

ROBSON CHACON CASTOLDI

**MODULAÇÕES NAS JUNÇÕES NEUROMUSCULAR DO MÚSCULO
FLEXOR RADIAL DO CARPO DIANTE DE DIFERENTES PROTOCOLOS
DE ESCADA VERTICAL**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, Instituto de
Biociências, Programa de Pós-Graduação em
Ciências do Movimento.

Supervisor: Professor Dr. Adriano Polican
Ciena.

RIO CLARO

2024

Sumário

RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1 Tecido Muscular Esquelético	8
2.2 Hipertrofia muscular.....	9
2.3 Junção neuromuscular.....	10
2.4 Teste de força	11
3. OBJETIVO	13
3.1 Objetivos específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Animais	14
4.2. Protocolos de Treinamento.....	14
4.3. Massa Corporal e Massa Muscular	15
4.4. Coleta das amostras	15
4.4.1 Microscopia de Luz	15
4.4.2 Área de secção transversa.....	15
4.4.3 Colágeno intersticial	16
4.4.4 Índice de fator de forma.....	16
4.5. ATPase Miofibrilar	17
4.6. Análise da Densidade Numérica.....	17
4.7. Imunofluorescência - Junção Neuromuscular (α -bungarotoxina).....	18
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
6. RESULTADOS.....	20
6.1 Microscopia de Luz	20
6.2 Junção Neuromuscular	2
7. DISCUSSÃO	3
8. CONCLUSÃO.....	7
9. AGRADECIMENTOS.....	8
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
11. Atividades realizadas durante o estágio de pós-doutoramento	14
11. 1 Participação em eventos científicos.....	14
11.2 ARTIGOS SUBMETIDOS	15
11.3 PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO	9
11.4 LIDERANÇA DE ATIVIDADES DE LABORATÓRIO	10

12	APROVAÇÃO CEUA	11
13	MANIFESTAÇÃO E COMENTÁRIOS DO SUPERVISOR	12

RESUMO

Introdução: O treinamento físico (TF) é capaz de gerar diversas adaptações no corpo humano e pode se diferenciar de acordo com sua especificidade. Dentre diversas formas de TF, o treinamento resistido (TR) é caracterizado pelo uso de sobrecargas e pode gerar adaptações neuromusculares. A região de comunicação entre a terminação nervosa axonal e as células musculares é denominada junção neuromuscular (JNM). Apesar de diversos estudos terem abordado a temática do TR, pouco se sabe a respeito da utilização de diferentes modelos de sobrecarga no tecido muscular, especialmente nas JNM. Desse modo, torna-se necessária a realização de investigações que abordem essa área do conhecimento. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as possíveis alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais nas junções neuromusculares do músculo flexor radial do carpo de ratos *Wistar*, mediante realização de diferentes protocolos de escalada vertical. **Material e Métodos:** Foram utilizados 32 ratos *Wistar* (90 dias), distribuídos em 4 grupos: Controle (C) (n=8); Treinamento Livre (TL) (n=8); Treinamento com Carga (TC) (n=8); Treinamento Intercalado (TI) (n=8). O teste de carga máxima foi realizado em todos os grupos experimentais com objetivo de definir a intensidade de esforço durante o treinamento. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com *overdose* de Ketamina 100mg/Kg, via intraperitoneal. Foram coletadas amostras do músculo flexor radial do carpo e em seguida, foram produzidas lâminas histológicas para realização das análises musculares. Nesse caso, foi realizada a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) para mensuração da área de secção transversa (AST), Picrosirius para análise do colágeno intersticial. Foi calculado também, o Índice de fator de forma, para verificar a morfologia tecidual, ATPase Miofibrilar para análise da tipagem das fibras e Imunofluorescência para observação da Junção Neuromuscular (JNM). Após a obtenção dos dados, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e utilizada análise de variâncias (ANOVA Two-Way), seguido pelo pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Todos os procedimentos adotaram o valor de significância de 5% ($p < 0,05$). Os cálculos foram realizados com o programa com pacote estatístico (SPSS 22.0 for Windows®). **Resultados:** Houve aumento na área de secção transversa em todos os grupos experimentais, especialmente em TI e TL ($p < 0,05$). Além disso, houve diminuição da AST das fibras oxidativas no grupo TI ($p < 0,05$) e aumento nas fibras glicolíticas, nos grupos TS e TI ($p < 0,05$). Não houve diferença no colágeno intersticial ($p > 0,05$) e houve aumento no IFF somente no grupo TI ($p < 0,05$). Quando analisada a JNM, foi observada diminuição da densidade nos grupos TL e TI ($p < 0,05$) e na contagem da JNM, nos grupos TS e TI ($p < 0,05$). Ademais, foi verificada que as variáveis área total demonstrou aumento em TI e diminuição em TL ($p < 0,05$). Já em relação à área corada e perímetro corado, houve aumento em TI ($p < 0,05$). **Conclusão:** Todos os animais demonstraram aumento na AST, especialmente os animais do grupo TI. Além disso, o treinamento intercalado demonstrou maiores adaptações na junção neuromuscular do que quando comparado aos grupos com e sem sobrecarga.

Palavras-chave: Treinamento físico, Efeito Neuromuscular, Fibras Musculares Esqueléticas, Ratos *Wistar*.

1. INTRODUÇÃO

O treinamento físico (TF) é capaz de gerar diversas adaptações no corpo humano e pode se diferenciar de acordo com sua especificidade. Quando praticado com regularidade, o TF é capaz de promover adaptações na capacidade cardiorrespiratória, força, resistência muscular, flexibilidade e capacidade neuromotora [1–3].

Dentre diversas formas de TF, o treinamento resistido (TR) é caracterizado pelo uso de sobrecargas e tem como finalidade principal, gerar adaptações no sistema neural e muscular. Essas adaptações podem ser relacionadas ao aumento de força contrátil, resistência muscular e hipertrofia [4].

As prováveis adaptações durante o treinamento físico no músculo estriado esquelético (MEE), o qual é caracterizado por sua capacidade de geração de força voluntária, ocorrem diante da contração das fibras musculares [5]. A unidade estrutural responsável por tal fenômeno é chamada sarcômero, que é composta por proteínas contráteis que interagem e se adaptam diante de diferentes estímulos, de forma a alterar estruturalmente sua conformação, mecanismo também conhecido como “plasticidade” [6].

Para que ocorra uma contração muscular, impulsos nervosos, são enviados pelo sistema nervoso central aos músculos, por meio do motoneurônio, até às fibras musculares [7, 8]. Essa região na qual ocorre o encontro do neurônio motor e as fibras musculares, é denominada junção neuromuscular (JNM) [9].

A JNM é a região de comunicação entre a terminação nervosa axonal em contato com a membrana sarcoplasmática das células musculares [10]. Recentemente, estudos realizados em animais, observaram que o TF pode propiciar adaptações morfológicas, que influenciarão no funcionamento desse mecanismo [10, 11].

O TR é fundamental para promoção da hipertrofia muscular e adaptação neuromuscular [10, 12]. Apesar de diversos estudos terem abordado esta temática, pouco se sabe a respeito da utilização de modelos intercalados de sobrecarga no tecido muscular, especialmente nas JNM.

Desse modo, torna-se necessária a realização de investigações que abordem essa área do conhecimento, com a intenção de se obter maiores informações a respeito dos efeitos do TR na JNM. Além disso, achados relacionados às adaptações das JNM em

diferentes modalidades de TR e na associação entre protocolos com ou sem sobrecargas, podem trazer descobertas inovadoras das JNM nos músculos flexores do antebraço.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tecido Muscular Esquelético

O corpo humano é constituído por três diferentes tipos de músculos que possuem diferentes funções [5]. Dentre essas, estão a locomoção, circulação sanguínea e revestimentos de órgãos e cavidades corporais [5, 13].

Enquanto o músculo estriado cardíaco possui a função de bombear o sangue rico em nutrientes e oxigênio para os diferentes segmentos corporais, a musculatura lisa participa do transporte de alimentos, como é o caso do tubo digestório e reveste a parede interna de órgãos, veias e artérias [14]. Já os músculos estriados esqueléticos, são responsáveis pela sustentação e locomoção corporal [5, 14].

Os três tipos de músculos possuem diferentes particularidades. Nesse caso, tanto o músculo estriado esquelético quanto o estriado cardíaco, possuem contração rápida. No entanto, estes se diferenciam pela forma de controle de ação [14].

O músculo estriado esquelético possui contração voluntária, ou seja, se contrai a partir de estímulos neurais e vontade própria do indivíduo [5]. Enquanto isso, a musculatura estriada cardíaca e lisa, possuem contração involuntária, sendo ainda este último, caracterizado por apresentar contração lenta [5, 14].

A palavra “músculo” é originária do Latim e devido a sua semelhança, tem como significado a palavra “rato” (*musculus* = rato) [15]. Músculos podem variar em relação ao tamanho e forma, de acordo com a função [7, 15].

O tecido muscular esquelético possui como característica o formato alongado, composto por estrias transversais e diversos núcleos [5]. Além disso, contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos formados por proteínas e são capazes de transformar energia química em energia mecânica [5]. O músculo estriado esquelético (MEE) é altamente organizado e composto por unidades motoras denominadas “sarcômeros” [7].

Um dos fatores mais importantes do MEE é sua capacidade de adaptação [16–18]. Nesse sentido, protocolos de exercícios podem causar alterações significativas na sua constituição, tanto na sua morfologia como nos parâmetros biomoleculares [19].

Basicamente, existem duas formas principais de exercícios e são classificados de acordo com o predomínio do seu metabolismo [20]. Enquanto exercícios prolongados são denominados como aeróbios, exercício com alta intensidade e de curta duração, são denominados como anaeróbios [21].

Na classe de exercícios anaeróbios, podem ser incluídos os exercícios resistidos, também denominados como exercícios contra resistência [22, 23]. Esta forma de exercícios é caracterizada pelo uso de sobrecarga e estão relacionados principalmente como o aumento do tônus e força muscular [23]. Essa adaptação ocorre a partir de alterações neuromotoras e miofibrilares, especialmente nos componentes de actina e miosina, fenômeno conhecido como “hipertrofia muscular” [24–26].

2.2 Hipertrofia muscular

Hipertrofia é fenômeno que ocorre no tecido muscular e resulta no aumento do diâmetro miofibrilar [27]. Essa adaptação é caracterizada pelo aumento dos componentes de actina e miosina e resultam no aumento da força de contração muscular [21].

Em esportes de alto rendimento, a hipertrofia é crucial para o desempenho esportivo, visto que essa adaptação, está diretamente ligada ao aumento da tensão muscular, e conseqüentemente, ao aumento da força do indivíduo [28]. Nesse caso, a utilização do treinamento resistido, tem sido uma das alternativas mais eficientes para o aumento da força muscular [28, 29].

O processo hipertrófico está relacionado à forma que o estímulo é aplicado e resulta na liberação de hormônios na corrente sanguínea [30]. Dentre estes, podem se destacar o hormônio do crescimento (GH) e fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) [30, 31].

Além disso, o mecanismo de adaptação muscular, pode ser controlado indiretamente pela ação dos inibidores de miostatina [30]. A miostatina é um regulador negativo do crescimento do músculo esquelético, secretado pelos miócitos esqueléticos e o treinamento resistido parece ser uma forma de inibir a ação desse regulador [30, 32].

Somado a esses fatores, a inervação neurológica é um importante componente do processo hipertrófico, visto que uma parcela significativa do aumento da força física, deve-se à inervação do motoneurônio nas fibras musculares [33]. Essa inervação é denominada

de junção neuromuscular e possibilita a passagem do impulso nervoso oriundo do sistema nervosa central para as fibras musculares esqueléticas [10].

Estima-se que cerca de 60% dos ganhos de força que ocorrem nas oito primeiras semanas de treinamento, são decorrentes de adaptações neurais [34, 35]. Essas adaptações são fundamentais para o aumento de força do indivíduo, pois quanto maior a inervação, maior o número de fibras recrutadas e conseqüentemente, maior geração de força motora [4].

Sendo assim, observa-se que os ganhos de força no tecido muscular ocorrem de forma simultânea. Nesse caso, o predomínio do ganho de força em função da adaptação neural parece ocorrer predominantemente no início do protocolo de treinamento, enquanto a adaptação sarcoplasmática é maior após oito semanas de realização do treinamento resistido.

2.3 Junção neuromuscular

Junção neuromuscular (JNM) é a região que une o neurônio motor ou motoneurônio à fibra muscular esquelética [10]. Esse mecanismo facilita a comunicação entre o motoneurônio e as fibras musculares e pode ser dividido em três partes: pré-sinapse, células de Schwann perissinápticas e pós-sinapse [9, 36].

A JNM possui uma terminação nervosa que fica localizada na região pré-sináptica. Essa região é conhecida também conhecida como “zona ativa” [36]. Essa junção permite a propagação do impulso nervoso e assim, a partir da liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh), têm-se a aproximação dos miofilamentos de actina e miosina e assim, dá-se início ao processo de contração muscular [36, 37].

Desse modo, a funcionalidade da JNM parece estar relacionada à prática de exercícios físicos. Alguns achados demonstraram que o exercício aeróbio trouxe benefícios a roedores que se exercitaram em esteira rolante [8]. Essas adaptações resultaram na diminuição da área terminal nervosa e na preservação da JNM com o decorrer da idade [8, 38].

Além disso, estudos demonstram que o exercício resistido pode ser capaz de causar adaptações nas JNM do MEE [11, 36]. Nesse caso, os resultados revelaram que o

treinamento induz a remodelação da JNM foi evidente na região da placa terminal pós-sináptica das miofibras de contração rápida do músculo Sóleo [11].

O músculo Sóleo tem como característica o predomínio de fibras de contração lenta (oxidativas). No entanto, esse achado pode estar relacionado à especificidade do exercício físico, que no caso da escalada, está mais propenso em gerar adaptações em fibras de contração rápida, também denominadas como glicolíticas ou fibras do tipo II [39, 40].

A literatura mostra que exercícios resistidos são meios eficientes para o aumento da força muscular. Esta constatação se observa principalmente na geração de adaptações em fibras glicolíticas, uma vez que a especificidade do TR, promove maiores ganhos nesse tipo de musculatura [2, 24].

Um outro estudo realizado em animais, verificou os efeitos do treinamento em escalada no músculo Plantar, que possui predomínio de fibras de contração rápida [10]. Após a obtenção dos resultados, os autores verificaram que o treinamento resistido promoveu adaptações na área pós-sináptica do músculo.

Diferentemente do músculo Sóleo, o predomínio do tipo de fibras glicolíticas é maior no músculo Plantar [10]. No entanto, a partir dos estudos citados anteriormente, essas características parecem não ser determinantes em termos de adaptação na região pós-sináptica do músculo esquelético [10, 24]. Sendo assim, o exercício resistido parece ser uma maneira eficaz na geração de adaptações na JNM.

2.4 Teste de força

A realização de avaliações físicas durante o desenvolvimento de protocolos de treinamento é essencial para a melhora da forma física do atleta. Medidas antropométricas e testes de força podem fornecer informações importantes para a escolha da metodologia de treino que será utilizada por técnicos e treinadores [41–43].

Dentre diversas formas de avaliação da força física, tem-se o teste de 1RM, também denominado como teste de uma repetição máxima. Embora o teste de 1RM não necessite do uso de equipamentos sofisticados, é uma forma de avaliação que pode ser considerada como “padrão ouro” em termos de mensuração da força muscular [44].

O teste de 1RM é realizado muitas vezes em academias de musculação ou em ambientes que possibilitem a realização de exercícios com peso. A vantagem do teste de

1RM é o relativo “baixo custo”, uma vez que os equipamentos de musculação já estão disponíveis para uso nesses ambientes.

Nesse sentido, o teste de 1RM demonstra ser um teste de fácil aplicação, de baixo custo e possibilita a obtenção de resultados confiáveis [45, 46]. O teste de 1RM tem sido amplamente utilizado em humanos, no entanto, alguns estudos fizeram sua utilização em modelos animais.

Em estudos envolvendo animais, Ozaki et al., verificaram o parâmetro de força física a partir de testes de 1RM em diferentes modelos de exercícios [47]. Dentre diversas modalidades avaliadas, o exercício em escalada foi uma das modalidades testadas pelos pesquisadores.

Já Leite et al. [48], utilizaram um protocolo de treinamento resistido para avaliar parâmetros de pressão arterial e composição corporal de ratos Wistar. Nesse caso, os autores utilizaram um modelo de teste com cargas progressivas, que a partir de incrementos, foi obtida a força máxima dos animais no momento em que se estabelecia a exaustão [48].

Nesse sentido, testes de força podem trazer informações importantes em termos de capacidades físicas em seres humanos e em modelos experimentais [12, 47]. Essas informações podem ser utilizadas como parâmetros de comparação e indicam aumento, estabilização ou diminuição da capacidade de força física [49].

Mensurações durante os períodos de treinamento são essenciais para que os treinadores mantenham a capacidade física do atleta em níveis elevados [50]. Esse ajuste é fundamental para o rendimento desportivo e performance motora [51].

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as possíveis alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais nas junções neuromusculares do músculo flexor radial do carpo de ratos Wistar, mediante a realização de diferentes protocolos de escalada vertical.

3.1 Objetivos específicos

- a) Mensurar a área de secção transversa e densidade do músculo esquelético após diferentes estímulos;
- b) Analisar a remodelação colágenas após a realização de diferentes formas de treinamento em escalada;
- c) Investigar possíveis efeitos do treinamento resistido na tipagem das fibras musculares;
- d) Mensurar a área de composição da região pós-sináptica da junção neuromuscular após realização do treinamento de escalada com e sem sobrecarga
- e) Observar as possíveis alterações nas características das junções neuromusculares nos diferentes grupos experimentais;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos Wistar, adultos (90 dias de idade), distribuídos em 4 grupos distintos: Controle (C) (n=8): não serão submetidos a nenhum protocolo; Treinamento Livre (TL) (n=8): serão submetidos ao treinamento em escada vertical sem sobrecarga; Treinamento com Carga (TC) (n=8): serão submetidos ao treinamento em escada vertical com sobrecarga; Treinamento Intercalado (TI) (n=8): serão submetidos ao treinamento em escada vertical, sem e com sobrecarga em dias/sessões intercaladas.

Todos os animais foram obtidos do Biotério Central e foram mantidos em caixas de polietileno, com cinco (05) animais por caixa. A temperatura foi controlada em $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ em períodos claro/escuro de 12h e com água e ração balanceada “*ad libitum*”. Todos os procedimentos apresentados nesse estudo, foram submetidos ao Comitê de Ética e Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista – UNESP, câmpus de Rio Claro e após a aprovação, foram acompanhados pela responsável técnica e médica veterinária Dra. Patricia Gomes Wehmuth Cassab CRMV nº 26257.

4.2. Protocolos de Treinamento

Grupo TL: Os animais realizaram 9 escaladas sem sobrecarga, com intervalo de 1 minuto entre as repetições. Este protocolo foi repetido 3x/semana, durante o período de 8 semanas, com um total de 24 sessões de treinamento.

Grupo TC: Os animais realizaram de 4 a 9 escaladas com sobrecargas, referentes à massa corporal de cada animal e foram reajustadas semanalmente. A intensidade de esforço representou 50%, 75%, 90% e 100% da massa corpórea, respectivamente, durante as 4 primeiras escaladas.

A partir da 5ª escalada, foram adicionados 30g de sobrecarga de forma progressiva, até a exaustão ou até que se completem 9 escaladas. Este protocolo foi repetido 3x/semana durante o período de 8 semanas, com um total de 24 sessões de treinamento. A 1ª e a 24ª semanas foram utilizadas para aplicação do teste de carga máxima e avaliação da capacidade de força máxima de cada animal [52, 53].

Grupo TI: Os animais realizaram esforços de forma alternada entre as sessões de treinamento. Dessa forma, realizaram os dois protocolos descritos anteriormente, iniciando com uma sessão de treinamento com sobrecarga. Os treinos foram realizados 3x/semana

durante oito semanas, com total de 12 sessões com sobrecarga e 12 sessões de treinamento de forma livre (sem sobrecarga).

4.3. Massa Corporal e Massa Muscular

A massa corporal dos animais dos grupos TR e TI foi mensurada semanalmente para estabelecimento das cargas de treinamento. Para a mensuração, foi utilizada uma balança digital (TOMATE SF400®).

Além disso, a massa muscular (músculo flexor radial do carpo direito) foi mensurada após a sua dissecação em todos os grupos experimentais. Para a mensuração foi utilizada uma balança semi-analítica (Marte Científica® AD330), e os dados obtidos foram utilizados para comparação entre os grupos experimentais.

4.4. Coleta das amostras

4.4.1 Microscopia de Luz

4.4.2 Área de secção transversa

Após o final do experimento, os animais foram eutanasiados com *overdose* de Cloridrato de Cloridrato de Quetamina (70 mg/kg) e Xilasina (15 mg/kg), via intraperitoneal [54, 55]. Em seguida foram coletadas e dissecadas as amostras do músculo flexor radial do carpo (musculatura atuante no movimento de escalada vertical). Em seguida, as amostras foram untadas em talco neutro (Tragacanth, SIGMA) e congeladas em nitrogênio líquido (-196°C), para posterior armazenamento (Freezer com temperatura de -80°C).

Foram realizados cortes longitudinais de 05 µm de espessura, corados com a técnica de Hematoxilina-Eosina para destaque dos núcleos celulares e sarcoplasma. Em seguida, foram fotomicrografadas e observados em luz normal e polarizada. Para isso, foi utilizado um microscópio da marca Nikon®, modelo H550S.

Para a análise das imagens, foi utilizada uma câmera fotográfica Infinity 1. As marcações interativas, para a determinação da área de secção transversa (AST), foram feitas com o software (Auxio VisionRel 4.81 - Carl Zeiss® e NIS-Elements D3.0 2- SP7 - Nikon®). Foram observadas 100 fibras musculares em cada lâmina, de acordo com o protocolo estabelecido por Dal Pai [56] e utilizado por Castoldi et al. [40].

4.4.3 Colágeno intersticial

Foi utilizada a coloração com Picrosirius para identificação do colágeno intersticial [57]. As imagens das lâminas fotografadas, foram binarizadas por meio do software ImageJ®, e a dimensão fractal foi estimada (Figura 1) [58–60].

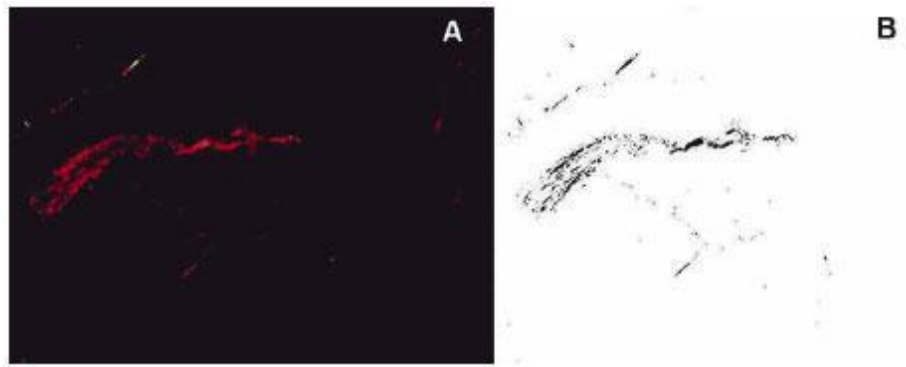


Figura 1. Imagem do músculo esquelético corado com picrosirius com colágeno originalmente em vermelho, revertido para preto, para realizar a medição da dimensão fractal. A) Imagem original, corada por picrosirius. B) Resultado da binarização, imagem pronta para análise fractal. Aumento de 100x. [60]

4.4.4 Índice de fator de forma

A forma da miofibra foi avaliada usando o índice do fator de forma (IFF). IFF é um derivado do “Formfactor” e representa uma expressão adimensional da forma do objeto, com valores acima de 1,00 mostrando desvio de um círculo [61]. As miofibras cortadas no plano transversal, têm formas poliédricas em vez de circulares e têm valores acima de 1,00, com valores maiores indicando mais desvio de forma.

Segundo Soendenbroe *et al.* [61], um IFF aumentado, significa que uma miofibra tem um perímetro maior em relação à sua área [61–63]. O IFF foi calculado para cada miofibra, usando os valores medidos de área de secção transversa (AST) e perímetro, a partir da fórmula:

$$\frac{\text{Perímetro}^2}{(4 \times \pi \times \text{ACT})}$$

4.5. ATPase Miofibrilar

Foram realizados cortes transversais de 10 µm de espessura, do músculo flexor radial do carpo. Essas amostras, foram incubadas em solução contendo 10 mg de ATP dissolvidos, adicionadas em conjunto com 10ml de glicina/tampão NaCl, CaCl₂ atingindo o pH 9,4 adicionado com DTT [64].

Os cortes foram lavados em água destilada e incubados em cloreto de cobalto 2%. O processo de lavagem e incubação foi repetido 3 vezes. Ocorreu uma nova lavagem das amostras em água destilada e desidratação em séries ascendentes de álcoois finalizadas em xilol.

Após a finalização das lâminas, para a análise das imagens, foi utilizada uma câmera fotográfica Infinity 1. As marcações interativas, para a determinação da área de secção transversa (AST), foram feitas com o software (Auxio VisionRel 4.81 - Carl Zeiss® e NIS-Elements D3.0 2- SP7 - Nikon®). Foram observadas 100 fibras musculares em cada lâmina, de acordo com o protocolo estabelecido por Dal Pai [56] e utilizado por Castoldi et al. [40] (Figura 2).

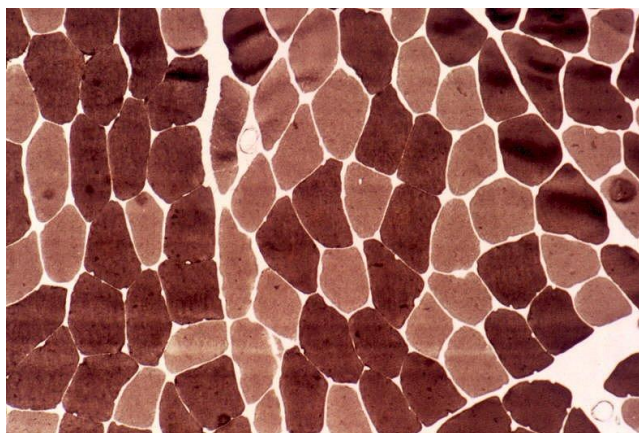


Figura 2. Corte transversal dos diferentes tipos de fibras musculares a partir da reação de ATPase Miofibrilar. Fonte: <https://anatpat.unicamp.br/musnormal.html> [65]

4.6. Análise da Densidade Numérica

Para o cálculo da densidade numérica, foi utilizado o software ImageJ®. Nesse caso, foram selecionadas 10 imagens com aumento de 100x. Em seguida, foi utilizada a opção “Multi Point Tool” e demarcados os tipos de fibras I, IIa e IIx das fibras transversais. Além

disso, foi estabelecida a quantidade de fibras de acordo com a tipagem, a média dos grupos e o cálculo percentual [64].

4.7. Imunofluorescência - Junção Neuromuscular (α -bungarotoxina)

As amostras do ventre muscular, foram destinadas para visualizar o componente pós-sináptico de cada junção neuromuscular. Para isso, foram realizadas secções longitudinais com espessura de 100 μm . Em seguida, as amostras foram lavadas seis vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 1% de albumina sérica bovina (ABS) e incubadas durante a noite (16h) em uma câmara umidificada a 4°C em solução contendo rodamina, conjugada com α -bungarotoxina (BTX; Molecular Probes, Eugene, OR-T-1175), diluída a 1: 600 em PBS [52, 53].

Após essa etapa, as amostras foram lavadas 6 vezes com PBS, contendo 1% de ABS revestidas com Prolong (Molecular Probes, Eugene, OR-P10144). Para morfometria, foram capturados 12 a 15 imagens com ampliação de 1000X, capturadas no Microscópio Confocal de Varredura e foram mensuradas sua área de composição e perímetro por meio do software ImageJ® (Figura 3).

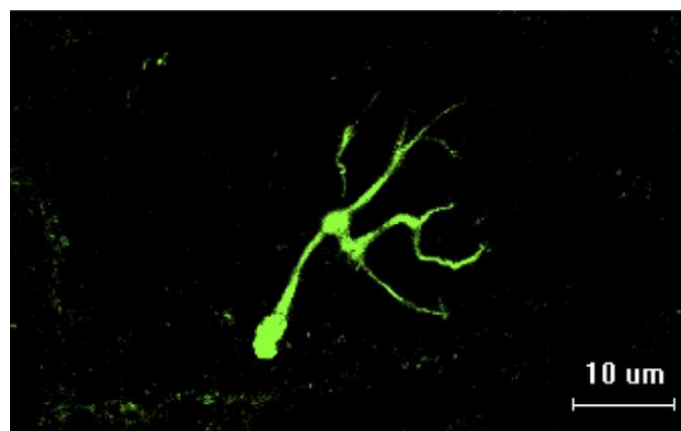


Figura 3. Imagem representativa do pré-sináptico corado com fluorescência ramificação terminal nervosa. A barra de escala é igual a 10 m. Fonte: Deschenes et al. [8]

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção dos dados, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e análise de variâncias (ANOVA) “Two-Way”, seguido pelo pós-teste de Tukey, para comparação entre os grupos. Para as variáveis que não apresentem distribuição normal na “curva Gaussiana”, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Todos os procedimentos adotaram o valor de significância de 5% ($p < 0,05$). Os cálculos foram realizados com o programa com pacote estatístico (SPSS 22.0 for Windows®).

6. RESULTADOS

Após obtenção dos resultados, foi verificado que apesar de reduzida nos grupos experimentais, a massa muscular não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) (Figura 2).

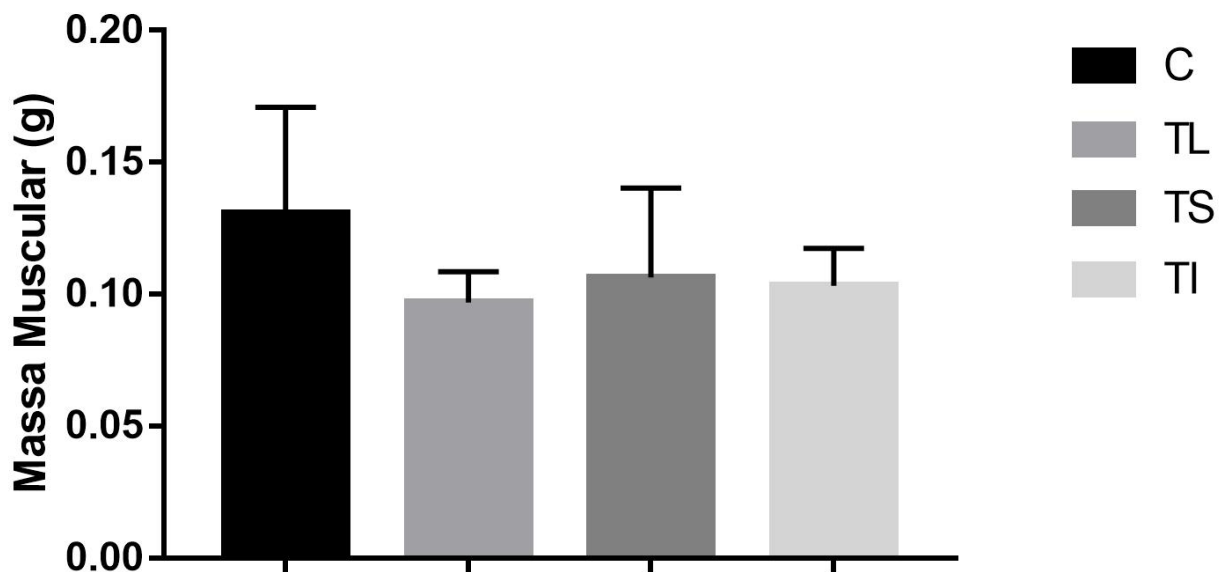


Figura 2. Médias e desvio padrão da massa muscular nos diferentes grupos experimentais. C): Controle; TL): Treinamento livre; TS): Treinamento com sobrecarga. TI): Treinamento intercalado. Análise de variâncias (ANOVA Two-Way), seguido pelo pós-teste de Tukey e significância de 5% ($p<0,05$).

6.1 Microscopia de Luz

Após obtenção dos cortes histológicos, foi possível verificar diferentes aspectos relacionados às colorações e ao trofismo das fibras do músculo flexor radial do carpo (Figura 3). Nesse caso, foi possível verificar alterações na área de secção transversa, especialmente dos grupos experimentais (TL, TS e TI), assim como na constituição das fibras colágenas, representadas pelos cortes corados com picrosirius.

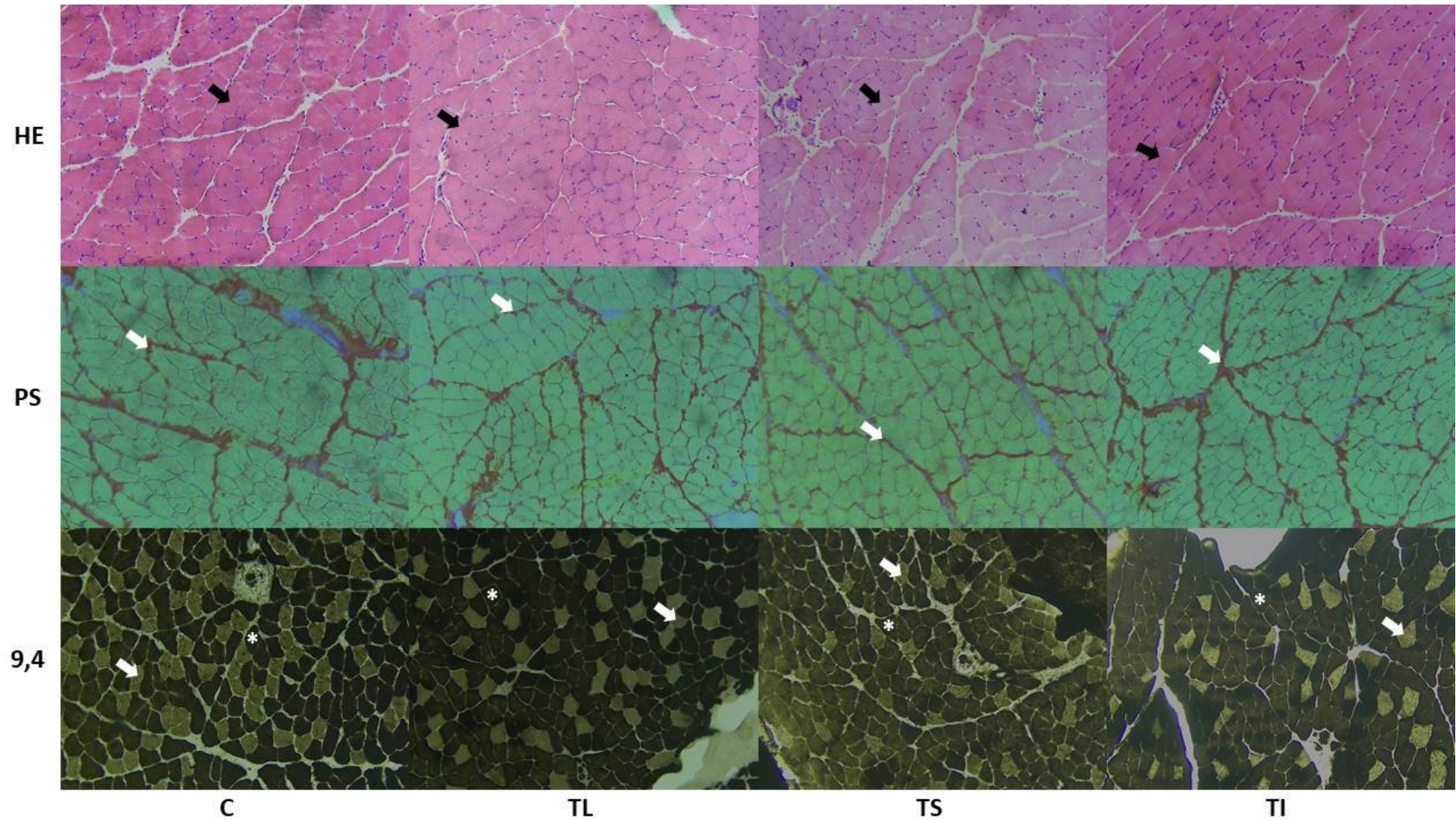
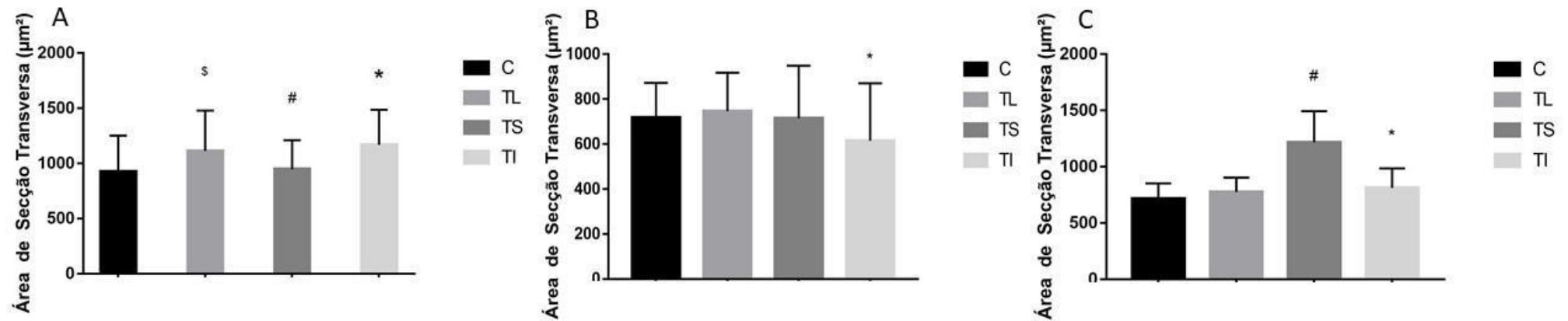


Figura 3. Cortes histológicos dos diferentes grupos de animais. (C): Controle; (TL): Treinamento Livre; (TS): Treinamento com Sobrecarga; (TI): Treinamento Intercalado. (HE): Cortes corados com Hematoxilina e Eosina; (PS): Cortes corados com Picrosirius; (9,4): ATPase miofibrilar em pH 9,4. Setas pretas indicam fibras musculares em HE; Setas brancas indicam colágeno intersticial em PS; Setas brancas indicam fibras oxidativas em pH 9,4; Asteriscos indicam fibras glicolíticas em pH 9,4.

Após análise morfométrica, foi verificado que os grupos experimentais apresentaram aumento na área de secção transversa (Figura 4A). Além disso, os grupos de animais TL e TI, demonstram maiores valores para essa variável ($p < 0,05$).

Após análise da área de secção (AST) das fibras oxidativas (fibras claras em PH 9,4), foi verificado que o grupo TI apresentou diminuição significativa para esta variável ($p < 0,05$). Além disso, o grupo TL apresentou aumento, enquanto o grupo TS demonstrou diminuição, no entanto, sem diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 4B).

Em relação à área de secção transversa das fibras glicolíticas (fibras escuras em PH 9,4), foi verificado que todos os grupos experimentais demonstraram aumento para esta variável. No entanto, foi verificada diferença significativa somente nos grupos TI e TS ($p < 0,05$) (Figura 4C).



Se tratando do colágeno, apesar de reduzidas nos grupos TL, TS e TI, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos de animais ($p>0,05$) (Figura 5A).

Após análise do índice de fator de forma (IFF), foi observado que o grupo TI demonstrou aumento significativo para esta variável ($p<0,05$) (Figura 5B). Além disso, os grupos TL e TS demonstraram leve redução, quando comparados ao grupo C, porém, sem diferença estatística ($p>0,05$).

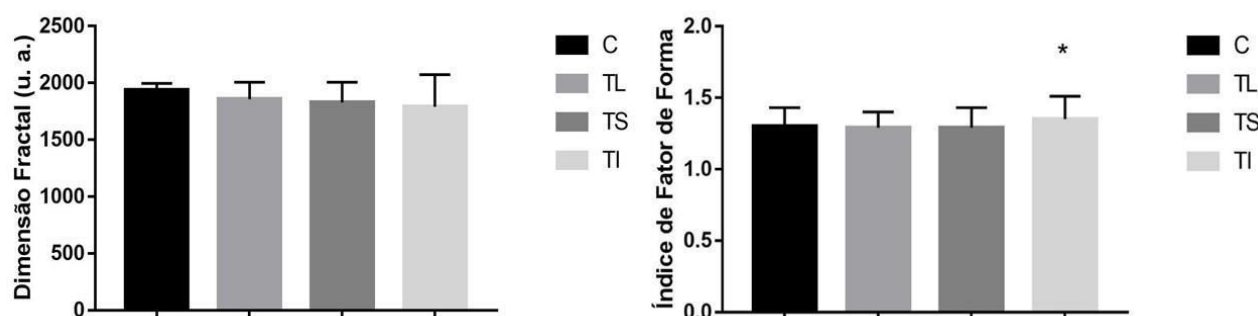


Figura 5. A): Valores de média e desvio padrão para variável dimensão fractal do colágeno intersticial do músculo flexor radial do carpo. Sem diferença significativa na comparação entre grupos ($p>0,05$). **Figura B):** Valores de média e desvio padrão para o índice de Fator de Forma dos diferentes grupos de animais. (*): Diferença significativa de TI em comparação a TS, TL e C. Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn com significância de 5% ($p<0,05$).

6.2 Junção Neuromuscular

Após análise da fenda pós-sináptica da junção neuromuscular, foram verificadas distintas morfologias nos diferentes grupos de animais. Além disso, os grupos TS e TI demonstraram maiores áreas para esta variável (Figura 6A).

Em relação à densidade da junção neuromuscular, foi verificado que as variáveis “área”, “fração da área” e “densidade integrada”, apresentou diminuição para todos os grupos experimentais (Figuras 6 - B, C e D, respectivamente). Além disso, houve diferença entre os grupos TI e TL em comparação ao grupo C ($p < 0,05$).

Após a contagem da junção neuromuscular, foi verificada redução da quantidade dessa variável em todos os grupos experimentais. Além disso, houve diferença significativa nos grupos TI e TS em comparação ao grupo C ($p < 0,05$) (Figura 6E).

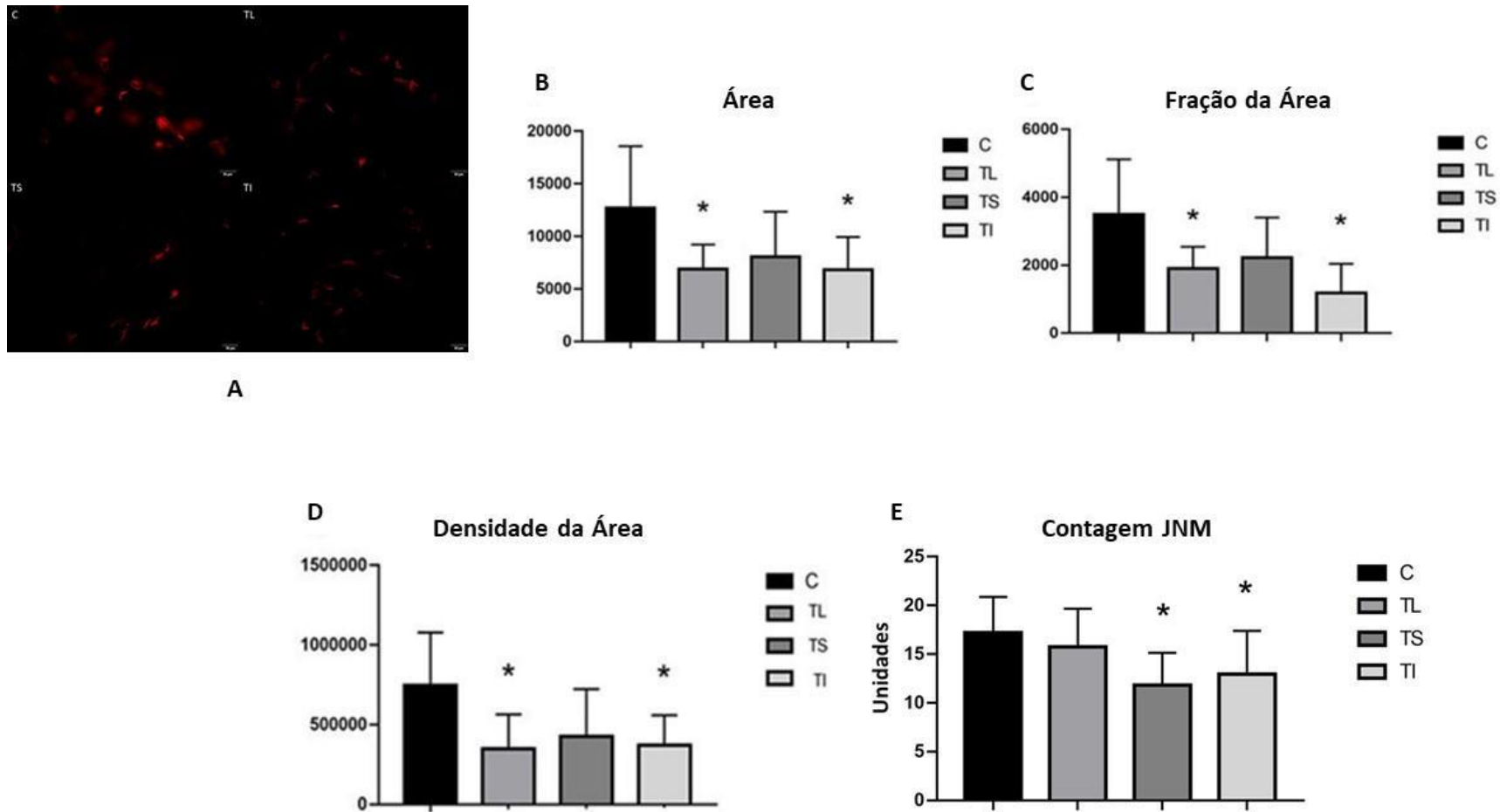


Figura 6. A): Representa a densidade da junção neuromuscular do músculo flexor radial. B) Valores de média e desvio padrão correspondentes à Área à junção neuromuscular; C): Fração da Área; D) Densidade Integrada. E): Contagem da junção neuromuscular. (*): Diferença significativa entre TI e TL em comparação ao grupo C para as variáveis Área, Fração da área e Densidade da área. (*):

Diferença estatística entre os grupos TS e TI, quando comparados a C para a variável Contagem da junção neuromuscular. Análise de variâncias (ANOVA Two-Way), seguido pelo pós-teste de Tukey e significância de 5% ($p < 0,05$).

Em relação à área total e área corada, foi verificado aumento no grupo TI e redução no grupo TL na área total e aumento no grupo TI para área corada, respectivamente ($p<0,05$) (Figura 7). Além disso, foi verificado o aumento no grupo TS para a variável área corada, porém, sem diferença estatística ($p>0,05$).

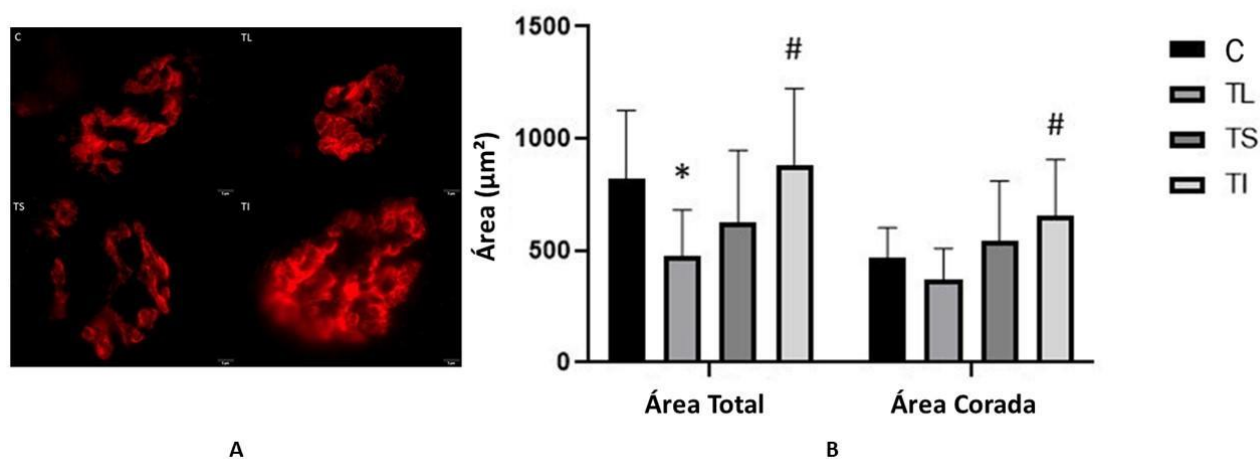


Figura 7. A): Representação dos receptores pós-sinápticos da junção neuromuscular do músculo flexor radial do carpo. B): Valores de média e desvio padrão para área total e área corada da junção neuromuscular. (*): Diferença estatística entre os grupos TL e C; (#): Diferença estatística entre os grupos TI, TL e TS para variável área total. (#): Diferença estatística entre os grupos TI e TL para a variável área corada. Análise de variâncias (ANOVA Two-Way), seguido pelo pós-teste de Tukey e significância de 5% ($p<0,05$).

Por fim, quando analisado o perímetro da junção neuromuscular, foi verificado que somente o grupo TI demonstrou aumento para a variável perímetro corado ($p<0,05$). Além disso, apesar de não demonstrarem diferença significativa, todos os demais grupos de animais mostraram redução para as variáveis perímetro total e perímetro corado, quando comparados aos grupos C ($p>0,05$) (Figura 8).

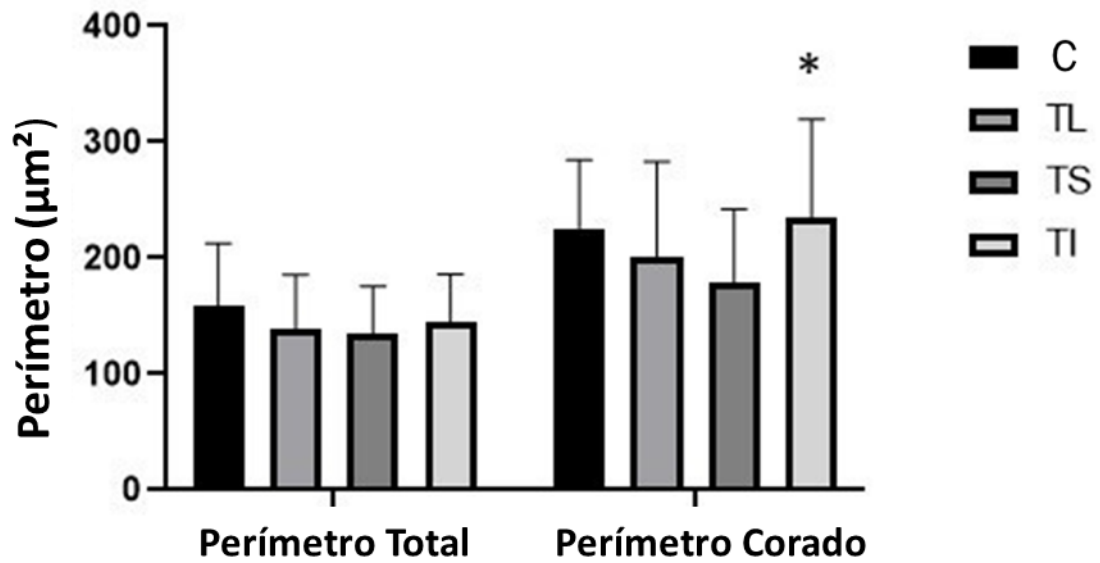


Figura 8. Valores de média e desvio padrão para perímetro total e perímetro corado da junção neuromuscular do músculo flexor radial do carpo. (*): Diferença estatística entre os grupos TI e TS. Análise de variâncias (ANOVA Two-Way), seguido pelo pós-teste de Tukey e significância de 5% ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

O principal objetivo do estudo foi investigar os efeitos provocados pelo treinamento de forma livre, com sobrecarga e intercalado, na histologia e junção neuromuscular do músculo flexor radial do carpo de ratos *Wistar*.

Houve aumento na área de secção transversa em todos os grupos experimentais, especialmente em TI e TL ($p < 0,05$). Além disso, houve diminuição da AST das fibras oxidativas no grupo TI ($p < 0,05$), enquanto nas fibras glicolíticas, houve o aumento significativo nos grupos TS e TI ($p < 0,05$). Esses achados podem ser explicados em função da especificidade do modelo de treinamento utilizado [66]. Por se tratar de um protocolo realizado em escada vertical, é de se esperar que essa adaptação esteja voltada à fibras de contração rápida (glicolíticas), uma vez que estas possuem como função predominante a geração de força muscular [4].

Um estudo realizado com ratos *Wistar*, observou o efeito de um protocolo de treinamento resistido (TR) no músculo estriado esquelético e verificou que 14 semanas de treinamento foram suficientes para aumentar a AST tanto em fibras oxidativas, quanto glicolíticas [39]. No entanto, vale ressaltar que o período utilizado nesse último caso foi maior do que no presente estudo, bem como a forma de treinamento, que consistiu de saltos aquáticos e não de escalada vertical, como é o caso da presente pesquisa.

Estudos anteriores demonstram que treinamento resistido pode resultar no aumento da AST [22, 23]. Nesse caso, é possível ressaltar que as adaptações musculares podem ser resultantes de diversos fatores, como idade, sexo e musculatura trabalhada. Além disso, variáveis de treinamento como intensidade, volume, frequência e forma de treinamento, podem ser determinantes na resposta muscular e no aumento da capacidade física [67, 68].

No estudo de Del Vecchio, realizado em humanos, foi utilizado um protocolo de treinamento de força com duração de quatro semanas. Após a conclusão do estudo, os autores verificaram o aumento da força muscular. Além disso, foi constatado que este aumento foi devido principalmente ao aumento da inervação de neurônios motores na musculatura estriada esquelética [23]. O treinamento físico (TF) tem como resultante o aumento das mais diversas capacidades físicas. Dentre essas, pode-se citar o aumento da força muscular e da resistência física. Nesse caso, enquanto o TR resulta no aumento da

força de contração, o treinamento de *endurance* resulta no aumento da resistência muscular.

A literatura mostra que exercícios resistidos são meios eficientes para o aumento da força muscular. Esta constatação se observa principalmente na geração de adaptações em fibras glicolíticas, uma vez que a especificidade do TR promove maiores ganhos nesse tipo de fibra muscular [24, 69].

Em relação à dimensão fractal, foi verificada leve diminuição em todos os grupos experimentais, porém, sem diferença estatística ($p > 0,05$). Tal achado confronta a literatura, uma vez que o colágeno parece demonstrar adaptações frente à realização do treinamento físico [70]. Apesar de não ter sido observada diferença significativa no presente estudo, o TF pode ser uma forma de estimular o “*turnover*” da matriz extracelular, especialmente das fibras colágenas. Nesse sentido, estudos têm demonstrado que o TF pode resultar no aumento do colágeno tipo I e III [70].

Já em relação ao IFF, houve aumento significativo somente no grupo TI ($p < 0,05$). Tal achado corrobora com o estudo de Soendenbroe et al., que utilizaram o IFF em humanos e animais. Os autores verificaram que os valores do IFF foram maiores em fibras do tipo II em comparação com fibras do tipo I. Além disso, em fibras de contração rápida do músculo Gastrocnêmio, o IFF pareceu variar de acordo com isótipos de fibras do tipo II, com valores crescentes de IIa para IIx e IIb [61]. Essas variações em fibras do tipo II podem ser explicadas em função da especificidade do TR, que nesse caso, está associado à adaptação predominantemente de fibras glicolíticas (tipo II). Dessa maneira, a forma do treinamento utilizado no presente estudo, pode ter contribuído para o aumento dos valores no grupo TI.

Em relação à junção neuromuscular. Foi observada diminuição da densidade, especialmente nas variáveis relacionadas à área, fração da área e densidade integrada nos grupos TL e TI ($p < 0,05$). Além disso, foi verificada diminuição na contagem da JNM nos grupos TS e TI ($p < 0,05$). Ademais, a área total demonstrou aumento significativo em TI e diminuição significativa em TL ($p < 0,05$). Já em relação à área corada, houve aumento significativo em TI ($p < 0,05$). Por fim, foi verificado aumento significativo do perímetro corado da JNM em TI ($p < 0,05$).

Foi verificado que o TI demonstrou melhores resultados quando comparados aos demais métodos de realização de treinamento em escalada. Nesse caso, os protocolos

realizados com o peso livre dos animais, assim como o treinamento com sobrecarga, podem ter influenciado negativamente na adaptação muscular e na JNM.

Sabe-se que a resposta muscular se dá em função do estímulo realizado pelo treinamento. Nesse caso, a realização do protocolo com peso livre parece não ter sido suficiente para aumentar as variáveis correspondentes à JNM, enquanto que o protocolo de treinamento com sobrecarga pode ter sido exaustivo e assim, resultado no acúmulo de fadiga, de forma que as adaptações não se demonstraram tão eficientes quanto o protocolo de treinamento intercalado.

As ciências do esporte atribuíram cinco princípios clássicos ao TF, dentre esses, está o “princípio da adaptação” que corresponde à capacidade do músculo se regenerar e se adaptar ao dano tecidual causado pelo TF. Diante deste contexto, para que ocorra melhora na capacidade física, o estímulo precisa ser suficiente para promover o estresse muscular, enquanto o período de recuperação deve corresponder ao período necessário para o reparo do dano tecidual [40, 66]. Sendo assim, a carga de treinamento precisa ser devidamente ajustada dentro de um modelo de periodização, de modo que ocorra o estímulo do TR e haja tempo suficiente para a recuperação. O controle dessas variáveis é fundamental para o aumento ou diminuição do desempenho físico.

O TF, especialmente o TR, pode ser um método capaz de estimular a JNM e assim, aumentar a inervação das fibras musculares pelos motoneurônios. Tal processo se deve a especificidade do treinamento que induz ao aumento da força de contração muscular e consequentemente, a maior geração de força muscular [66].

Um estudo realizado por Jacob et al., em animais da linhagem *Wistar*, verificou os efeitos do treinamento em escalada no músculo Plantar. Após a obtenção dos resultados, os autores verificaram que o TR promoveu adaptações na área pós-sináptica dessa musculatura [10]. O TR parece ser um meio eficiente para a promoção de adaptações na JNM, independentemente do predomínio do tipo de fibras musculares. No estudo realizado por Deschenes et al. [11], foram observados os efeitos do TR em animais jovens e idosos. Os resultados revelaram que a remodelação induzida pelo treinamento das JNM foi evidente na região da placa terminal pós-sináptica das miofibras de contração rápida do Sóleo. Esses achados salientam a ideia de que mesmo em músculos que possuem o predomínio de fibras de contração lenta, o TR pode causar adaptações nas fibras glicolíticas.

Por fim, em um estudo semelhante à presente pesquisa, Pimentel Neto et al. [71], verificaram os efeitos de diferentes protocolos de treinamento em escalada na JNM. Os pesquisadores utilizaram protocolos de escalada com e sem sobrecarga e verificaram de maneira geral, o treinamento com combinação de cargas foi mais efetivo tanto na adaptação das fibras musculares, quanto da JNM de ratos *Wistar*.

Sendo assim, o presente estudo colabora com a literatura ao investigar os efeitos do treinamento livre, com sobrecarga e intercalado na histologia e JNM de ratos *Wistar*. No entanto, algumas limitações devem ser ressaltadas, como a forma de treinamento utilizada (escalada) e a falta de análises referentes à quantificação proteica. Estudos futuros que busquem investigar, diferentes modelos de periodização, assim como a utilização de análises para a quantificação de proteínas, podem vir a colaborar com os resultados expostos até o momento.

8. CONCLUSÃO

Concluimos que os protocolos apresentados possuem eficácia na adaptação muscular do flexor radial do carpo com aumento da área de secção transversa em todos os grupos experimentais, em destaque o aumento das fibras tipo II nos grupos TR e TI que utilizaram sobrecarga extracorpórea. Além disso, o grupo TI apresentou aumento na área corada, total e no perímetro corado da JNM, dado que demonstra que a variabilidade de protocolos executados promove uma maior e mais eficaz adaptação neuromuscular com aumento da atividade dos receptores pós-sinápticos, enquanto que os grupos TL e TR apresentam maior especificidade com a redução dessas variáveis para possível ativação das fibras específicas quanto a carga carregada.

9. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF) e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Rio Claro – SP, pela possibilidade do desenvolvimento da pesquisa e a PROPe.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gentil P, de Lira CAB, Coswig V, et al (2021) Practical Recommendations Relevant to the Use of Resistance Training for COVID-19 Survivors. *Front Physiol* 12:1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.637590>
2. Hong AR, Kim SW (2018) Effects of resistance exercise on bone health. *Endocrinol. Metab.* 33:435–444
3. Castoldi RC, Akio G, Ozaki T, et al (2018) Alterations in Morphology and Aerobic Resistance of Rats Subjected to Different Physical Training Protocols. 36:1472–1479
4. Kraemer WJ, Ratamess NA, Flanagan SD, et al (2017) Understanding the Science of Resistance Training: An Evolutionary Perspective. *Sport Med* 47:2415–2435. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0779-y>
5. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J (2018) *Histologia básica: texto e atlas*, 13 edição
6. Herzog W (2017) Skeletal muscle mechanics: questions, problems and possible solutions. *J Neuroeng Rehabil* 14:98. <https://doi.org/10.1186/s12984-017-0310-6>
7. Mukund K, Subramaniam S (2020) Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 12:1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
8. Deschenes MR, Roby MA, Glass EK (2011) Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. *Neuroscience* 190:56–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.070>
9. Li L, Xiong W-C, Mei L (2018) Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu Rev Physiol* 80:159–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>
10. Jacob C dos S, Barbosa GK, Rodrigues MP, et al (2022) Stretching prior to resistance training promotes adaptations on the postsynaptic region in different myofiber types. *Eur J Histochem* 66:323–330. <https://doi.org/10.4081/ejh.2022.3356>
11. Deschenes MR, Sherman EG, Roby MA, et al (2015) Effect of resistance training on neuromuscular junctions of young and aged muscles featuring different recruitment patterns. *J Neurosci Res* 93:504–513. <https://doi.org/10.1002/jnr.23495>
12. Castoldi RC, Papoti M (2013) Concurrent training effect on muscle fibers in Wistar rats. *Motriz* 19:717–723
13. HALL SJ (2000) *Biomecânica básica*. Grupo Gen-Guanabara Koogan
14. POWERS, S. K.; HOWLEY ET (2014) *Exercise physiology: Theory and application to fitness and performance*, 8th ed. New York, NY
15. DUBOWITZ, Victor; SEWRY, Caroline A.; OLDFORS A (2020) *Muscle Biopsy E-Book: A Practical Approach*, 5th Editio. Elsevier Health Sciences
16. Philippe AG, Lionne C, Sanchez AMJ, et al (2019) Increase in muscle power is associated with myofibrillar ATPase adaptations during resistance training. *Exp Physiol* 104:1274–1285. <https://doi.org/10.1113/EP087071>

17. Castoldi RC, Aleixo PH, Pereira ACJ, et al (2017) Effects of concurrent training on muscle fibers of wistar rats submitted to standard and hypercaloric diets. *Int J Morphol* 35:. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000200041>
18. MacInnis MJ, Gibala MJ (2017) Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol* 595:2915–2930. <https://doi.org/10.1113/JP273196>
19. LOPEZ P, RADAELLI R, TAAFFE DR, et al (2021) Resistance Training Load Effects on Muscle Hypertrophy and Strength Gain: Systematic Review and Network Meta-analysis. *Med Sci Sport Exerc* 53:1206–1216. <https://doi.org/10.1249/MSS.00000000000002585>
20. Castoldi RC, Louzada MJQ, De Oliveira BRSM, et al (2017) Effects of aerobic, anaerobic, and concurrent training on bone mineral density of rats. *Motriz Rev Educ Fis* 23:. <https://doi.org/10.1590/S1980-6574201700010011>
21. Ozaki GAT, Filho JCSC, Castoldi RC, et al (2018) Adaptations of Muscle Tissue of Rats Submitted to Aerobic and Anaerobic Physical Training in Different Ergometer Models. *Int J Morphol* 36:1161–1167. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022018000401161>
22. Casolo A, Farina D, Falla D, et al (2020) Strength Training Increases Conduction Velocity of High-Threshold Motor Units. *Med Sci Sports Exerc* 52:955–967. <https://doi.org/10.1249/MSS.00000000000002196>
23. Del Vecchio A, Casolo A, Negro F, et al (2019) The increase in muscle force after 4 weeks of strength training is mediated by adaptations in motor unit recruitment and rate coding. *J Physiol* 597:1873–1887. <https://doi.org/10.1113/JP277250>
24. Dungan CM, Brightwell CR, Wen Y, et al (2022) Muscle-Specific Cellular and Molecular Adaptations to Late-Life Voluntary Concurrent Exercise. *Function* 3:1–18. <https://doi.org/10.1093/function/zqac027>
25. Fink J, Schoenfeld BJ, Nakazato K (2018) The role of hormones in muscle hypertrophy. *Phys. Sportsmed.* 46:129–134
26. Stokes T, Hector AJ, Morton RW, et al (2018) Recent perspectives regarding the role of dietary protein for the promotion of muscle hypertrophy with resistance exercise training. *Nutrients* 10
27. Mito AM, Castoldi RC, Camargo RCT, et al (2020) Effects of different swimming intensities on the bone properties of the tibia and femur of wistar rats in which knee rheumatoid arthritis was induced. *Int J Morphol* 38:. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022020000100043>
28. Deldicque L (2020) Protein Intake and Exercise-Induced Skeletal Muscle Hypertrophy: An Update. *Nutrients* 12:2023. <https://doi.org/10.3390/nu12072023>
29. Deldicque L, Atherton P, Patel R, et al (2023) Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle. 371–378. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00873.2007>.
30. Schiaffino S, Reggiani C, Akimoto T, Blaauw B (2021) Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy. *J Neuromuscul Dis* 8:169–183. <https://doi.org/10.3233/JND-200568>

31. Troib A, Guterman M, Rabkin R, et al (2016) Endurance exercise and growth hormone improve bone formation in young and growth-retarded chronic kidney disease rats. *Nephrol Dial Transplant* 31:1270–1279. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv373>
32. Abati E, Manini A, Comi G Pietro, Corti S (2022) Inhibition of myostatin and related signaling pathways for the treatment of muscle atrophy in motor neuron diseases. *Cell Mol Life Sci* 79:374. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04408-w>
33. CASOLO A, FARINA D, FALLA D, et al (2020) Strength Training Increases Conduction Velocity of High-Threshold Motor Units. *Med Sci Sport Exerc* 52:955–967. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002196>
34. Enoka RM (1988) Muscle Strength and Its Development. *Sport Med* 6:146–168. <https://doi.org/10.2165/00007256-198806030-00003>
35. Hickson RC, Hidaka K, Foster C (1994) Skeletal muscle fiber type, resistance training, and strength-related performance. *Med Sci Sports Exerc* 26:593–8
36. Pratt J, De Vito G, Narici M, Boreham C (2021) Neuromuscular Junction Aging: A Role for Biomarkers and Exercise. *Journals Gerontol Ser A* 76:576–585. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa207>
37. Nishimune H (2012) Active zones of mammalian neuromuscular junctions: formation, density, and aging. *Ann N Y Acad Sci* 1274:24–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06836.x>
38. Valdez G, Tapia JC, Kang H, et al (2010) Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci* 107:14863–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002220107>
39. Chacon Castoldi R, Giovana ;, Teixeira R, et al (2015) Effects of 14 Weeks Resistance Training on Muscle Tissue in Wistar Rats Efecto de 14 Semanas de Entrenamiento de Resistencia en el Tejido Muscular de Ratas Wistar
40. Castoldi RC, Giometti IC, Ozaki GAT, et al (2023) Resistance training and growth hormone (GH): effects on histology and typing of gastrocnemius muscle fibers. *Sport Sci Health*. <https://doi.org/10.1007/s11332-023-01091-7>
41. de Araujo RG, Castoldi RC, Dos Santos CC, et al (2017) Effects of HMB supplementation on body composition of rats. *Int J Morphol* 35:. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000200051>
42. Chacon Castoldi R, Akio G, Ozaki T, et al (2017) Morphometric Study of Muscle Fibers in Rats Submitted to Strength Training and Growth Hormone Estudio Morfométrico de las Fibras Musculares de Ratas Sometidos a Entrenamiento de la Fuerza Muscular y Hormona del Crecimiento
43. Sangali EB, Campos EZ, Castoldi RC, et al (2013) Comparison among different methods for the estimation of body fatness in Brazilian elite cyclists | Comparação entre diferentes métodos para estimativa de gordura corporal de ciclistas brasileiros de elite cyclists. *Rev da Educ Fis* 23:. <https://doi.org/10.4025/reveducfis.v23i3.14283>
44. FLECK, Steven J.; KRAEMER WJ (2017) Fundamentos do treinamento de força muscular
45. Borde R, Hortobágyi T, Granacher U (2015) Dose–Response Relationships of

Resistance Training in Healthy Old Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport Med* 45:1693–1720. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0385-9>

46. Cribb PJ, Williams AD, Stathis CG, et al (2007) Effects of whey isolate, creatine, and resistance training on muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc* 39:298–307. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000247002.32589.ef>
47. Ozaki GAT, Camargo Filho JCS, Garcia TA, et al (2022) EFFECT OF AEROBIC AND ANAEROBIC TRAINING ON DIFFERENT ERGOMETERS IN RAT MUSCLE AND HEART TISSUES. *Acta Ortopédica Bras* 30:2–6. <https://doi.org/10.1590/1413-785220223002e248048>
48. Leite RD, Durigan RDCM, de Souza Lino AD, et al (2013) Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism* 62:1477–1484. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.05.009>
49. Castoldi RC, Coladello LF, Koike TE, et al (2016) Efeitos da composição corporal na capacidade aeróbia de animais submetidos ao exercício de natação. *Brazilian J Kinanthropometry Hum Perform* 18:136. <https://doi.org/10.5007/1980-0037.2016v18n2p136>
50. Metaxas T, Mandroukas A, Michailidis Y, et al (2019) Correlation of Fiber-Type Composition and Sprint Performance in Youth Soccer Players
51. De Araujo GG, Papoti M, Dos Reis IGM, et al (2012) Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur J Appl Physiol* 112:839–852. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-2020-2>
52. Krause Neto W, de Assis Silva W, Ciená AP, et al (2017) Divergent effects of resistance training and anabolic steroid on the postsynaptic region of different skeletal muscles of aged rats. *Exp Gerontol* 98:80–90. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.018>
53. Lourenço Í, Krause Neto W, Santos Portella Amorim L, et al (2020) Muscle hypertrophy and ladder-based resistance training for rodents: A systematic review and meta-analysis. *Physiol Rep* 8:1–25. <https://doi.org/10.14814/phy2.14502>
54. Castoldi RC, Louzada MJQ, Oliveira BRSM de, et al (2017) Effects of aerobic , anaerobic , and concurrent training on bone mineral density of rats. *Mot rev educ fis* 23:71–75. <https://doi.org/10.1590/s1980-6574201700010011>
55. Garcia TA, Tamura Ozaki GA, Castoldi RC, et al (2018) Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. *Tissue Cell* 54:120–126. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.08.014>
56. Dal Pai V (1995) Histoenzimologia: teoria e prática
57. Bhutda S, Surve M, Anil A, et al (2017) Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. *BIO-PROTOCOL* 7:1–10. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2592>
58. Cury SS, Freire PP, Martinucci B, et al (2018) Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice. *Biochem Biophys Res Commun* 503:109–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.189>

59. Koike TE, Camargo RCT, Ozaki GAT, et al (2016) Morphometric and fractal analysis of injured skeletal muscle tissue subjected to a combination of treatments; cryotherapy and therapeutic ultrasound | Análisis de la morfometría y de la dimensión fractal en la lesión del tejido muscular esquelético expues. *Int J Morphol* 34:. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000300042>
60. Ozaki G, Camargo RCT, Koike TE, et al (2015) Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury. *Int J Morphol* 33:908–913. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000300017>
61. Soendenbroe C, Karlsen A, Svensson RB, et al (2023) Marked irregular myofiber shape is a hallmark of human skeletal muscle aging and is reversed by heavy resistance training. *bioRxiv* 2023.06.05.543651. <https://doi.org/10.1101/2023.06.05.543651>
62. Hepple RT, Mackinnon SLM, Thomas SG, et al (1996) Quantitating the capillary supply and the response to resistance training in older men. *Pfluegers Arch* 433:238–244. <https://doi.org/10.1007/s004240050273>
63. Russ JC, Neal FB (2018) *The Image Processing Handbook*. CRC Press
64. Sutlive TG, McClung JR, Goldberg SJ (1999) Whole-Muscle and Motor-Unit Contractile Properties of the Styloglossus Muscle in Rat. *J Neurophysiol* 82:584–592. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.2.584>
65. Anatomia Patológica. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Músculo esquelético normal. In: 2023. <https://anatpat.unicamp.br/musnormal.html>
66. Kraemer WJ, Flanagan SD, Volek JS, et al (2013) Resistance exercise induces region-specific adaptations in anterior pituitary gland structure and function in rats. *J Appl Physiol* 115:1641–1647. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00687.2013.-The>
67. Suchomel TJ, Nimphius S, Bellon CR, Stone MH (2018) The Importance of Muscular Strength: Training Considerations. *Sport Med* 48:765–785. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0862-z>
68. Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H (2016) Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med* 98:56–67. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>
69. Hong AR, Kim SW (2018) Effects of Resistance Exercise on Bone Health. *Endocrinol Metab* 33:435. <https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.4.435>
70. Kaasik P, Riso E-M, Seene T (2011) Extracellular Matrix and Myofibrils During Unloading and Reloading of Skeletal Muscle. *Int J Sports Med* 32:247–253. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270513>
71. Pimentel Neto J, Rocha LC, Dos Santos Jacob C, et al (2021) Postsynaptic cleft density changes with combined exercise protocols in an experimental model of muscular hypertrophy. *Eur J Histochem* 65:. <https://doi.org/10.4081/ejh.2021.3274>

11. Atividades realizadas durante o estágio de pós-doutoramento

Durante o período de realização do estágio de pós-doutoramento, além das atividades específicas realizadas em relação ao estudo apresentado, também foram realizadas outras atividades descritas a seguir que contribuíram para o estágio.

11. 1 Participação em eventos científicos

Durante o referido período de estágio participei dos seguintes congressos/encontros acadêmicos:

14º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. 2024. (Seminário);

Lifestyle Interventions in the Management of Obesity - Live Webinar. 2024. (Outra).

Uma abordagem participativa e sistemática para promover a atividade física para a saúde: da teoria à prática. 2024. (Outra).

V Cumbre Internacional de Educación - El profesorado en el centro de debate educativo. 2024. (Outra).

3rd BRISA symposium. 2023. (Simpósio).

Encontro Nacional de Ensino, Pesquisa e Extensão - ENEPE. 2023. (Encontro).

XI SIMPOSIO INTERNACIONAL DE FISILOGIA DO EXERCICIO. 2023. (Simpósio).

XV SIMPÓSIO DE EDUCAÇÃO FÍSICA DO OESTE PAULISTA. 2023. (Simpósio).

11.2 ARTIGOS SUBMETIDOS

Original Article

EFFECTS OF DIFFERENT VERTICAL LADDER RESISTED PROTOCOLS ON THE NEUROMUSCULAR JUNCTION OF THE FLEXOR CARPUS RADIALIS MUSCLE IN WISTAR RATS

Robson Chacon Castoldi^{1,2,3}, Jurandyr Pimentel Neto⁴, Samuel Campos Souza¹, Isabella Gomes^{1,2}, José Roberto Rodrigues da Silva¹, Paula Oliveira Camargo¹, Adriano Polican Ciena^{1,2,4}

¹ Laboratory of Morphology and Physical Activity-LAMAF, Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Rio Claro – SP.

² Postgraduate Program in Movement Sciences - Interunits – UNESP, Campus de Rio Claro – SP.

³ Postgraduate Program in Exercise in Health Promotion – UNOPAR.

⁴ Postgraduate Program in Biological Sciences (Cellular, Molecular Biology and Microbiology), Rio Claro Campus – SP.

Correspondence address

Dr. Robson Chacon Castoldi
Laboratório de Morfologia e Atividade Física – LAMAF
Endereço: Av. 24 A, 1515 - Jardim Bela Vista,
Rio Claro - SP, CEP: 13506-900
E-mail: castoldi_rc@yahoo.com.br

ABSTRACT

Introduction: The neuromuscular junction is the anatomical and functional region of communication between the peripheral nervous system and skeletal muscle tissue. Physical training positively alters muscle gain, as well as promoting adaptations to the structures involved in the process of muscle contraction. **Objective:** To investigate the effects of training in a vertical ladder protocol, freely, with overload, and interleaved, and the morphometric adaptations in the belly and neuromuscular junction. **Method:** Thirty-two adult *Wistar* rats were used, distributed into 4 groups (n=8/group): Control (C); Free Training (FT); Overload Training (OT); Interleaved Training (IT). Samples were collected from the flexor carpi radialis muscle. **Results:** There was an increase in the cross-sectional area in all experimental groups, especially the IT and FT ($p<0.05$). In addition, a decrease was observed in CSA of oxidative fibers in the IT group ($p<0.05$) and an increase in glycolytic fibers in the OT and IT groups ($p<0.05$). No differences were found in interstitial collagen ($p>0.05$) and there was an increase in SFI only in the IT group ($p<0.05$). When analyzing the NMJ, a decrease in density was observed in the FT and IT groups ($p<0.05$) and in the NMJ count, in the OT and IT groups ($p<0.05$). Furthermore, the variable total area showed an increase in IT and a decrease in FT ($p<0.05$). Regarding the stained area and stained perimeter, there was an increase in IT ($p<0.05$). **Conclusion:** Interleaved training led to greater adaptations at the neuromuscular junction when compared to the groups with and without overload.

Key-words: Physical Training, Neuromuscular Effect, Skeletal Muscle Fibers, Wistar Rats.

INTRODUCTION

Physical training (PT) is able to generate several adaptations in the human body and can be differentiated according to its specificity. When practiced regularly, PT is capable of promoting adaptations in cardiorespiratory capacity, strength, muscular endurance, flexibility, and neuromotor capacity [1–3]. Among several forms of PT, resistance training (RT) is characterized by the use of overloads with the main purpose of generating adaptations in the neuromotor system, which may be related to increased contractile strength, muscular resistance, muscular hypertrophy, and demand and release of acetylcholine receptors (Ach) [4].

The probable adaptations during physical training in skeletal striated muscle, which is characterized by its capacity to generate voluntary force, occur when muscle fibers contract [5]. The structural unit responsible for this phenomenon is called a sarcomere, composed of contractile proteins that interact and adapt to different stimuli, in order to structurally alter their conformation, a mechanism also known as “plasticity”, which consequently affects the myofibrillar typing morphologically, structurally, and functionally, depending on the established physical training protocol [6].

For a muscle contraction to occur, nerve impulses are sent by the central nervous system to the muscles, via the motor neuron, to the muscle fibers [7, 8]. This region where the motor neuron and muscle fibers meet is called the neuromuscular junction (NMJ). It is the site of communication between the axon terminal coming from the peripheral nervous system and the sarcolemma of the muscle fiber, the layer that covers the myofibril [9, 10].

Recently, studies carried out with an experimental model observed that PT can provide morphological adaptations that influence the functioning of this mechanism [11, 12]. RT is essential for promoting muscle hypertrophy and neuromuscular adaptation [11, 13].

Although several studies have addressed this topic, little is known about the use of models interleaved with the use of overload in muscle tissue, especially in the NMJ. These investigations could reveal the main modulations of the NMJ in different RT modalities and in the association between protocols with or without overloads. Thus, the morphological adaptive characteristics will possibly lead to innovative information on the NMJs in the flexor muscles of the forearm.

Therefore, the objective of the current study was to investigate the possible effects of performing vertical climbing training, freely, with overload, and interspersed, on the histology and neuromuscular junction of the flexor carpi radialis muscle in *Wistar* rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty-two adult *Wistar* rats (90 days old) were used, distributed into 4 distinct groups (n=8/group): Control (C): not subjected to any protocol; Free Training (FT): subjected to vertical climbing training without overload; Overload Training (OT): subjected to vertical climbing training with overload; Interleaved Training (IT): subjected to vertical climbing training, with and without overload on alternate days/sessions.

All animals were from the Central Animal Facility and were kept in polyethylene boxes, with five animals per box. The temperature was controlled at $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, with 12-hour light/dark periods, and *ad libitum* access to water and balanced food. All procedures presented in this study were approved by the Ethics Committee for Research with Animals. (CEUA) no. 26257.

Training Protocols

FT Group: The animals performed 9 climbs without overload, with a 1-minute interval between repetitions. This protocol was repeated 3x/week, during the 8-week period, with a total of 24 training sessions.

OT Group: The animals performed 4 to 9 climbs with an overload, corresponding to the body mass of each animal, which was readjusted weekly. The intensity of effort was determined at 50%, 75%, 90%, and 100% of the body mass, respectively, during the first 4 climbs.

From the 5th climb onwards, 30g of overload was progressively added until exhaustion or until 9 climbs were completed. This protocol was repeated 3x/week during the 8-week period, with a total of 24 training sessions [14, 15].

IT Group: The animals performed efforts alternately between training sessions. Thus, they performed the two protocols described above, starting with the training session with overload. The training sessions were performed 3x/week for eight weeks, with a total of 12 sessions with overload and 12 free-form training sessions (without overload).

Body Mass and Muscle Mass

The body mass of the animals in the OT and IT groups was measured weekly to establish the training loads using a digital scale (TOMATE SF400®).

In addition, muscle mass (right flexor carpi radialis muscle) was measured after dissection in all experimental groups. A semi-analytical scale (Marte Científica® AD330) was used to perform the measurement, and the data obtained were utilized for comparisons between the experimental groups.

Light Microscopy

After the end of the experiment, the animals were euthanized with an overdose of Ketamine Hydrochloride (70 mg/kg) and Xylazine (15 mg/kg), intraperitoneally [16, 17]. Samples of the flexor carpi radialis muscle (muscles involved in the vertical climbing movement) were collected and dissected. The samples were then coated in neutral talc (Tragacanth, SIGMA) and frozen in liquid nitrogen (-196°C), for later storage (Freezer - 80°C).

Cross-sections of 10 µm thickness were made and stained with the Hematoxylin-Eosin (HE) technique to highlight the cell nuclei and sarcoplasm. They were then photographed and observed under a bright field microscope. For this, a Nikon® microscope, model H550S, was used.

For image analysis, an Infinity 1 camera was used. Interactive markings were made to determine the cross-sectional area (CSA), using the software (Axiovision Rel 4.81 - Carl Zeiss® and NIS-Elements D3.0 2- SP7 - Nikon®). One hundred muscle fibers were observed on each slide, according to the protocol established by Dal Pai [18] and used by Castoldi et al. [19].

Interstitial collagen

Picrosirius staining was used to identify interstitial collagen [20]. The images of the photographed slides were binarized with ImageJ® software, and the relative area of collagen was estimated [21–23].

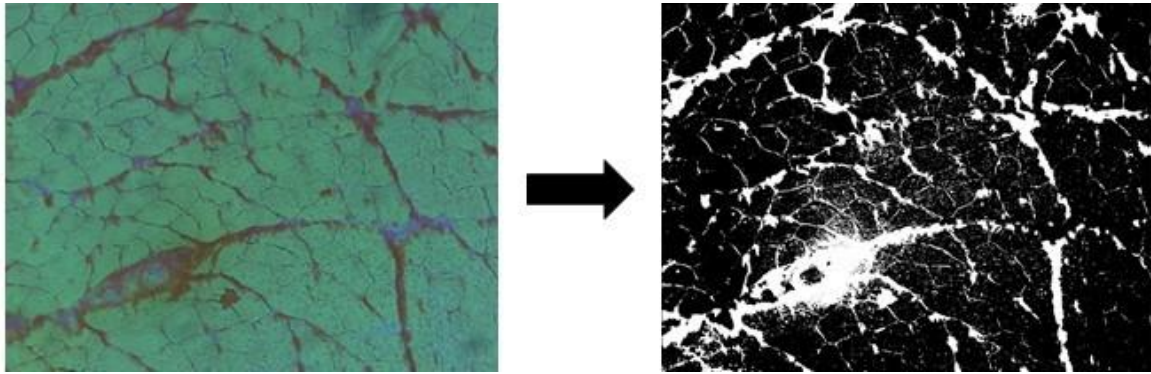


Figure 1. Binarization of histological sections from Picrosirius staining.

Shape factor index

Myofiber shape was assessed using the shape factor index (SFI). The SFI is a derivative of the “Shape factor” and represents a dimensionless expression of the object shape. According to Soendenbroe *et al.* [24], an increased SFI means that a myofiber has a larger perimeter relative to its area. The SFI was calculated for each myofiber using the measured values of cross-sectional area (CSA) and perimeter using the formula:

$$\frac{\text{Perimeter}^2}{(4 \times \pi \times \text{CSA})}$$

This form of measurement was based on previously used models [24–26].

Myofibrillar ATPase

Transverse sections of 10 µm thickness were made from the flexor carpi radialis muscle. These samples were incubated in a solution containing 10 mg of dissolved ATP, added to 10 ml of glycine/NaCl buffer, CaCl₂ reaching pH 9.4 added with DTT [27]. In this way, it was possible to identify glycolytic fibers (dark color) and oxidative fibers (light color).

The sections were washed in distilled water and incubated in 2% cobalt chloride. The washing and incubation process was repeated 3 times. The samples were then washed again in distilled water and dehydrated in ascending grades of alcohol, ending in xylene [27]. As well as the measurements of the cross-sectional area performed on the HE-stained

sections, an Infinity 1 camera was used, with software (Axiovision Rel 4.81 - Carl Zeiss® and NIS-Elements D3.0 2- SP7 - Nikon®) to measure the glycolytic fibers (type IIa and IIx) and oxidative fibers (type I).

Number Density Analysis

To calculate the numerical density, ImageJ® software was used. In this case, 10 images that had the least amount of artifacts and that presented intact muscle tissue for measurement were selected, all with a standardized magnification of 100x. The “Multi Point Tool” option was then used to mark the fiber types I, IIa, and IIx of the transverse fibers. In addition, the quantity of fibers according to the typing, the average of the groups, and the percentage calculation were established [27].

Immunofluorescence - Neuromuscular Junction (α -bungarotoxin)

The muscle belly samples were intended to visualize the postsynaptic component of each neuromuscular junction. For this purpose, longitudinal sections with a thickness of 100 μ m were performed. The samples were then washed six times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA) and incubated overnight (16 h) in a humidified chamber at 4°C in a solution containing rhodamine, conjugated with α -bungarotoxin (BTX; Molecular Probes, Eugene, OR-T-1175), diluted 1:600 in PBS [14, 15].

After this step, the samples were washed 6 times with PBS containing 1% ABS assembled with Prolong (Molecular Probes, Eugene, OR-P10144). For morphometry, 12 to 15 images were captured with 1000X magnification, captured in the Olympus BX61 fluorescence microscope of the Bacterial Genetics Laboratory (LGB), UNESP, Rio Claro, SP, Brazil and subsequently the NMJ density was measured, based on the variables: total perimeter; stained perimeter; total area; stained area; and dispersion using the ImageJ® software.

Statistical Analysis

After obtaining the data, the Shapiro-Wilk normality test and “Two-Way” analysis of variance (ANOVA) were performed, followed by the Tukey post-test, for comparison between the groups. For variables that did not present normal distribution in the “Gaussian

curve”, the Kruskal-Wallis test was used, with Dunn's post-test. All procedures adopted a significance value of 5% ($p < 0.05$). Calculations were performed using the SPSS 22.0 for Windows® program.

RESULTS

From the results, it was found that despite being reduced in the experimental groups, muscle mass values did not present a significant difference ($p > 0.05$) (Figure 2).

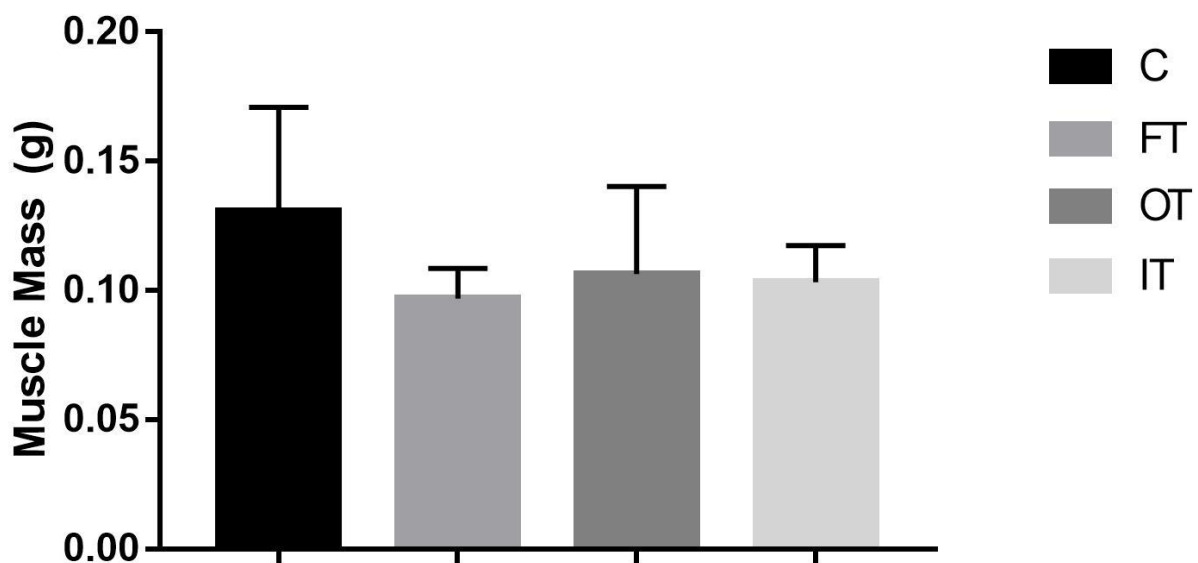


Figure 2. Means and standard deviations of muscle mass in the different experimental groups. C): Control; TL): Free training; TS): Overload training. TI): Interleaved training. Analysis of variance (Two-Way ANOVA), followed by Tukey's post-test and significance of 5% ($p < 0.05$).

Light Microscopy

After obtaining the histological sections, it was possible to verify different aspects related to the colors and trophism of the fibers of the flexor carpi radialis muscle (Figure 3). In this case, changes were observed in the cross-sectional area, especially in the experimental groups (FT, OT, and IT), as well as in the constitution of collagen fibers, represented by the sections stained with picrosirius.

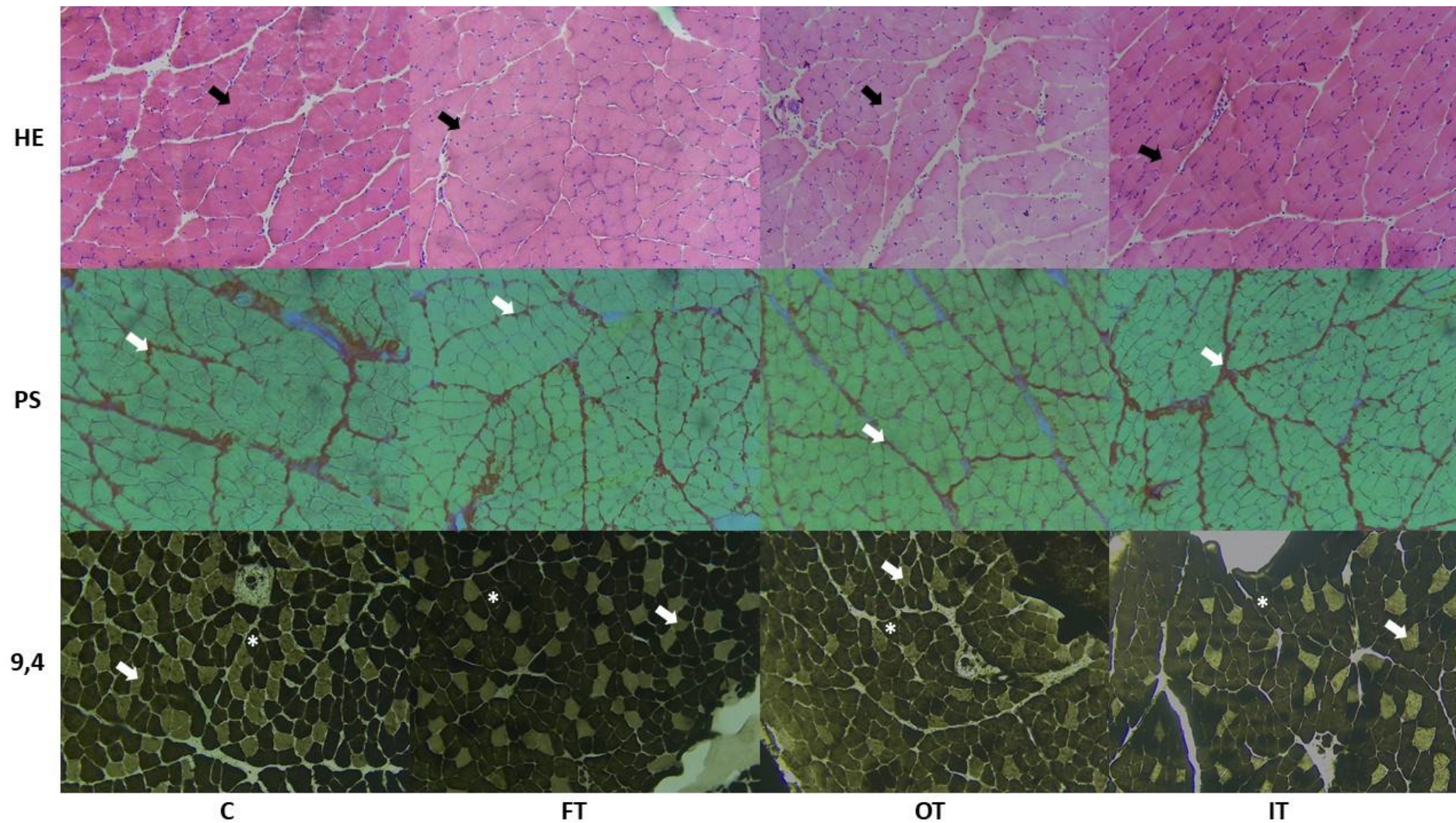


Figure 3. Histological sections of the different groups of animals. (C): Control; (FT): Free Training; (OT): Overload Training; (IT): Interleaved Training. (HE): Sections stained with Hematoxylin and Eosin; (PS): Sections stained with Picrosirius; (9.4): Myofibrillar ATPase at pH 9.4. Black arrows indicate muscle fibers in HE; White arrows indicate interstitial collagen in PS; White arrows indicate oxidative fibers at pH 9.4; Asterisks indicate glycolytic fibers at pH 9.4.

The morphometric analysis demonstrated an increase in the cross-sectional area that in the experimental groups (Figure 4A). In addition, the FT and IT animal groups demonstrated higher values for this variable ($p<0.05$).

In the analysis of the cross-sectional area (CSA) of the oxidative fibers (light fibers at pH 9.4), a significant decrease was found in the IT group ($p<0.05$). In addition, the FT group showed an increase and the OT group a decrease, however, without statistical difference ($p>0.05$) (Figure 4B).

Regarding the cross-sectional area of glycolytic fibers (dark fibers at pH 9.4), it was found that all experimental groups demonstrated an increase for this variable, with a significant difference only in the IT and OT groups ($p<0.05$) (Figure 4C).

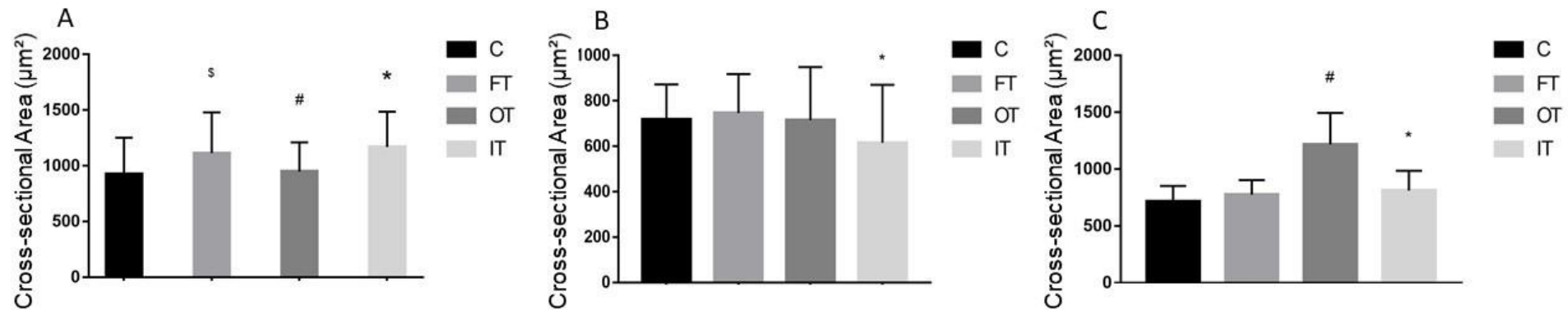


Figure 4. A): Mean and standard deviation values of the cross-sectional area of the flexor carpi radialis muscle stained with Hematoxylin and Eosin. (*): Significant difference in the comparison of the IT group with OT, FT, and C; (#): Significant difference in the comparison of the OT group with FT and C; (\$) : Significant difference in the comparison of the FT group with C. **Figure B):** Mean and standard deviation values of the cross-sectional area of type I fibers of the flexor carpi radialis muscle. (*): Significant difference between group IT when compared to groups FT and C. Reaction at pH 9.4. **Figure C):** Mean and standard deviation values of the cross-sectional area of type II fibers of the flexor carpi radialis muscle. (*): Significant difference between the IT group when compared to the OT and C groups; (#): Significant difference between the OT group when compared to the FT and C groups. Reaction at pH 9.4. Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test, with significance of 5% ($p < 0.05$).

Regarding collagen, despite being reduced in the FT, OT, and IT groups, no statistical differences were observed between the groups of animals ($p>0.05$) (Figure 5A).

With respect to the shape factor index (SFI), the IT group demonstrated a significant increase for this variable ($p<0.05$) (Figure 5B). In addition, the FT and OT groups presented a slight reduction when compared to the C group, however, without statistical difference ($p>0.05$).

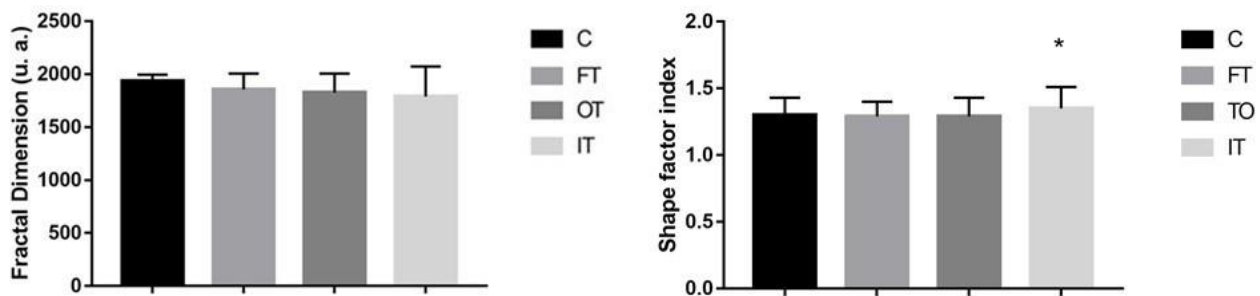


Figure 5. A): Mean and standard deviation values for the variable fractal dimension of the interstitial collagen of the flexor carpi radialis muscle. No significant difference in the comparison between groups ($p>0.05$). **Figure B):** Mean and standard deviation values for the Shape factor index of the different groups of animals. (*): Significant difference of IT compared to OT, FT, and C. Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test, with significance of 5% ($p<0.05$).

Neuromuscular Junction

In the analysis of the postsynaptic cleft of the neuromuscular junction, distinct morphologies were observed in the different groups of animals, with the OT and IT groups demonstrating larger areas for this variable (Figure 6A).

Regarding the density of the neuromuscular junction, the variables “area”, “area fraction”, and “integrated density” showed a decrease for all experimental groups (Figures 6 - B, C, and D, respectively). In addition, there was a difference between the IT and FT groups compared to group C ($p<0.05$).

After counting the neuromuscular junction, a reduction in the quantity of this variable was observed in all experimental groups. In addition, there was a significant difference in the IT and OT groups compared to group C ($p<0.05$) (Figure 6E).

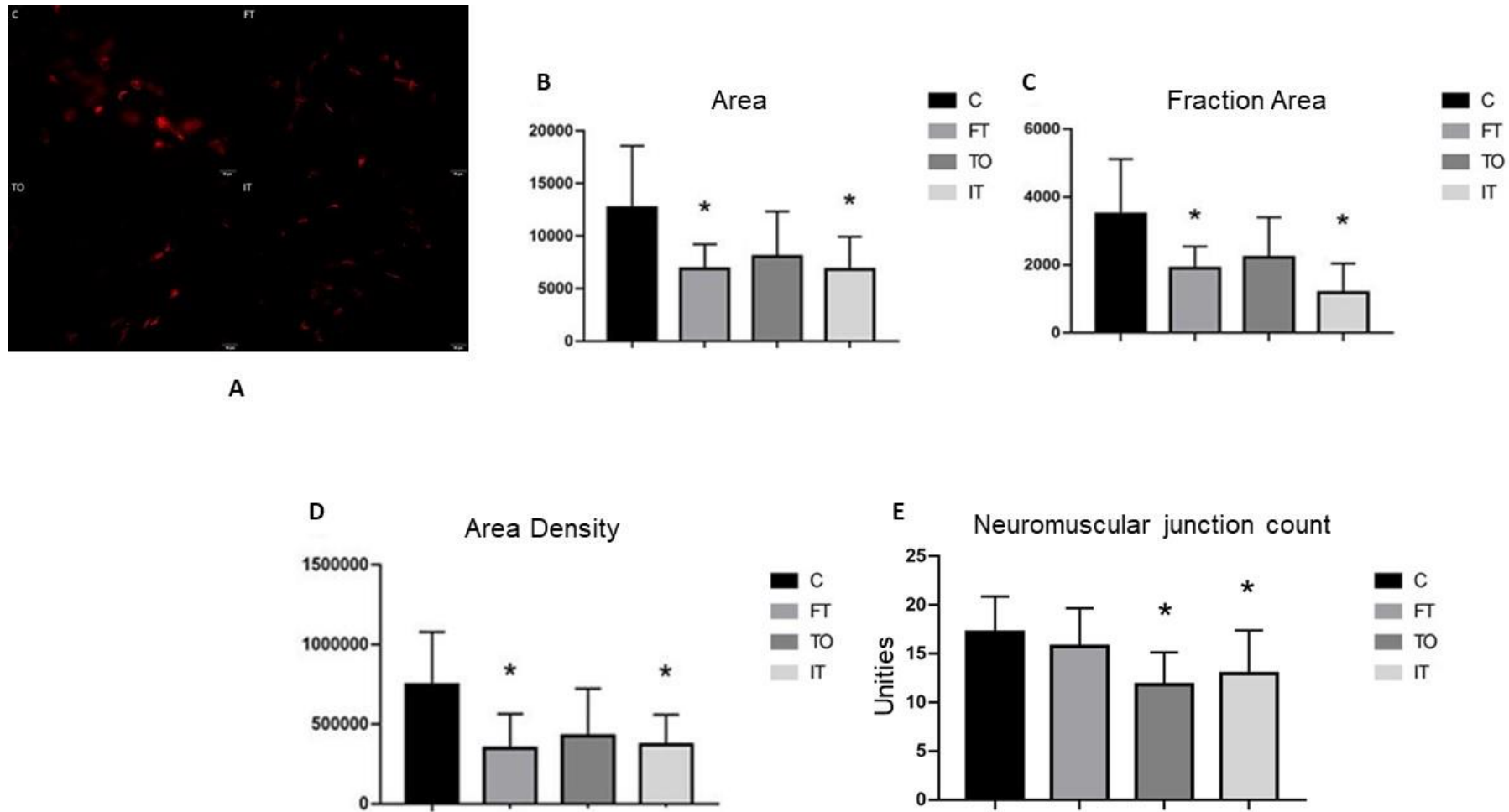


Figure 6. A): Represents the density of the neuromuscular junction of the radial flexor muscle. B) Mean and standard deviation values corresponding to the Area of the neuromuscular junction; C): Area fraction; D) Density Area. E): Neuromuscular junction count. (*): Significant difference between IT and FT compared to group C for the variables Area, Area fraction, and Area density. (*): Statistical difference between groups OT and IT, when compared to C for the variable Neuromuscular junction count. Analysis of variances (Two-Way ANOVA), followed by Tukey's post-test, with significance of 5% ($p < 0.05$).

Regarding the total area and stained area, an increase in the total area was observed in the IT group and a reduction in the FT group, as well as an increase in the stained area in the IT group ($p<0.05$) (Figure 7). In addition, an increase was observed in the OT group for the stained area variable, however, without statistical difference ($p>0.05$).

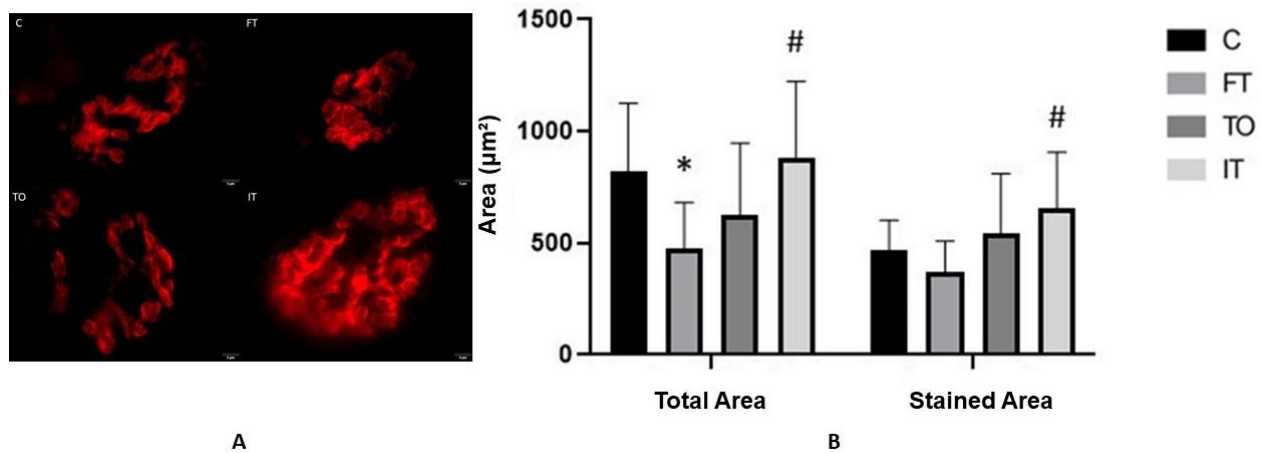


Figure 7. A): Representation of postsynaptic receptors of the neuromuscular junction of the flexor carpi radialis muscle. B): Mean and standard deviation values for total area and stained area of the neuromuscular junction. (*): Statistical difference between groups FT and C; (#): Statistical difference between groups IT, FT, and OT for the total area variable. (#): Statistical difference between groups IT and FT for the stained area variable. Analysis of variances (Two-Way ANOVA), followed by Tukey's post-test, with a significance of 5% ($p<0.05$).

Finally, when analyzing the perimeter of the neuromuscular junction, only the IT group demonstrated an increase for the stained perimeter variable ($p<0.05$). Furthermore, despite not demonstrating a significant difference, all other groups of animals showed a reduction for the total perimeter and stained perimeter variables, when compared to the C group ($p>0.05$) (Figure 8).

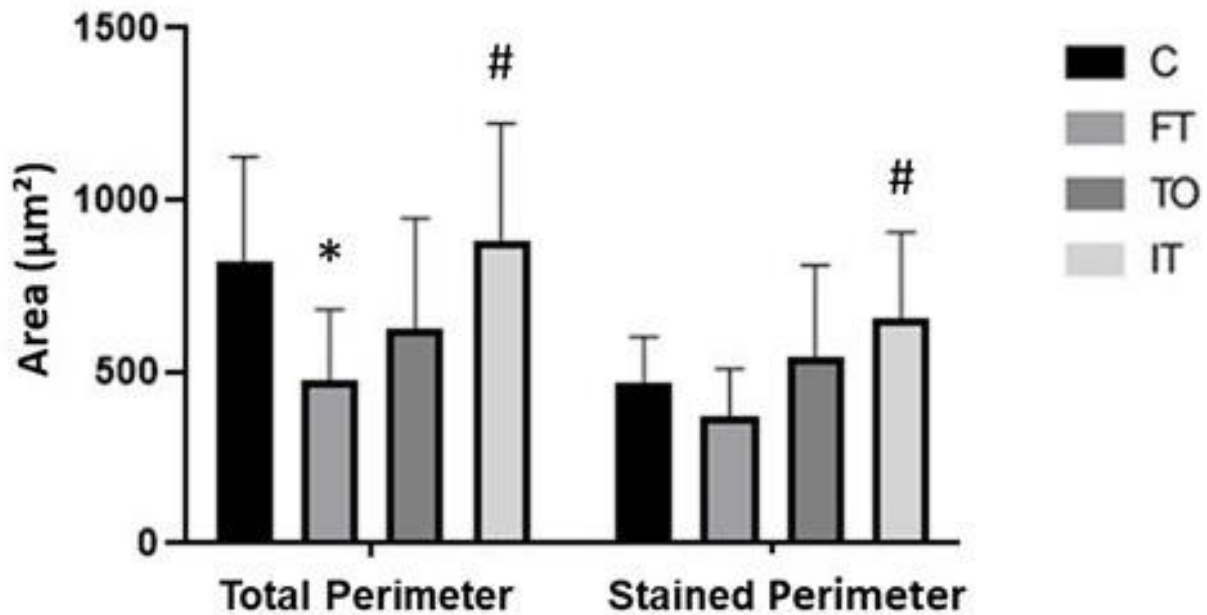


Figure 8. Mean and standard deviation values for total perimeter and stained perimeter of the neuromuscular junction of the flexor carpi radialis muscle. (*): Statistical difference between the IT and OT groups. Analysis of variance (Two-Way ANOVA), followed by Tukey's post-test, with a significance of 5% ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The main objective of the current study was to investigate the effects caused by free-form, overloaded, and interleaved training on the histology and neuromuscular junction of the flexor carpi radialis muscle in *Wistar* rats.

An increase in the cross-sectional area was observed in all experimental groups, especially the IT and FT ($p < 0.05$). In addition, there was a decrease in the CSA of oxidative fibers in the IT group ($p < 0.05$), while for glycolytic fibers, significant increases were found in the OT and IT groups ($p < 0.05$). These findings can be explained by the specificity of the training model used [28]; as this is a protocol performed on a vertical ladder, it is expected that this adaptation will be aimed at fast-twitch fibers (glycolytic), since their predominant function is to generate muscular strength [4].

A study carried out with *Wistar* rats observed the effect of a resistance training (RT) protocol on skeletal striated muscle and found that 14 weeks of training were sufficient to increase CSA in both oxidative and glycolytic fibers [29]. However, it is worth highlighting that the period used in the latter case was longer than in the present study, and the form of

training consisted of aquatic jumps and not vertical climbing, as is the case of the present research.

Previous studies demonstrate that resistance training can result in increased CSA [30, 31]. In this case, it is possible to emphasize that muscular adaptations can be the result of several factors, such as age, sex, and muscles worked. In addition, training variables such as intensity, volume, frequency, and training method can be decisive in the muscular response and in the increase in physical capacity [32, 33].

In the study of Del Vecchio, conducted with humans, a four-week strength training protocol was used, and at the end of the intervention, the authors observed an increase in muscle strength. Furthermore, it was found that this increase was mainly due to increased innervation of motor neurons in the skeletal striated muscles [31]. Physical training (PT) results in an increase in a wide range of physical capacities. Among these, we can mention an increase in muscular strength and physical resistance; in this case, while RT results in an increase in contraction force, endurance training results in an increase in muscular resistance.

The literature shows that resistance exercises are efficient for increasing muscle strength. This finding is mainly observed in the generation of adaptations in glycolytic fibers, since the specificity of RT promotes greater gains in this type of muscle fiber [2, 34].

Regarding the fractal dimension, a slight decrease was observed in all experimental groups, however, without statistical difference ($p > 0.05$). This finding conflicts with the literature, since collagen seems to demonstrate adaptations when performing physical training [35]. Although no significant difference was observed in the present study, PT may be a way to stimulate the turnover of the extracellular matrix, especially of collagen fibers. In this sense, studies have shown that PT can result in an increase in type I and III collagen [35].

Regarding SFI, there was a significant increase only in the IT group ($p < 0.05$). This finding corroborates the study by Soendenbroe et al., who used SFI in humans and animals. The authors found that SFI values were higher in type II fibers compared to type I fibers. Furthermore, in fast-twitch fibers of the Gastrocnemius muscle, SFI appeared to vary according to type II fiber isotypes, with increasing values from IIa to IIx and IIb [24]. These variations in type II fibers can be explained by the specificity of the RT, which in this case is associated with the adaptation predominantly of glycolytic fibers (type II). Thus, the training

method used in the current study may have contributed to the increase in values in the IT group.

Regarding the neuromuscular junction, a decrease in density was observed, especially in variables related to the area, area fraction, and integrated density in the FT and IT groups ($p < 0.05$). Furthermore, a decrease in the NMJ count was observed in the OT and IT groups ($p < 0.05$), and the total area showed a significant increase in IT and a significant decrease in FT ($p < 0.05$). Regarding the stained area, there was a significant increase in IT ($p < 0.05$). Finally, a significant increase in the stained perimeter of the NMJ was observed in IT ($p < 0.05$).

The IT group demonstrated better results when compared to the other methods of climbing training performed. In this case, the protocols performed with the animals' free weight, as well as the overload training, may have negatively influenced muscular adaptation and NMJ.

It is known that the muscular response occurs as a function of the stimulus provided by the training. In this case, the performance of the protocol with free weights does not seem to have been sufficient to increase the variables corresponding to the NMJ, while the training protocol with overload may have been exhausting and thus resulted in the accumulation of fatigue, so that the adaptations were not as efficient as the interleaved training protocol.

Sports sciences have attributed five classic principles to PT, among which is the "adaptation principle", which corresponds to the muscle's ability to regenerate and adapt to tissue damage caused by PT. In this context, for there to be an improvement in physical capacity, the stimulus must be sufficient to promote muscular stress, while the recovery period must correspond to the period necessary for repairing tissue damage [19, 28]. Therefore, the training load needs to be properly adjusted within a periodization model, so that RT stimulation occurs and there is sufficient time for recovery. Controlling these variables is essential for increasing or decreasing physical performance.

PT, especially RT, may be a method capable of stimulating the NMJ and thus increasing the innervation of muscle fibers by motor neurons. This process is due to the specificity of the training that induces an increase in muscle contraction force and, consequently, greater generation of muscle force [28].

A study conducted by Jacob et al., in *Wistar* animals, verified the effects of climbing training on the Plantar muscle. After obtaining the results, the authors verified that RT

promoted adaptations in the postsynaptic area of this muscle [10]. RT appears to be an efficient means of promoting adaptations at the NMJ, regardless of the predominance of muscle fiber type. In the study carried out by Deschenes et al. [12], the effects of RT were observed in both young and aged animals. The results revealed that training-induced remodeling of NMJs was evident in the postsynaptic endplate region of fast-twitch myofibers of the soleus. These findings support the idea that even in muscles that have a predominance of slow-twitch fibers, RT can cause adaptations in glycolytic fibers.

Finally, in a study similar to the present research, Pimentel Neto et al. [11], verified the effects of different climbing training protocols on the NMJ. The researchers used climbing protocols with and without overload and found that, in general, training with a combination of loads was more effective in adapting both the muscle fibers and the NMJ of *Wistar* rats.

The current study contributes to the literature by investigating the effects of free, overloaded, and interleaved training on the histology and NMJ in *Wistar* rats. However, some limitations should be highlighted, such as the training method used (climbing) and the lack of analyses related to protein quantification. Future studies that seek to investigate different periodization models, as well as the use of analyses for protein quantification, may contribute to the results presented so far.

CONCLUSION

We conclude that the presented protocols are effective in the muscular adaptation of the flexor carpi radialis, with an increase in the cross-sectional area in all experimental groups, highlighting the increase in type II fibers in the OT and IT groups that used overload. Furthermore, the IT group showed an increase in the total stained area and in the stained perimeter of the NMJ, demonstrating that the variability of the executed protocols promotes a greater and more effective neuromuscular adaptation, with an increase in the activity of postsynaptic receptors.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Laboratory of Morphology and Physical Activity (LAMAF) and the São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro campus – SP, for the possibility of developing the research and the Postgraduate Program in Movement Sciences for the opportunity to carry out the Postdoctoral internship.

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Gentil P, de Lira CAB, Coswig V, et al (2021) Practical Recommendations Relevant to the Use of Resistance Training for COVID-19 Survivors. *Front Physiol* 12:1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.637590>
2. Hong AR, Kim SW (2018) Effects of Resistance Exercise on Bone Health. *Endocrinol Metab* 33:435. <https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.4.435>
3. Castoldi RC, Akio G, Ozaki T, et al (2018) Alterations in Morphology and Aerobic Resistance of Rats Subjected to Different Physical Training Protocols. 36:1472–1479
4. Kraemer WJ, Ratamess NA, Flanagan SD, et al (2017) Understanding the Science of Resistance Training: An Evolutionary Perspective. *Sport Med* 47:2415–2435. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0779-y>
5. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J (2018) *Histologia básica: texto e atlas*, 13 edição
6. Herzog W (2017) Skeletal muscle mechanics: questions, problems and possible solutions. *J Neuroeng Rehabil* 14:98. <https://doi.org/10.1186/s12984-017-0310-6>
7. Mukund K, Subramaniam S (2020) Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 12:1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
8. Deschenes MR, Roby MA, Glass EK (2011) Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. *Neuroscience* 190:56–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.070>
9. Li L, Xiong W-C, Mei L (2018) Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu Rev Physiol* 80:159–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>
10. Jacob C dos S, Barbosa GK, Rodrigues MP, et al (2022) Stretching prior to resistance training promotes adaptations on the postsynaptic region in different myofiber types. *Eur J Histochem* 66:323–330. <https://doi.org/10.4081/ejh.2022.3356>
11. Pimentel Neto J, Rocha LC, Dos Santos Jacob C, et al (2021) Postsynaptic cleft density changes with combined exercise protocols in an experimental model of muscular hypertrophy. *Eur J Histochem* 65:. <https://doi.org/10.4081/ejh.2021.3274>
12. Deschenes MR, Sherman EG, Roby MA, et al (2015) Effect of resistance training on neuromuscular junctions of young and aged muscles featuring different recruitment patterns. *J Neurosci Res* 93:504–513. <https://doi.org/10.1002/jnr.23495>

13. Chacon Castoldi Regina Celi Trindade Camargo Alan José Barbosa Magalhães Guilherme Akio Tamura Ozaki Fábio Yoshikazu Kodama Sérgio Minoru Oikawa Marcelo Papoti José Carlos Silva Camargo Filho R Concurrent training effect on muscle fibers in Wistar rats
14. Krause Neto W, de Assis Silva W, Ciená AP, et al (2017) Divergent effects of resistance training and anabolic steroid on the postsynaptic region of different skeletal muscles of aged rats. *Exp Gerontol* 98:80–90. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.018>
15. Lourenço Í, Krause Neto W, Santos Portella Amorim L, et al (2020) Muscle hypertrophy and ladder-based resistance training for rodents: A systematic review and meta-analysis. *Physiol Rep* 8:1–25. <https://doi.org/10.14814/phy2.14502>
16. Castoldi RC, Louzada MJQ, De Oliveira BRSM, et al (2017) Effects of aerobic, anaerobic, and concurrent training on bone mineral density of rats. *Motriz Rev Educ Fis* 23:71–75. <https://doi.org/10.1590/S1980-6574201700010011>
17. Garcia TA, Tamura Ozaki GA, Castoldi RC, et al (2018) Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. *Tissue Cell* 54:120–126. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.08.014>
18. Dal Pai V (1995) *Histoenzimologia: teoria e prática*
19. Castoldi RC, Giometti IC, Ozaki GAT, et al (2023) Resistance training and growth hormone (GH): effects on histology and typing of gastrocnemius muscle fibers. *Sport Sci Health*. <https://doi.org/10.1007/s11332-023-01091-7>
20. Bhutda S, Surve M, Anil A, et al (2017) Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. *BIO-PROTOCOL* 7:1–10. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2592>
21. Cury SS, Freire PP, Martinucci B, et al (2018) Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice. *Biochem Biophys Res Commun* 503:109–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.189>
22. Koike TE, Camargo RCT, Ozaki GAT, et al (2016) Morphometric and fractal analysis of injured skeletal muscle tissue subjected to a combination of treatments; cryotherapy and therapeutic ultrasound | Análisis de la morfometría y de la dimensión fractal en la lesión del tejido muscular esquelético expuesto. *Int J Morphol* 34:. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000300042>
23. Ozaki G, Camargo RCT, Koike TE, et al (2015) Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury. *Int J Morphol* 33:908–913. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000300017>
24. Casper Soendenbroe, Anders Karlsen, Rene B. Svensson, Michael Kjaer JLA& ALM (2023) Marked irregular myofiber shape is a hallmark of human skeletal muscle aging and is reversed by heavy resistance training. 06:1–22. <https://doi.org/10.1101/2023.06.05.543651>
25. Hepple RT, Mackinnon SLM, Thomas SG, et al (1996) Quantitating the capillary supply and the response to resistance training in older men. *Pfluegers Arch* 433:238–244. <https://doi.org/10.1007/s004240050273>

26. Russ JC, Neal FB (2018) *The Image Processing Handbook*. CRC Press
27. Sutlive TG, McClung JR, Goldberg SJ (1999) Whole-Muscle and Motor-Unit Contractile Properties of the Styloglossus Muscle in Rat. *J Neurophysiol* 82:584–592. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.2.584>
28. Kraemer WJ, Flanagan SD, Volek JS, et al (2013) Resistance exercise induces region-specific adaptations in anterior pituitary gland structure and function in rats. *J Appl Physiol* 115:1641–1647. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00687.2013.-The>
29. Castoldi RC, Teixeira GR, Malheiro OC de M, et al (2015) Effects of 14 Weeks Resistance Training on Muscle Tissue in Wistar Rats. *Int J Morphol* 33:446–451. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000200007>
30. Casolo A, Farina D, Falla D, et al (2020) Strength Training Increases Conduction Velocity of High-Threshold Motor Units. *Med Sci Sports Exerc* 52:955–967. <https://doi.org/10.1249/MSS.00000000000002196>
31. Del Vecchio A, Casolo A, Negro F, et al (2019) The increase in muscle force after 4 weeks of strength training is mediated by adaptations in motor unit recruitment and rate coding. *J Physiol* 597:1873–1887. <https://doi.org/10.1113/JP277250>
32. Suchomel TJ, Nimphius S, Bellon CR, Stone MH (2018) The Importance of Muscular Strength: Training Considerations. *Sport Med* 48:765–785. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0862-z>
33. Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H (2016) Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med* 98:56–67. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>
34. Wallace IJ, Judex S, Demes B (2015) Effects of load-bearing exercise on skeletal structure and mechanics differ between outbred populations of mice. *Bone* 72:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.11.013>
35. Kaasik P, Riso E-M, Seene T (2011) Extracellular Matrix and Myofibrils During Unloading and Reloading of Skeletal Muscle. *Int J Sports Med* 32:247–253. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270513>

11.3 PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO

Durante o referido período de estágio participei das seguintes bancas de trabalhos de conclusão:

RIBEIRO, A. S.; CASTOLDI, R. C.; SANTOS, L.. Participação em banca de Renata lácono Wentz Gomes. Planilha para cálculo da taxa metabólica de repouso em diferentes populações. 2024. Dissertação (Mestrado em Exercício Físico na Promoção da Saúde) - Universidade Norte do Paraná.

GONCALVES, G. H.; CHRISTOFOLETTI, G.; CASTOLDI, R. C.. Participação em banca de Fernando Dias Boeira. Efeitos de dois programas de telerreabilitação sobre a capacidade funcional, qualidade de vida e adesão ao exercício de pessoas com osteoartrite de joelho: um ensaio clínico randomizado único cego. 2024. Dissertação (Mestrado em CIÊNCIAS DO MOVIMENTO) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RIBEIRO, A. S.; SANTOS, L.; CASTOLDI, R. C.. Participação em banca de Renata lácono Wentz Gomes. APLICATIVO PARA CÁLCULO DA TAXA METABÓLICA DE REPOUSO EM DIFERENTES POPULAÇÕES. 2024. Dissertação (Mestrado em Exercício Físico na Promoção da Saúde) - Universidade Norte do Paraná.

GONCALVES, G. H.; DORNELAS, L. F.; CASTOLDI, R. C.. Participação em banca de Fernando Dias Boeira. ASPECTOS PROFILÁTICOS E TERAPÊUTICOS DA ATIVIDADE FÍSICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE SAÚDE. 2023. Dissertação (Mestrado em CIÊNCIAS DO MOVIMENTO) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

PACAGNELLI, F. L.; GENARO, S. C.; CASTOLDI, R. C.. Participação em banca de CARLOS EDUARDO BROCHINI DE PAIVA. INFLUÊNCIA DA ERVA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) NA REMODELAÇÃO CARDÍACA EM RATOS WISTAR. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista.

11.4 LIDERANÇA DE ATIVIDADES DE LABORATÓRIO

Durante a realização do estágio de pós-doutoramento estive fortemente envolvida em atividades de liderança dentro do Laboratório de Anatomia, Morfologia e Atividade Física - LAMAF. Além do meu estudo, liderei atividades de coletas e análises de dados de diversos projetos do LAMAF. Além de acompanhar e colaborar com demais alunos (as) da graduação e pós-graduação em parceria com o meu supervisor e coordenador do LAMAF Prof. Dr. Adriano Polican Ciena.

12 APROVAÇÃO CEUA



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 27/2023

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 31.08.2023	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Modulações nas junções neuromusculares do músculo estriado esquelético diante de diferentes protocolos de escada vertical", protocolo nº 2463, sob responsabilidade de Robson Chacon Castoldi (Pesquisador Responsável), e Adriano Polican Ciena (Orientador) que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==	

Colaboradores: Jurandyr Pimentel Neto

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **54ª reunião ordinária**, realizada em **06.12.2023**.

☒	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: 02/10/2023 a 04/10/2024

Finalidade: ☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Rato Heterogênico Wistar

Número de animais: 32; Peso: 300g; Idade: 90 dias; Sexo: Macho

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

Objetivo Acadêmico:	☐ TCC
	☐ Mestrado
	☐ Doutorado
	☐ Outros
	☒ Pós- Doutorado

Rio Claro, 06/12/2023

Claudio José Von Zuben
Prof. Dr. Claudio José Von Zuben
Coordenador

13 MANIFESTAÇÃO E COMENTÁRIOS DO SUPERVISOR



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências - Câmpus de Rio
Claro Departamento de Educação Física

Rio Claro, 28 de Outubro de 2024.

MANIFESTAÇÃO DO SUPERVISOR

Supervisor Responsável: Adriano Polican Ciena
Pós-doutorando: Robson Chacon Castoldi

O pós-doutorando, durante o período de vigência, realizou todas as atividades programadas, conforme a proposta inicial. Desenvolveu com destreza e determinação o projeto de pesquisa, obtendo importantes dados sobre os componentes musculares e dos receptores pós-sinápticos da junção neuromuscular, frente as adaptações desencadeadas pelas diferentes modalidades de atividades físicas e aos protocolos e períodos empregados. Os quais estão organizados e apresentados no presente relatório e serão apresentados em periódico internacional de qualificado corpo editorial. Além disso, o pós-graduando teve importante participação nas reuniões científicas, discussões no grupo de pesquisa e na colaboração da formação de recursos humanos do grupo.

Destaco ainda, a importante participação, com destreza, do Robson Chacon Castoldi nas atividades do laboratório e nas tarefas em grupo/coletivas.

Diante do exposto, aprovo as atividades realizadas/relatório. Também informo que estou muito contente em poder contar com a sua participação na equipe de trabalho e agradeço imensamente pelas atividades realizadas sob a minha supervisão.

Atenciosamente,

Adriano Polican Ciena

Prof. Dr. Adriano Polican Ciena