colocado no ponto de partida da série (KRAUSE et. al., 2016).

3.3.2 Adaptação ao Treinamento

Na 1ª semana os animais dos Grupos Treinado e Treinado Sobrecarga foram adaptados ao protocolo de treinamento. Na adaptação a escada vertical foi usada para a realização das escaladas e para esta seria exigido dos ratos 8-12 movimentos para considerar válida. No Grupo T a adaptação consistiu na escalada com ponto de partida definido na metade da escada, após 5 tentativas concluídas os animais iniciaram as séries no ponto de partida (compartimento encaixado na base da escada) sem sobrecarga, no topo da escada (local de descanso) os animais finalizam em uma câmara de alojamento onde eles permanecem durante 60 segundos entre cada escalada.

No Grupo Treinado Sobrecarga o procedimento foi o mesmo porém com um aparelho de sobrecarga (peso) fixado à porção proximal da cauda com auxílio de fita

auto-adesiva juntamente a um mosquete. O aparelho de sobrecarga consiste em uma chumbo com peso de 50% da massa corpórea de cada animal. Os animais tiveram estímulos manuais (toque na cauda) para completar as escaladas (HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P., 2004).

3.3.3 Teste de Capacidade de Carga Máxima Carregada

Na 2ª semana o Grupo Treinado/Sobrecarga foi submetido a uma avaliação de capacidade de carga máxima carregada (CCMC), que consiste em dois testes, com objetivo de definir a carga máxima que o animal suporta no início e ao final do experimento.

O 1º teste envolve uma escalada inicial com transporte de uma sobrecarga com 50% da massa corpórea do animal, após a conclusão dessa escalada o animal teve 120 segundos de descanso no topo da escada, em seguida 30 g são adicionados ao aparelho de sobrecarga fixo a cauda a partir da segunda escalada, este procedimento foi sucessivamente repetido até que o animal não consiga concluir a escalada (exaustão) mesmo após 3 tentativas com estímulo e pausas de 60 segundos, para caracterizar uma tentativa. A maior carga realizada durante a última escalada foi considerada a capacidade de carga carregada máxima do animal e para certificar a relevância do peso predeterminado, um segundo teste foi realizado com 50% da carga obtida no primeiro teste, foi dado um intervalo de 3 dias entre os dois primeiros testes, caso haja uma grande diferença entre os mesmos um terceiro teste será efetuado. Os dados obtidos através deste método usado na pesquisa, tiveram análise estatística feita com método *Unpaired T-test* no software GraphPrismPad 6 (HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P., 2004).

3.3.4 Treinamento Experimental

O protocolo de treinamento teve início na semana após a adaptação e a obtenção da carga máxima carregada durante os testes de avaliação. Os animais do grupo Treinado iniciaram o mesmo processo de treinamento do grupo Treinado Sobrecarga porém sem a sobrecarga. Durante as 4 primeiras escaladas, os animais realizaram o procedimento com 50%, 75%, 90%, e 100% da sua massa corporal averiguada semanalmente, respectivamente, para cada escalada os animais devem realizar de 8-12 movimentos dinâmicos. Durante as escaladas subsequentes a sobrecarga de 100% (4ª escalada) será adicionado 30 g de pesos de chumbo

progressivamente até que o animal entre em estado de exaustão ou até que complete as 9 escaladas. Este protocolo foi repetido 3 vezes por semana durante o período de 8 semanas, com um total de 24 sessões de treinamento ao final (HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P., 2004).

3.4 Microscopia de Luz

Após a realização do protocolo experimental foram utilizados 5 animais de cada grupo eutanasiados com overdose de anestésico via intraperitoneal (Ketamina – 200 mg/kg e Xilasina - 50 mg/kg). Em seguida foram dissecadas amostras da junção miotendínea do sóleo e criofixados em nitrogênio líquido, através do posicionamento das amostras em superfície de cortiça estabilizadas com cola biológica e untadas em talco neutro (Tragacanth, SIGMA) para prevenir artefatos e armazenagem feita em Freezer -80° C. Após esta etapa foram realizados cortes longitudinais de 9 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM), coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina para destaque dos componentes celulares e Picro-sírius para identificação do tecido conjuntivo associado. Para obtenção das imagens, foram realizadas as fotografias no Laboratório de Bioquímica na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro (JUNQUEIRA; BIGNOLAS e BRENTANI, 1979; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram utilizados 3 animais de cada grupo experimental, após serem eutanasiados com uma overdose de anestésicos via intraperitoneal (Ketamina – 200 mg/kg e Xilasina – 50 mg/kg) as amostras da junção miotendínea do músculo sóleo, foram imersas em solução de *Karnovsky* modificada (glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 2%, em solução de Cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.4), durante 24 horas, a 4°C, de acordo com o método relatado por Watanabe e Yamada (1983). As amostras da junção miotendínea, após fixação, foram submetidas à técnica de criofratura, mediante ao congelamento em nitrogênio líquido (BOLINA et al., 2013). As amostras criofraturadas foram lavadas de 12 a 24 horas em solução tampão fosfato de sódio, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio, sendo desidratadas em séries crescente de álcoois (60% ao 100%) seguida de imersão em solução de acetato de isoamila 3h, a 4°C, e secas em aparelho ponto crítico Balzers CPD-30,

utilizando CO₂ líquido (DURO et al., 2012; BOLINA et al., 2013). As amostras serão montadas em bases metálicas apropriadas e cobertas com íons de ouro em aparelho Balzers SCD-040, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura TM 3000-Hitachi, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram utilizados 2 animais de cada grupo experimental, eutanasiados através de uma overdose de anestésicos via intraperitoneal (Ketamina – 200 mg/kg e Xilasina – 50 mg/kg) as amostras da JMT (3mm³) do músculo sóleo serão dissecadas e imersas em solução de Cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.4), durante 48 horas à 4°C.

Posteriormente as amostras foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio a 1% durante 2 horas, à 4°C (CIENA et al., 2010), lavadas com solução Salina 0,9% por três vezes e fixadas com a solução de Acetato de Uranila à 0.5% durante 12 horas, à temperatura ambiente e na ausência de luminosidade. Em seguida, as amostras foram submetidas a desidratação em série crescente de álcoois a partir do 70%, 80%, 90% e 95% (1x), álcool etílico absoluto (4x) com banhos de 15 minutos cada, e em Óxido de Propileno (2x) por 15 minutos.

Após a desidratação as amostras permaneceram 1 hora em uma mistura de resina (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit Electron Microscopy Sciences, USA) e Óxido de Propileno na proporção de 1:1, sob agitação, em temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi novamente trocada para proporção de 3:1 durante 1 hora e 30 minutos, posteriormente em resina pura durante 12 horas em temperatura ambiente com ausência de luminosidade. Após essa etapa as amostras foram aquecidas por 1 hora em estufa a 37°C, com frasco aberto para total evaporação de líquidos das amostras.

Para a inclusão das amostras em moldes retangulares de silicone, que foram preenchidos por resina pura e mantidos por 3 dias em estufa a 60°C para concretizar-se a polimerização do bloco. Os blocos foram trimados para a realização de cortes semifinos de 10µm em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Germany), e corados com o método de azul de toluidina 1%. As imagens foram obtidas por meio

do fotomicroscópio Carl Zeiss Microimaging (Axiokop 40, Göttingen, Alemanha). Após selecionada a área de interesse, serão realizados cortes ultrafinos de 60 nanômetros em ultramicrotomo, que serão coletados em telas de cobre de 200 “mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uralina à 4%, por 3 minutos, lavados em água destilada, contrastados em solução aquosa de citrato de chumbo à 0.4% por 3 minutos e lavados em seguida com água destilada (CIENA et al., 2012). As telas serão examinadas através do microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100, Laboratório de Microscopia Eletrônica Aplicada a Pesquisa Agropecuária (NAP/NEPA) na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo – Campus Piracicaba.

4. RESULTADOS

4.1 Massa Corpórea

Durante a realização do protocolo a mensuração dos animais foi realizada semanalmente, com os dados reunidos, foram então avaliados e o protocolo foi dividido em três períodos (P1, P2, P3), o primeiro período (P1) foi definido antes do início da primeira semana do protocolo, o segundo período (P2) se refere a quarta semana de aplicação do protocolo e a última avaliação (P3) ocorreu na oitava e última semana de protocolo.

MASSA CORPÓREA			
GRUPOS	PERÍODO 1	PERÍODO 2	PERÍODO 3
S	337,6 ± 28,0	367,6 ± 31,2*	415,4 ± 35,4
T	354,3 ± 41,0	404,2 ± 42,3	427,3 ± 50,5
TS	366,2 ± 43,7	416,9 ± 53,7*	461,2 ± 57,1

Tabela 1. Médias e desvio-padrões de massa corpórea (g) de cada grupo experimental no início, durante e ao fim do protocolo. (*) *Two-way ANOVA* pós teste Bonferroni = $p < 0,05$. (Fonte: autoral).

Após realizar a segmentação dos períodos observou-se que entre P1 e P2, o Grupo S apresentou um aumento de 8,8% na média das massas, o Grupo T 14 % e o Grupo TS 13,8%.

Ao analisar as mensurações feitas entre os períodos P2 e P3, resultou nas seguintes porcentagens de aumento de massa, Grupo S 13%, Grupo T 5,7% e Grupo TS 10,6%.

Foram realizadas as comparações entre a pesagem da primeira semana e a de encerramento do protocolo (P1 x P3), com o intuito de averiguar o percentual de diferença entre os grupos durante todo o experimento, onde o Grupo S apresentou um incremento de massa corpórea de 23%, o Grupo T 20% e o Grupo TS 26,1%.

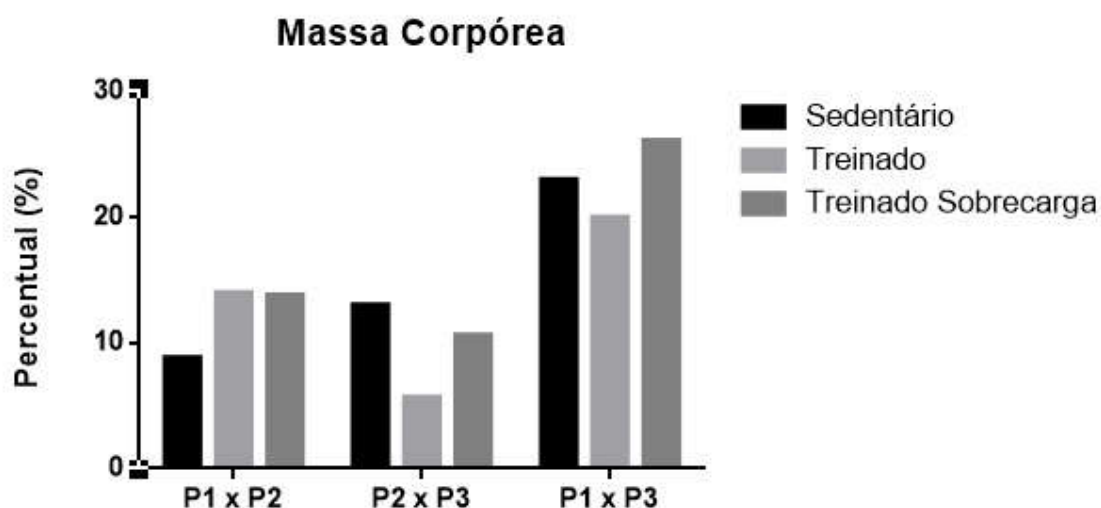


Gráfico 1. Percentual da massa corpórea dos animais entre cada período. (Fonte: autoral).

4.2 Massa Muscular – Sóleo

Foram mensuradas a massa muscular do sóleo dos grupos experimentais, os resultados (Tabela 2) indicam a média mensurada e desvio-padrão. A análise estatística (ANOVA *One way* pós teste Bonferroni) não apresentou significância em $p < 0,05$ para a comparação entre os grupos.

Sóleo	
Grupos	Médias
S	$0,200 \pm 0,0335$
T	$0,208 \pm 0,0243$
TS	$0,204 \pm 0,0295$

Tabela 2. Médias e desvio-padrões da massa muscular (g) do sóleo dos grupos experimentais. (Fonte: autoral).

4.3 Análise do Teste de Capacidade de Carga Máxima Carregada

O Grupo TS realizou o teste de CCMC, antes da aplicação do protocolo e depois das oito semanas de realização do mesmo, no primeiro teste (Teste 1) a média das cargas carregadas foi de $332,6 \pm 66,6$ gramas, no teste feito após o treinamento experimental (Teste 2) houve um aumento ($p < 0,0001$) de 95,6% ao atingir uma média de $650,8 \pm 241,1$ gramas dentre os 10 animais.

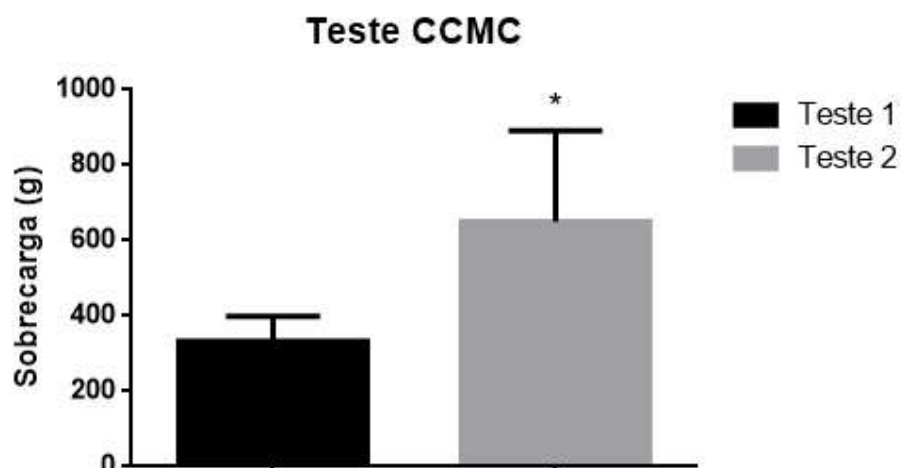


Gráfico 2. Gráfico das cargas máximas carregadas (g) pelo Grupo TS no início e ao fim do protocolo. (*)*Unpaired Teste t* = $p < 0,0001$ (Fonte: autoral).

4.4 Microscopia de Luz

Através das técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), Picro-sírius (PS) podemos evidenciar a região de interface da JMT. As características estruturais celulares com adaptações decorrentes do protocolo de treinamento em escada vertical estão expostas na Figura 1.

No Grupo S foram observadas as interações da JMT e as particularidades dos tecidos que compõe a região verificada. O tecido conjuntivo apresenta aglomerações dos núcleos dos tenócitos na região adjacente às fibras musculares da junção e em menores proporções na região distal à JMT (Fig. 1A). Com a técnica de PS foi possível identificar o tecido tendíneo lateralmente ao tecido muscular e sua comunicação tecidual na região central com predominância de fibras musculares nas laterais da JMT (Fig. 1D).

Ao evidenciar no Grupo T as adaptações celulares nos tecidos musculares e colágeno, é preciso apontar a presença de uma maior aglomeração de núcleos dos tenócitos e o crescimento longitudinal dos fascículos musculares, o que contribui com o aumento na área de contato da JMT (Fig. 1B). É possível visualizar em amarelo o tecido muscular e com tonalidade mais escura o tecido conjuntivo, esta consegue indicar claramente a região de junção dos tecidos (Fig. 1E).

No Grupo TS foi possível revelar uma maior organização celular dos tecidos que compõe a JMT. A disposição alinhada dos núcleos dos tenócitos atribui aspectos uniformes do tecido conjuntivo que aparece adjacente ao tecido muscular,

que também apresentou uma maior densidade de núcleos nas fibras que constituem os fascículos periféricos à JMT (Fig. 1C). Maior espessura do endomísio pode ser notada na técnica de PS deste grupo (Fig. 1F).

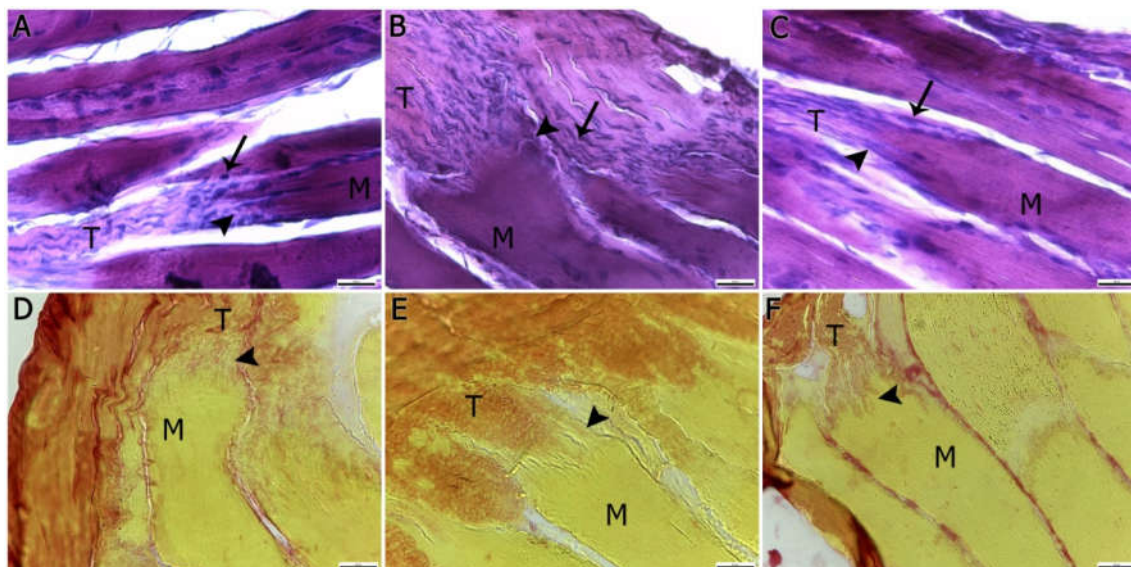


Figura 1. Microscopia de Luz. Grupo Sedentário (A e D), Grupo Treinado (B e E), Grupo Treinado Sobrecarga (C e F). Letras (T) e (M) representam tendão e músculo respectivamente. Núcleos dos tenócitos (setas) e JMT (cabeças de seta). Hematoxilina-Eosina (A, B, C) e Picro-Sírius (D, E, F). (Fonte: autoral)

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A junção miotendínea do músculo sóleo dos três grupos experimentais foi submetida à técnica de criofratura para apontar aspectos tridimensionais da região.

No Grupo S foi possível identificar os feixes de fibras musculares e sua organização em fascículos e, a disposição do tecido colágeno em conformidade com o músculo (Fig. 2A).

No Grupo T foi observado à região de transição das fibras musculares e tendíneas que formam a JMT, com extensa interação em sua superfície muscular das fibras de colágeno (Fig. 2B).

No Grupo TS observaram-se as disposições paralelas e oblíquas das fibras musculares em sua região distal próximo aos feixes de colágeno do tendão. Notam-se em destaque a estreita relação entre os feixes de fibras colágenas na extremidade distal das fibras musculares o que forma a JMT (Fig. 2C).

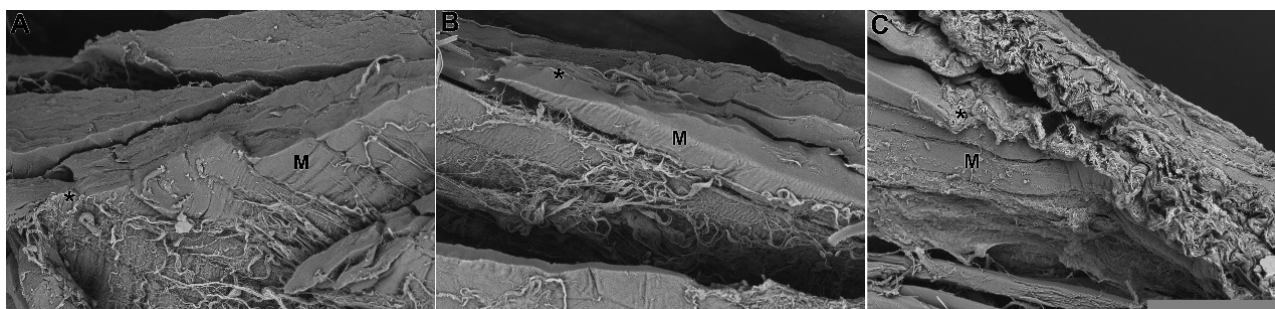


Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura. JMT do músculo sóleo dos Grupos Sedentário (A), Treinado (B), Treinado Sobrecarga (C). Indicações das células musculares (M) e tendíneas (*). (Fonte: autoral)

4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Através da microscopia eletrônica de transmissão observaram-se a nível celular as adaptações ultraestruturais da JMT do músculo sóleo de todos os grupos experimentais e suas características.

No Grupo S observaram-se a organização dos feixes de miofilamentos que constituem os sarcômeros em séries e na matriz extracelular as células tendíneas em destaque aos seus respectivos núcleos dos tenócitos, bem como o retículo endoplasmático rugoso na área da JMT (Fig. 3A). Em maior aumento na interação músculo-tendão foram reveladas dobras no sarcolema, formadas por feixes de miofilamentos protéicos denominados de evaginações sarcoplasmáticas, provenientes da matriz extracelular, longas e delgadas projeções conjuntivas paralelas denominadas de invaginações sarcoplasmática (Fig. 3B).

No Grupo T notaram-se a presença de grupamentos mitocondriais nas extremidades da célula muscular em proximidade aos feixes de fibras colágenos, assim como a presença de tenócitos com formatos fusiformes situados próximos à JMT na ampla área de fibrilas de colágeno (Fig. 3C). Em destaque, a adaptação dos tecidos envolvidos na interface da JMT pode ser notada nos sarcômeros dispostos em série, com uma maior densidade na tonalidade das linhas Z e concomitantemente a organização no arranjo das evaginações e invaginações sarcoplasmáticas presente principalmente na região central da JMT (Fig. 3D).

No Grupo TS revelaram na região da JMT a presença de mioblasto em desenvolvimento periféricamente à fibra muscular adulta, com grupamentos mitocondriais periféricos, adjacentes ao núcleo, com característica de fusão entre células musculares (Fig. 3E). Em maior aumento foram notadas a organização das dobras no sarcolema, com disposição longitudinalmente na célula muscular em toda interface da JMT, com aumento nos comprimentos e espessuras das invaginações e

evaginações sarcoplasmáticas e na densidade dos sarcômeros em série próximos a região da JMT (Fig. 3F).

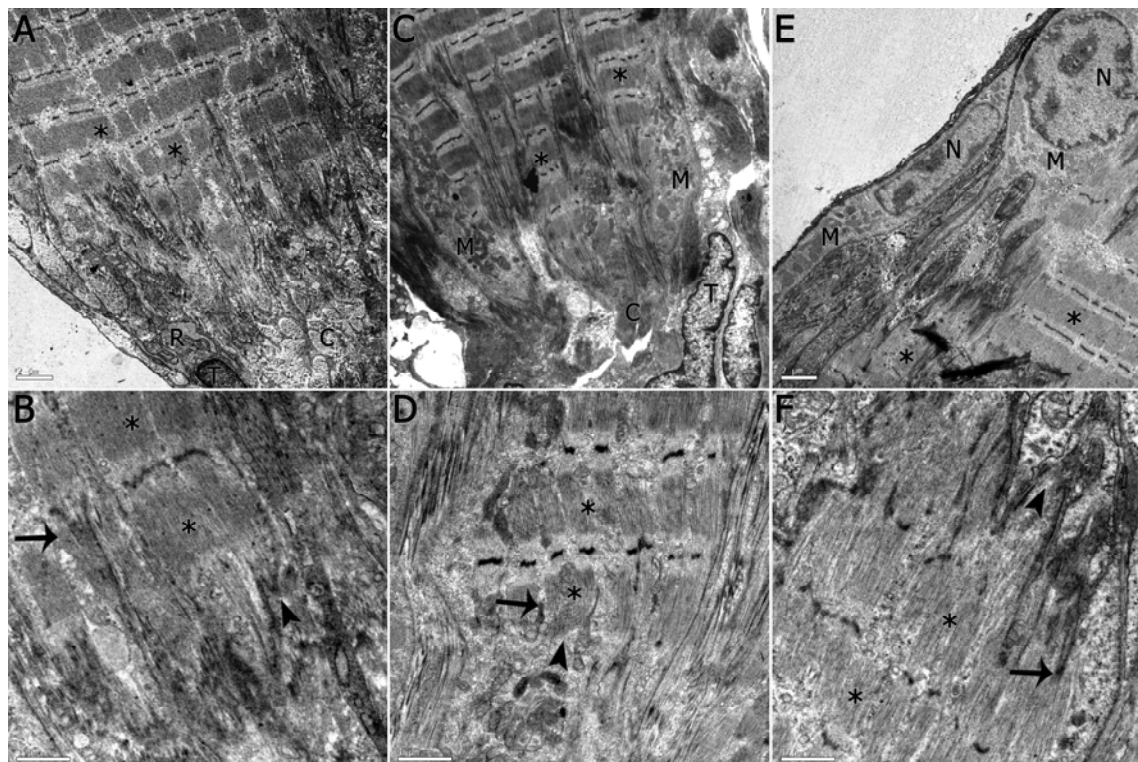


Figura 3. Microscopia Eletrônica de Transmissão. Grupo Sedentário (A-B), Grupo Treinado (C-D), Grupo Treinado Sobrecarga (E-F). Indicações referentes ao agrupamento mitocondrial (M), retículo endoplasmático rugoso (R), núcleo dos tenócitos (T), tecido colágeno (C), núcleo das células satélites (N). Indicações das evaginações sarcoplasmáticas (cabeças de setas), invaginações sarcoplasmáticas (setas), sarcômeros em série (*). (Fonte: autoral)

5. DISCUSSÃO

O exercício físico traz diversas contribuições para quem o pratica e através deste estudo, demonstramos o comportamento da JMT frente a estímulos de exercícios físicos e exercícios físicos resistidos induzidos através do treinamento em escada vertical e analisamos as características morfológicas estruturais, tridimensionais e ultraestruturais da JMT.

A diferença entre exercícios aeróbios e resistidos que a pesquisa coloca, está presente ao evidenciarmos a massa corpórea dos animais e, constatar que os percentuais do início para o fim do protocolo correspondem à especificidade de cada grupo experimental. Nossos achados frente ao menor percentual de aumento da massa corporal apresentado pelo Grupo T, corroboram com o estudo de Machado et al. (2014), que apontou a eficácia do treinamento aeróbio concorrente na diminuição da composição corporal. Referente a comparação entre S e TS conseguimos confrontar os resultados de Hornberger and Farrar (2004) em que não foi apresentado significativa divergência de valores entre o peso inicial e final dos dois grupos experimentais, em contrapartida o presente estudo apresentou uma maior porcentagem da massa corporal do Grupo TS em relação ao S, entretanto este ganho é decorrente ao exercício resistido ao contrário da inatividade física dos animais sedentários. Vale ressaltar que o peso inicial dos grupos experimentais diferiu do nosso estudo para Hornberger, mas a proporcionalidade foi praticamente a mesma, pois do começo ao fim do protocolo o Grupo TS apresentava uma média de massa corpórea maior em relação ao Grupo S, ao contrário do estudo referencial, em que o grupo submetido ao protocolo de hipertrofia encontrava-se com média inferior comparado aos animais do grupo controle. Ao discutirmos os dados expressados na massa do músculo sóleo e compararmos com o estudo realizado por Tamaki et al. (1992), que promoveu sessões de treinamento aeróbio (*sprint*) e resistido (*squat*) e analisa a massa do sóleo, que obteve bem como em nosso trabalho o peso do Grupo TL (aeróbio) foi superior ao Grupo TS (resistido).

Como descrevem Krause et al. (2016) é de extrema importância realizar a comparação entre a carga de treinamento do início com o fim do protocolo, através de testes de carga máxima alcançada, assim como fizeram Hornberger and Farrar (2004), que obtiveram um incremento na capacidade de carga máxima carregada de

287%, resultado adverso ao achado de nossa pesquisa que revelou um aumento médio de 95,6% entre os animais do Grupo TS. Esta disparidade é notável por aplicarmos o teste duas vezes durante o experimento enquanto o estudo prévio aplicou em todas as sessões de treinamento durante as oito semanas. Não podemos relatar como um resultado negativo, uma vez que não há uma teoria científica concreta sobre qual método está correto, pois segundo Krause et al. (2016) os humanos precisam de familiarização com os testes e para os animais nada sabemos sobre a veracidade deste fator, apenas que ambos devem estar altamente estimulados. Outra diversidade que podemos observar é de dois objetivos completamente divergentes onde o atual estudo, apenas utiliza a escada vertical e o treinamento resistido para analisar adaptações na interface músculo-tendão frente ao exercício físico e a pesquisa usada para embasamento possui outro viés, ao analisar se a escada vertical poderia incrementar resultados similares a hipertrofia muscular nos animais.

As estruturas celulares apresentadas através das microscopias de luz e eletrônica de varredura demonstram amplas adaptações geradas na JMT devido ao protocolo experimental, que exigiu dos Grupos T e TS diferentes volumes e intensidades de contrações musculares, pois segundo Curzi et al. (2012) treinamento de força excêntrica ou exercícios de corrida com modelo experimental, apresentam resultados de modulações na arquitetura dos dois tecidos envolvidos durante as contrações musculares e em repouso ocorre o aumento no comprimento do fascículo, corroboram então as características presentes em cada grupo experimental e suas respectivas microscopias, que evidenciaram diferentes resultados devido a finalidade e especificidade de cada exercício realizado pelos animais.

Os aspectos encontrados no Grupo Sedentário através das análises ultraestruturais demonstram resultados semelhantes aos achados de Cienia et al. (2012) em que revelaram as características da JMT durante o desenvolvimento ao nascimento, fase adulta e com o envelhecimento. Além disso, descrevem a presença de invaginações sarcoplasmáticas mais longas que os sarcômeros, correspondem ao mesmo que as ancoragens das invaginações nas linhas Z também observadas e

descritas no presente estudo e também, as duas pesquisas apontam na região citoplasmática o retículo endoplasmático rugoso.

Além da similaridade entre as descrições ultraestruturas da JMT de Ciena et al. (2012) e o Grupo T, quando confirmadas a disposição de tenócitos em uma grande área de colágeno e fora da matriz extracelular e os grupamentos mitocondriais. Podemos destacar também a organização e o aumento dos “*finger-like processes*” provocadas pelo exercício físico e descritas pela primeira vez por Kojima et al. (2008), que em sua pesquisa realizou procedimentos aeróbios nos animais e discute que estas invaginações e evaginações sarcoplasmáticas recebem contrações musculares o que causa uma imediata resposta ao aumento da tensão e da área de contato músculo-tendão, estas modificações acarretadas por meio de diferentes intensidades de exercício na plasticidade da JMT são confirmadas por Curzi et al. (2016).

O Grupo TS demonstra ultraestruturalmente às diferentes e amplas adaptações da JMT submetidos ao treinamento resistido. Diversos estudos que abordam a progressividade da carga em animais submetidos a treinamento em escada vertical são encontrados na literatura (Yarasheski et al., 1990; Hornberger and Farrar, 2004; Lee et al., 2004; Harris et al., 2010). Entretanto não abordam sobre as consequências da hipertrofia frente à JMT, que é a principal área do aparelho locomotor, contudo, Curzi et al. (2016) ao realizar uma discussão sobre as ultraestruturas da interação músculo-tendão, do desuso ao exercício, aponta as contrações excêntricas como principal mecanismo de mudança na plasticidade tecidual da JMT, uma vez que estas contrações interferem no ângulo dos fascículos musculares e aumentam significativamente a região de transmissão de força a partir da duração do treinamento, e estão presentes no protocolo deste estudo. Por isso podemos descrever as adaptações morfológicas da JMT no Grupo TS uma alta atividade celular presente, por encontramos tecidos em desenvolvimento e fusão celular ocorrendo na região.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que ocorrem adaptações da interface músculo-tendão em modelo experimental de hipertrofia muscular, além da organização dos sarcômeros em série, o que demonstra a existência de especificidade nas modalidades de treinamento na principal área anatômica do aparelho locomotor. Novos estudos em continuidade são necessários para explorar os mecanismos envolvidos nesta plasticidade e para elucidar os fatores que influenciam as adaptações sarcoméricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, H. K. M.; SANTOS, R. F.; CASSILHAS, R. Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 2, p.108-114, 2006.
- BALDINO, L.; CARDEA, S; MAFFULLI, N; REVERCHON, E. Regeneration techniques for bone-to-tendon and muscle-to-tendon interfaces reconstruction, **British Medical Bulletin**, v.117 p.25–37, 2016.
- BIRCH, H. L. Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. **International Journal of Experimental Pathology**, n. 88, p. 241–248, 2007.
- BOLINA, C.S; BOLINA-MATOS, R.S; ALVES, P.H.M; CURY, D.P; CIENA, A. P.; WATANABE, I. Three-dimensional aspects of the structural characteristics and kidney angioarchitecture of adult and aged Wistar rats: a scanning electron microscopy study. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 5, p. 538-544, 2013.
- CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical Activity, Exercise, and Physical Fitness: Definitions and Distinctions for Health-Related Research. **Public Health Reports**, v. 100, n. 2, p. 126-131, 1985.
- 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.
- CHEIK, N. C.; REIS, I. T.; HEREDIA, R. A. G.; VENTURA, M. L. Efeitos do exercício físico e da atividade física na depressão e ansiedade em indivíduos idosos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 11, n. 3, p. 45-52, 2003.
- CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.
- CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; BOLINA, C.S.; BOLINA-MATOS, R. S.; WATANABE, I. Ultrastructural features of the myotendinous junction of the sternomastoid muscle in wistar rats: from newborn to aging. **Microscopy Research and Technique**. v. 75, p. 1292-1296, 2012.
- CIENA, A. P.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; DIAS, F. J.; BOLINA, C. S.; ISSA, J. P.; IYOMASA, M. M.; OGAWA, K. Fine structure of myotendinous junction between

the anterior belly of the digastric muscle and intermediate tendon in adults rats. **Micron**, v.43, n. 2-3, p. 258-262, 2012.

CLARK, K. A.; MCELHINNY A. S.; BECKERLE, M. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 18, p. 637-706, 2002.

CRAIG, R.; PADRÓN, R. Molecular structure of the sarcomere. **Myology**. 3rd ed. New York: McGrawHill, 2004, 166p.

CURZI, D.; SALUCCI, S.; MARINI, M. How physical exercise changes rat myotendinous junctions: an ultrastructural study. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, n. 19, p. 117-122, 2012.

CURZI, D.; AMBROGINI, P.; BURATTINI, S. Morphogenesis of rat myotendinous junction. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 3, n. 4, p. 275-280, 2013.

CURZI, D.; BALDASSARRI, V.; FALCIERI, E. Morphological adaptation and protein modulation of myotendinous junction following moderate aerobic training. **Histology and Histopathology**, v. 30, p. 465-472, 2015

CURZI, D.; SARTINI, S.; GUESCINI, M.; LATTANZI, D.; DI PALMA, M.; AMBROGINI, P. Effect of Different Exercise Intensities on the Myotendinous Junction Plasticity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-12, 2016.

CURZI, D. Ultrastructural study of myotendinous junction plasticity: from disuse to exercise. **Sport Sci Health**, DOI 10.1007/s11332-016-0301-1, 2016

DIDERIKSEN, K. Muscle and tendon connective tissue adaptation to unloading, exercise and NSAID. **Connect Tissue Res**, v. 55, n. 2, p. 61–70, 2014.

DURO, C. C.; CIENA, A. P.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; RIGHETTI, M. M. S.; GRISOLIA, D. F.; ISSA, J. P.; DA SILVA, M. C. P.; WATANABE, I. Qualitative study of young, adult, and aged wistar rats temporomandibular synovial membrane employing light, scanning, and transmission electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**. v. 75, p. 1522-1527, 2012.

FONSECA, R. M.; ROSCHEL, H.; UGRINOWITSCH, C. Changes in exercise are more effective than loading schemes to improve muscle strength. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 28, n. 11, p. 3085-3092, 2014.

GARTNER; HIATT. **Atlas Colorido de Histologia: texto/atlas**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GONZALEZ-FREIRE, M.; SEMBA, R. D.; FERRUCCI, L. The human skeletal muscle proteome project: a reappraisal of the current literature. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 1, p. 2-14, 2016.

HARRIS, M. B.; SLACK, K. N.; PESTROSA, D. T.; HRYVNIAK, D. J. Resistance training improves femoral artery endothelial dysfunction in aged rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, p. 533-540, 2010.

HORNBERGER, T.A.; AND FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian Journal of Applied Physiology** v.29, p.16-31, 2004.

JÄRVINEN, T.A.; JÄRVINEN, T.L.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **The American Journal of Sports Medicine**, vol. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

JUNQUEIRA, L.C; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissues sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas** 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538p.

KADLER, K. E.; HOLMES, D. F.; TROTTER, J. A.; CHAPMAN, J. A. Collagen fibril formation. **Biochemical Journal**, v. 316, n. 1, p. 1-11, 1996.

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

KANNUS, P.; JOZSA, L.; KVIST, M.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. The effects of immobilization on myotendinous junction: an ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 144, n. 3, p. 387-394, 1992.

KHAMOUI, A. V.; PARK, B.; KIM, D.; YEH, M.; OH, S.; ELAM, M. L.; JO, E.; ARJMANDI, B. H.; SALAZAR, G.; GRANT, S. C.; CONTRERAS, R. J.; LEE, W. J.; KIM, J. Aerobic and resistance training dependent skeletal muscle plasticity in the colon-26 murine model of cancer cachexia. **Metabolism Clinical and Experimental** v. 65, p. 685-698, 2016.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **American Physiological Society**, v. 84, n. 2, p. 649-698, 2004.

KOJIMA, H.; SAKUMA, E.; MABUCHI, Y.; MIZUTANI, J. Ultrastructural changes at the myotendinous junction induced by exercise. **Journal Of Orthopaedic Science**, v.13, p. 233-239, 2008.

KRAEMER, W. J.; ADAMS, K.; CAFARELLI, E.; DUDLEY, G. A.; DOOLY, C. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 34, n. 2, p. 364–380, 2002.

KRAUSE, W. N.; SILVA, W. A.; CIENA A. P.; ANARUMA C. A.; GAMA E. F. Vertical climbing for rodent resistance training: a discussion about training parameters. **International Journal of Sports Science** v.6, e.1A, p. 36-49, 2016.

KRAUSE, W. N.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: systematic review of animal experimental studies. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 713-728, 2015.

KOSTROMINOVA, T. Y.; CALVE, S.; LARKIN, L. M. Ultrastructure of myotendinous junctions in tendon-skeletal muscle constructs engineered in vitro. **Histology and Histopathology**, v. 24, n. 5, p. 541-550, 2009.

LEE, S.; BARTON, E. R.; SWEENEY, H. L.; FARRAR, R. P. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **J Appl Physiol**, v. 96, p. 1097-1104, 2004.

LE MOAL, E.; PIALOUX, V.; MOUNIER, R. Redox control of skeletal muscle regeneration. **Antioxidant and Redox Signaling**, v. 27, n. 5, p. 2-35, 2017.

MACHADO, J. H. L.; HORIE, G. M.; CASTOLDI, R. C. Efeito do treinamento concorrente na composição corporal e massa muscular de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 34-42, 2014.

MANGINE, G. T.; HOFFMAN, J. R.; GONZALEZ, A. M.; TOWNSEND, J. R. The effect of training volume and intensity on improvements in muscular strength and size in resistance-trained men. **Physiological Reports**, v. 3, n. 8, p. 1-17, 2015.

MINGUETTI, G.; MAIR, W. G. P. Ultrastructure of developing human muscle: the problem of multinucleation of striated muscle cells. **Arquiv. Neuro-Psiquiatria**, v. 44, n. 1, p. 1-14, 1986.

MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 15, n. 3, p. 50-55, 2005.

MINOZZO, F. C.; LIRA, C. A. B. DE; VANCINI, R. L. Periodização do treinamento de força: uma revisão crítica. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2008.

PRESTES, J.; DE LIMA, C.; CONTE, M. Comparison of linear and reverse linear periodization effects on maximal strength and body composition. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 23, n. 1, p. 266-274, 2009.

RATAMESS, N. A.; ALVAR, B. A.; EVETOCH, T. K.; HOUSH, T. J.; KRAEMER, W. J.; TRIPLETT, T. N. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine & Science in Sports & Exercise** v. 41, n. 3, p. 687-708, 2009.

RIGOARD, P.; BAUCHE, S.; BUFFENOIR, K.; GIOT, J. P. Le Support Anatomique De la Contraction Musculaire. **Neurochirurgie**. v. 55, n. 1, p. S69-S82, 2009.

RODRIGUEZ-GUZMAN, M. A. J.; SANTESTEBAN, E.; GANAN, Y.; MACIAS, D.; HURLE, J. M. Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic signaling. **Developmental Biology**, v. 302, n. 1, 2007.

ROSS, M. H.; PAWLINA W. **Histologia Texto e Atlas. Em correlação com a biologia molecular** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 908p.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. **Muscle Development and Growth**, v. 18, p. 103-140, 2001.

SEQUEIROS, J. L. S.; OLIVEIRA, A. L. B.; CASTANHEDE, D. Estudo sobre Fundamentação do Modelo de Periodização de Tudor Bompa do Treinamento Desportivo. **Fitness & Performance Journal**, v. 4, n. 6, p. 341-347, 2005.

SHARAFI, B.; AMES, E. G.; HOLMES, J. W.; BLEMKER, S. S; Strains at the myotendinous junction predicted by a micromechanical model. **Journal of**

Biomechanics, v. 44, n. 16, p. 2795-2801, 2011.

SIERRA, L. R.; FÁVARO, G.; CIENA, A. P. Myotendinous junction plasticity in aged ovariectomized rats submitted to aquatic training. **Microscopy Research and Technique**, v. 1, p. 1-7, 2018.

SIGOLI, M. A.; DE ROSE JR. D. A história do uso político do esporte. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. v. 12, n. 2, p. 111-119, 2004.

TAJSHARGHI, H. Thick and Thin Filament Gene Mutations in Striated Muscle Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1259-1275, 2008.

TAMAKI T.; UCHIYAMA S.; NAKANO S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 24, n. 8, p. 881-886, 1992.

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

TROTTER, J. A. Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. **Comparative biochemistry and physiology – Part A: molecular & Integrative Physiology**, v.133, n.4, p. 1127-1133, 2002.

VARGA, J. BASHEY, R. I. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. **Intern. Rev. Immunol**, v. 12, p. 187-199, 1995.

YARASHESKI, K. E.; LEMON, P. W. R.; GILLOTEAUX, J. Effect of heavy-resistance exercise training on muscle fiber composition in young rats. **J Appl Physiol**, v. 69, n. 2, p. 434-437, 1990.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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

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

DECISÃO CEUA Nº 19/2016

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 02.05.2016	

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Adaptações morfológicas na junção miotendínea do sóleo de ratos Wistar adultos submetidos ao protocolo de treinamento em escada vertical**", protocolo nº 3873, sob responsabilidade de Adriano Polican Ciena (Pesquisador Responsável) e Jossei Soares de Sant'Ana (Orientando), que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

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

Colaboradores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **28ª reunião ordinária**, realizada em **22.06.2016**

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

Vigência da autorização: 01/07/2016 a 01/07/2017

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: rato heterogênico Wistar Número de animais: 30

Peso: 225 g Idade: 90 dias Sexo: machos

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

Objetivo Acadêmico:	(x) TCC () Mestrado () Doutorado () Outros – (Iniciação Científica) () Pós- Graduação
---------------------	---

Rio Claro, 22/06/2016

Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci
Coordenador

ANEXO B – MENÇÃO HONROSA



XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ANATOMIA
XXXIX CONGRESSO CHILENO DE ANATOMIA
IV ENCONTRO DAS LIGAS ESTUDANTIS DE MORFOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que **Jossei Sant' Ana**, **Jurandyr Pimentel Neto**, **Carolina Jacob**, **Walter Krause Neto**, **li-sei Watanabe** e **Adriano Polican Ciena** receberam **MENÇÃO HONROSA** pelo trabalho intitulado **ADAPTAÇÕES SARCOMÉRICAS DA JUNCÃO MIOTENDÍNEA DEVIDO A ESPECIFICIDADE DO PROTOCOLO DE EXERCÍCIOS FÍSICOS** apresentado no **XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ANATOMIA, XXXIX CONGRESSO CHILENO DE ANATOMIA e IV ENCONTRO DAS LIGAS ESTUDANTIS DE MORFOLOGIA**, promovido pela **Sociedade Brasileira de Anatomia**, realizado entre os dias 18 e 21 de julho de 2018, no Centro de Convenções de João Pessoa-PB, Brasil, na modalidade **PÓSTER**.



Dr. Eulámpio José da Silva Neto
Presidente do XXVIII Congresso Brasileiro de Anatomia



Dr. Pablo José Lizama Arce
Presidente do XXXIX Congresso Chileno de Anatomia



Dr. Richard Haili Cabral
Presidente da Sociedade Brasileira de Anatomia



Dra. Jákina Guimarães Vieira Gutemberg
Presidente da Comissão Científica do XXVIII CBA



CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



UNIVERSIDADE
FEDERAL DA
PARAÍBA



FACULDADE
SANTA MARIA



UNIPÊ
Centro Universitário
de João Pessoa



GAN
Associação Brasileira de Anatomia



Panasonic
BUSINESS

APÓIO

PATROCÍNIO

Jossei Soares de Sant' Ana

Prof. Dr. Adriano Polican Ciena