



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

ALTERAÇÕES NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E VENTRE
MUSCULAR DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO
ALONGAMENTO ESTÁTICO ASSOCIADO ÀS MODALIDADES DE
ESCADA VERTICAL

GABRIELA KLEIN BARBOSA



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**ALTERAÇÕES NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E VENTRE
MUSCULAR DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS AO
ALONGAMENTO ESTÁTICO ASSOCIADO ÀS MODALIDADES DE
ESCADA VERTICAL**

GABRIELA KLEIN BARBOSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

B238a	<p>Barbosa, Gabriela Klein</p> <p>Alterações na junção neuromuscular e ventre muscular de ratos Wistar submetidos ao alongamento estático associado às modalidades de escada vertical / Gabriela Klein Barbosa. -- Rio Claro, 2021</p> <p>75 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientador: Adriano Polican Ciena</p> <p>1. Junção neuromuscular. 2. Músculo esquelético. 3. Tecido conjuntivo. 4. Exercícios físicos. 5. Modelos animais. I. Título.</p>
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ALTERAÇÕES NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E VENTRE MUSCULAR DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO ALONGAMENTO ESTÁTICO ASSOCIADO ÀS MODALIDADES DE ESCADA VERTICAL

AUTORA: GABRIELA KLEIN BARBOSA

ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Adriano Polican Ciena:

Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA (Participação Virtual)
Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro

Luciano Cesar Pereira Campos Leonel

Prof. Dr. LUCIANO CESAR PEREIRA CAMPOS LEONEL (Participação Virtual)
Department of Neuroscience and Experimental Therapeutics / Albany Medical College

Marcio Massao Kawano
Prof. Dr. MARCIO MASSAO KAWANO (Participação Virtual)
x / Universidade Federal do Oeste da Bahia

Rio Claro, 01 de junho de 2021

Dedico esse trabalho para meus pais, Sergio e Rosemary, cujo apoio foi essencial para a realização e conclusão dessa etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rosemary e Sergio, pelas opiniões, apoio e amor incondicional ao longo dos anos. O incentivo deles foi essencial para o desenvolvimento dessa etapa e superação das dificuldades encontradas no caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Polican Ciena, por aceitar minha entrada no laboratório durante a graduação, o incentivo para a inscrição no PPG e por sempre manter as portas abertas para apoio, dúvidas, incentivos e discussões.

À minha colega de mestrado, Carolina, por todo planejamento, apoio, incentivo, curiosidade, discussões e conversas sobre temas diversos, mesmo durante os longos períodos de treinamento, incontáveis contratemplos e repetições de experimentos.

À minha colega de laboratório, Mariana, pela sua disposição, curiosidade e organização durante os longos períodos de treinamento, além da sua incrível habilidade culinária que animava os dias.

Aos meus colegas de mestrado, Lara e Jura, pelo companheirismo, discussão, conversas e apoio ao longo dos anos.

Aos meus colegas de laboratório, Isa, Bruna, Giovana e André, pelo apoio, ajuda e conversas que auxiliaram o desenvolvimento dessa etapa.

Aos meus amigos, Larissa, Julia, Juliano, Gabriela, Clara, Lilian, Aline, Natasha, Marcela e Isabella, pelo companheirismo, desabafos, jogos e apoio que foram essenciais para mim. Um agradecimento especial para Julia, Juliano, Larissa e Isabella pelo apoio e *webconversas* semanais que foram imprescindíveis durante esse período de isolamento social.

Pelo auxílio técnico e científico, agradeço ao técnico José Roberto, do Laboratório de Morfologia – UNESP Rio Claro, pelo auxílio e aprendizagem das técnicas e à médica veterinária Patrícia, pelos cuidados com os animais.

Ao Prof. Dr. Douglas Silva Domingues e à doutoranda Paula Carmago, do Laboratório de Genômica e Transcriptoma em Plantas – UNESP Rio Claro, pela cooperação e auxílio técnico para o armazenamento de amostras.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina e o mestrando Lucas Miotelo, do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelha (LECA) - UNESP Rio Claro, pelo auxílio técnico e disposição para uso do equipamento criostato.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues, do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) – UNESP Rio Claro, pelo auxílio com o microscópio de luz.

Ao Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci, do Laboratório de Aracnologia (LARC) – UNESP Rio Claro, pelo auxílio com o microscópio de luz.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira, doutorando Caio Zamuner e mestrando Giovane Böerner, do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) – UNESP Rio Claro, pelo auxílio com o microscópio de imunofluorescência.

À técnica Sônia Regina, da Universidade de São Paulo – São Paulo, pelo auxílio no processamento das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão.

À Prof.^a Dr^a Marucia Chacur, ao Daniel, doutorando Igor, mestranda Camilla e aluna Natália, do Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor (LAND) – USP São Paulo, pelo ensino e auxílio com a técnica de *Western Blot*.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do financiamento via processo nº 2017/12525-1.

RESUMO

A contração do músculo estriado esquelético depende da relação entre a junção neuromuscular (JNM) e o músculo alvo. A morfologia da JNM e as características do ventre e das fibras musculares apresentam plasticidade tecidual derivada do estímulo. Com o protocolo proposto ocorreram adaptações na JNM e no ventre muscular. O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as alterações morfológicas na JNM e ventre do músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* submetidos ao alongamento estático prévio às modalidades de escada vertical. Foram utilizados ratos *Wistar* com 60 dias de idade ($n = 10$): Sedentário (S); Alongado (A); Escada vertical sem carga extra (EC); Escada vertical com sobrecarga (ES); Alongado e escada vertical sem carga extra (AEC); e Alongado e escada vertical com sobrecarga (AES). Os animais foram submetidos aos protocolos 3x por semana por oito semanas. A relação das massas do S, EC, ES e A não demonstraram diferença, enquanto que AEC e AES resultaram em menores valores. Os grupos EC e ES apresentaram aumento da placa motora e redução da compacidade, com destaque para o grupo EC e, ainda, revelaram maior número de *clusters* e fragmentação. O grupo A apresentou redução da placa motora, com aumento da compacidade e manutenção do número de *clusters* e fragmentação. Os grupos de alongamento prévio às modalidades de escada vertical (AEC e AES) revelaram aumento da placa motora, com destaque para AES, menor número de *clusters* e menor índice de fragmentação; entretanto, a compacidade apresentou aumento para AEC e redução para AES. Houve aumento da área de secção transversa das miofibras Tipo IIa para EC e ES, e do Tipo IIx para AES, e redução dos tipos miofibrilares para A e AEC. Houve predominância do Tipo IIx nos grupos EC, A, AEC e AES, e de IIa no grupo ES. Além disso, os grupos AEC e AES apresentaram aumento da quantidade total de miofibras. Os grupos ES e AEC apresentaram maior complexidade mionuclear, os grupos EC e AES revelaram menor complexidade intersticial, e o grupo A mostrou redução das complexidades mionuclear e intersticial. Nos grupos EC, ES, A, AEC e AES houve redução da área intersticial. A análise funcional mostrou a redução do tempo para EC, ES, AEC e AES, e dos movimentos para EC, ES e AEC. O teste de carga máxima carrega (TCMC) revelou aumento de trabalho para ES e AES, com destaque para ES. Concluímos que o alongamento estático prévio às modalidades de escada vertical apresentou aumento da placa motora e menor fragmentação; no entanto, a ocupação dos *clusters* de receptores de acetilcolina demonstrou diferentes adaptações frente à AEC e AES. Em ambos, ocorre o aumento da quantidade total de miofibras. O alongamento prévio à escada vertical sem carga extra reduz o diâmetro miofibrilar, acarreta maior complexidade mionuclear e reduz a área intersticial. Por outro lado, a modalidade com sobrecarga propicia o aumento do diâmetro miofibrilar do Tipo IIx, menor complexidade e área intersticiais, e apresenta aumento da capacidade de carga.

Palavras-chave: Placa motora. Receptores colinérgicos. Plasticidade adaptativa. Músculo estriado esquelético. Tecido Conjuntivo.

ABSTRACT

Skeletal muscle contraction depends on the proper communication between the neuromuscular junction (NMJ) and the muscle. The NMJ morphology and the characteristics of the belly muscle and the myofibers exhibit plasticities stimulus-derived. The protocols proposed in this study promoted adaptations in the NMJ and the belly muscle elements. This study aimed to describe the morphological changes in the NMJ and the belly muscle of the gastrocnemius muscle of *Wistar* male rats submitted to previous static stretching to vertical ladder modalities. *Wistar* male rats with 60-days-old ($n = 10$) were divided into (S) Sedentary, (A) Stretched, (EC) Vertical ladder without overload, (ES) Vertical ladder with overload, (AEC) Stretched and vertical ladder without overload, and (AES) Stretched and vertical ladder with overload. The animals were submitted to the protocols 3x/week for eight weeks. The training session data were used for functional analysis and the samples were processed for light microscopy and immunofluorescence techniques. The mass ratio of S, EC, ES, and A groups showed no difference, while AEC and AES groups resulted in lower values. The EC and ES groups demonstrated an increase in motor endplate and reduced compactness, highlighting the EC group, and showed a greater number of clusters and fragmentation. The A group showed a reduction in motor endplate, increased compactness, and maintenance of the number of clusters and fragmentation. Previous static stretching to vertical ladder modalities (AEC and AES groups) revealed an increase in motor endplate, highlighting the AES group, and lower number of clusters and fragmentation index, though the compactness increased for AEC and decreased for AES. The cross-sectional area (CSA) of myofibers Type IIa increased in the EC and ES groups, Type IIx increased in the AES group, and the myofibrillar types (Type I, IIa, and IIx) reduced in the A and AEC groups. The EC, A, AEC, and AES groups demonstrated Type IIx predominance, while the ES group showed Type IIa predominance. Furthermore, the AEC and AES groups demonstrated an increase in the myofibers' total quantity. The ES and AEC groups demonstrated higher myonuclear complexity, the EC and AES groups revealed lower interstitial complexity, and the A group showed a reduction in the myonuclear and interstitial complexities. Moreover, there was a reduction of the interstitial area in the EC, ES, A, AEC, and AES groups. Functional analysis showed a reduction in time for EC, ES, AEC, and AES groups, and a reduction in movements for EC, ES, and AEC groups. The maximum loaded carrying test (MLCT) revealed an increase in work for ES and AES, highlighting the ES group. We concluded that the previous static stretching to vertical ladders modalities demonstrated an increase in the motor endplate and a reduction in fragmentation, but the AEC and AES groups demonstrated different adaptations in the percentage of acetylcholine receptor clusters in the motor endplate. There was an increase in the myofibers' total quantity in both groups (AEC and AES). Previous static stretching to the vertical ladder without overload reduced the myofibrillar diameter, triggered an increase in the myonuclear complexity, and reduced the interstitial area. In contrast, the previous static stretching to the vertical ladder with overload increased the myofiber Type IIx diameter, reduced the interstitium' area and complexity, and demonstrated an increase in load capacity.

Keywords: Motor endplate. Cholinergic receptors. Physiological Adaptation. Skeletal muscle. Connective Tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esquema ilustrativo da junção neuromuscular.	18
Figura 2	– Esquema ilustrativo do desenvolvimento da morfologia da placa motora da junção neuromuscular.	19
Figura 3	– Delineamento experimental.	28
Figura 4	– Protocolo de alongamento estático passivo.	29
Figura 5	– Protocolo de escada vertical.	30
Figura 6	– Reação histoquímica de ATPase, identificação e delimitação da área de secção transversa dos tipos miofibrilares.	34
Figura 7	– Análise da dimensão fractal dos mionúcleos e interstício do ventre muscular.	35
Figura 8	– Fluxo de trabalho utilizado para as variáveis principais e derivadas da placa motora.	37
Figura 9	– Fluxograma da determinação do tratamento estatístico com base na dependência temporal, na distribuição dos dados e na homogeneidade de variância.	39
Figura 10	– Imunomarcção e morfometria da placa motora dos grupos experimentais.	46
Figura 11	– Área de secção transversa dos tipos miofibrilares dos grupos experimentais.	48
Figura 12	– Volume numérico dos tipos miofibrilares dos grupos experimentais.	49
Figura 13	– Volume numérico miofibrilar total dos grupos experimentais.	50
Figura 14	– Microscopia de luz dos mionúcleos e dimensão fractal mionuclear dos grupos experimentais.	51
Figura 15	– Microscopia de luz do interstício, dimensão fractal intersticial e área intersticial dos grupos experimentais.	52
Figura 16	– Média e desvio padrão de tempo e movimento da 1ª e 8ª semana de treinamento dos grupos experimentais.	53
Figura 17	– Média de trabalho da 1ª e 8ª semana de treinamento dos grupos experimentais.	54
Figura 18	– Média e desvio padrão de trabalho no teste de carga máxima carregada.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Tabela dos tratamentos estáticos utilizados para as variáveis analisadas.....	40
Tabela 2	- Médias e desvios padrões da massa corporal dos grupos experimentais.....	42
Tabela 3	- Médias e desvios padrões da massa corporal final, massa muscular e da relação MC/MM dos grupos experimentais.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

≠	Diferente
°	Graus
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
µm	Micrômetro
µm ²	Micrômetro quadrado
%	Porcentagem
A	Alongado
Ach	Acetilcolina
AchR	Receptores de acetilcolina
AEC	Alongado e escada vertical sem carga extra
AES	Alongado e escada vertical com sobrecarga
Agrin	Agrina
AST	Área de secção transversa
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
BTX	Rodamina conjugada com α-bungarotoxina
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cMet	Fator de transição c-mesenquimal-epitelial
CSs	Células satélites
<i>Ctnna1</i>	Catenina alfa
CXCL12	Quimiocina 12 do C-X-C <i>motif</i>
DF	Dimensão Fractal
Dok7	<i>Downstream of tyrosine kinase 7</i>
Ds	Dimensão fractal por similaridade de formas
DTT	Ditiotreitol
E	Eutanásia
EC	Escada vertical sem carga extra

EDL	Músculo extensor longo dos dedos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>EphA6</i>	Receptor 6 da efrina tipo A
ES	Escada vertical com sobrecarga
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
g	Grama(s)
h	Hora(s)
HE	Hematoxilina-Eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
J	Joule
JNM	Junção neuromuscular
LECA	Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelha
LGB	Laboratório de Genética de Bactérias
Lrp4	Proteína 4 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
m	metro(s)
M	Molar
MC	Massa corporal
MD	Estado de Maryland
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligrama
mg g⁻¹	Miligrama por grama
mg/kg	Miligrama por quilo
mL	Mililitro
MM	Massa muscular
MM/MC	Relação entre massa muscular e massa corporal
mM	Milimolar
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
m/s²	Metros por segundo ao quadrado
MuSK	Receptor de tirosina da proteína quinase músculo-específico
MyBP-C	Proteína C de ligação à miosina
nº	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NIH	<i>National Institute of Health</i>

nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
nm	Nanômetro
Nr	Número total de quadrados
p	Nível de significância estatística
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
<i>Pcdh1</i>	Protocaderina-1
<i>Pcdh12</i>	Protocaderina-12
<i>Pcdh17</i>	Protocaderina-17
<i>Pcdh18</i>	Protocaderina-18
PGC-1α4	Isoforma 4 do coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>PkC</i>	Proteína quinase C
<i>Ptk6</i>	Proteína tirosina quinase 6
<i>Ptprm</i>	Proteína tirosina receptora fosfatase μ
PSR	Picro-sírius Red
r	Tamanho do quadrado
Rapsyn	Proteína <i>Rapsyn</i>
RGB	Sistema de cor baseado em vermelho (<i>Red</i>), verde (<i>Green</i>) e azul (<i>Blue</i>)
S	Sedentário
SP	Estado de São Paulo
T	Trabalho
T_{escalada}	Trabalho por escalada
TCMC	Teste de Carga Máxima Carregada
UA	Unidade arbitrária
un	Unidade
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP	Universidade de São Paulo
<i>Vav2</i>	Fator de troca de nucleotídeos da guanina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VN	Volume numérico miofibrilar
x	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Revisão Bibliográfica	17
1.1.1	<i>Junção Neuromuscular (JNM)</i>	17
1.1.2	<i>Músculo Estriado Esquelético</i>	20
1.1.3	<i>Alongamento Estático</i>	21
1.1.4	<i>Escada vertical</i>	23
1.2	Justificativa	24
2	OBJETIVO	26
2.1	Objetivos específicos	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Animais	27
3.2	Protocolo de alongamento estático passivo	28
3.3	Protocolos de escada vertical	29
3.3.1	<i>Protocolo de escada vertical sem carga extra</i>	30
3.3.2	<i>Protocolo de escada vertical com sobrecarga</i>	31
3.4	Teste de carga máxima carregada	31
3.5	Massa corporal	32
3.6	Massa muscular	32
3.7	Eutanásia, coleta e armazenamento das amostras biológicas	32
3.8	Microscopia de Luz	33
3.8.1	<i>Histoquímica Miofibrilar – ATPase</i>	33
3.8.2	<i>Técnicas de coloração</i>	34
3.8.3	<i>Análise da Dimensão Fractal (DF)</i>	34
3.9	Imunofluorescência	36
3.10	Análise estatística	38
4	RESULTADOS	42
4.1	Massa corporal e muscular	42
4.2	Junção Neuromuscular	44
4.3	Histoquímica miofibrilar – ATPase	47
4.3.1	<i>Área de secção transversa (AST) miofibrilar</i>	47
4.3.2	<i>Volume numérico miofibrilar (VN)</i>	48
4.4	Análise da dimensão fractal	50

4.5	Análise funcional	53
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é essencial para a ação do movimento do sistema locomotor (CARDOZO; GRAHAM, 2017). Este órgão é formado por miofibras organizadas em feixes, através da associação com os tecidos conjuntivos: endomísio, perimísio e epimísio (PURSLOW, 2020). Associado às miofibras estão dispostas inervações do sistema nervoso periférico, que são essenciais para a transmissão do potencial de ação que resulta na contração muscular (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020).

A contração muscular ocorre a partir do estímulo nervoso na região central das miofibras, via junção neuromuscular (JNM), na qual a placa motora é formada por dobras juncionais, contendo aglomerados (*clusters*) de receptores de acetilcolina (AChR) no topo de suas cristas (EGUCHI *et al.*, 2020) (Figura 1). Com base na técnica de imunofluorescência, é possível localizar e realizar a análise das dimensões da placa motora (JONES *et al.*, 2017b), e esta apresenta relevância científica, visto que a placa motora possui plasticidade morfológica nos diferentes estágios de desenvolvimento (MECH *et al.*, 2020) e músculo-específica decorrente da prática de exercícios físicos (DESCHENES *et al.*, 2016).

O exercício físico promove adaptações no proteoma muscular através da alteração da atividade enzimática, do aumento da concentração de adenosina trifosfato (ATP), glicogênio e triglicerídeos, e da redução da formação de lactato; de modo específico, o treinamento com sobrecarga aprimora a transmissão dos estímulos nervosos e a produção de força (KRAEMER *et al.*, 2017). O uso da sobrecarga tem a capacidade de recrutar rapidamente as miofibras Tipo II e proporciona a hipertrofia dessas miofibras, através do estímulo da síntese proteica e da ativação das células satélites (CSs) (DOUGLAS *et al.*, 2017).

O treinamento físico com sobrecarga promove o aumento da flexibilidade muscular; não obstante, treinos específicos de flexibilidade também são importantes para a autonomia e a manutenção da saúde do indivíduo (LEITE *et al.*, 2015). Dentro dos treinos de flexibilidade, o alongamento estático é reconhecido como um fator positivo frente ao risco de lesão muscular, e seu uso prévio ao treinamento físico é amplamente difundido entre os praticantes de atividades físicas (TRAJANO; NOSAKA; BLAZEVIK, 2017).

Dentre os estudos experimentais, os roedores constituem um modelo válido para a compreensão das adaptações morfológicas, visto que são modelos de organismo inteiro pertencente aos mamíferos, com acessível manipulação genética e rápida avaliação anatômica (STRICKLAND; SMITH, 2016). No presente estudo o modelo animal escolhido foram ratos da linhagem *Wistar* e o músculo alvo foi o gastrocnêmio que, de acordo com Butler e Dominy (2016), promove a força de propulsão.

Os efeitos da prática das diversas categorias de treinamento físico são explorados por pesquisas científicas quanto ao tipo de exercício e sua influência na qualidade de vida em diferentes faixas etárias. Diante disso, os principais efeitos do alongamento estático e sua associação prévia às modalidades de escada vertical na JNM e nos elementos que compõem o ventre muscular serão apresentados nessa pesquisa.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 *Junção Neuromuscular (JNM)*

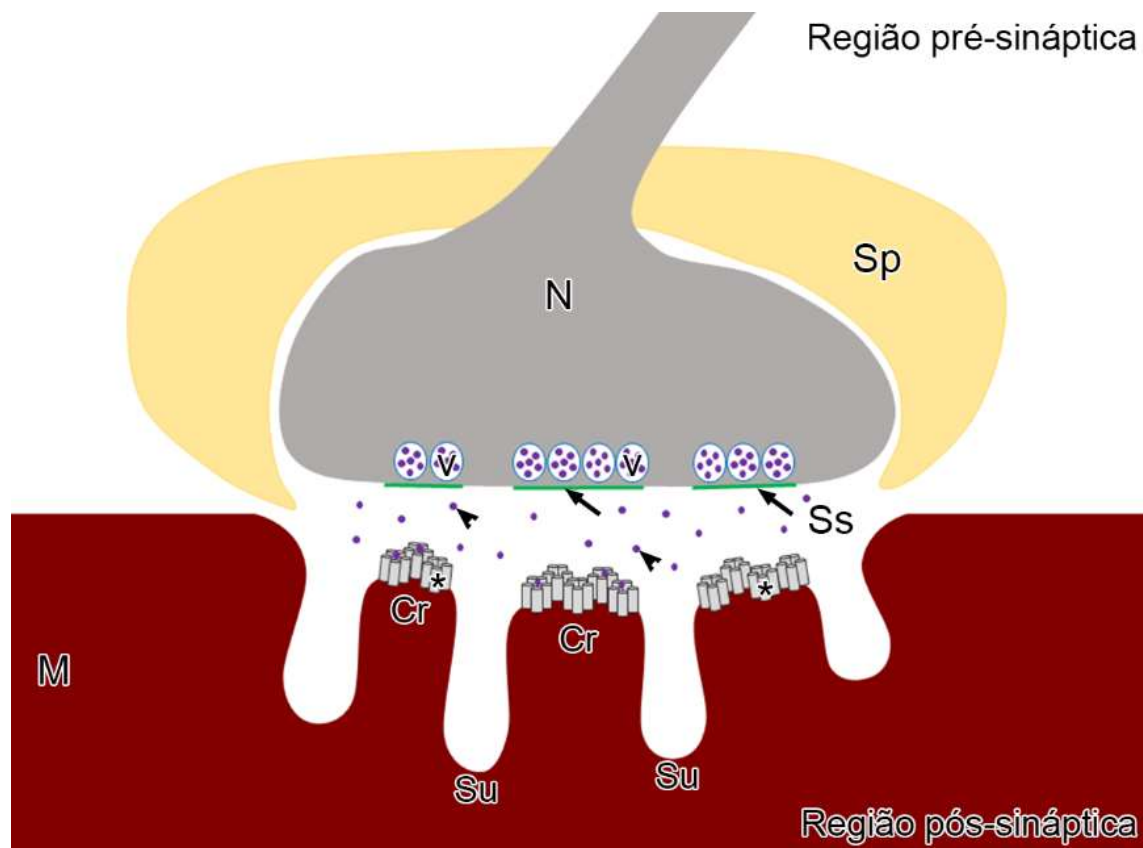
Nos mamíferos, a JNM é formada pela associação do nervo terminal pré-sináptico proveniente do sistema nervoso periférico, da região pós-sináptica muscular e da célula de Schwann perisináptica; a qual, esta última, se caracteriza como não mielinizada, circunda parcialmente o componente pré-sináptico e o sulco sináptico, e contribui para o crescimento e manutenção da JNM e dos nervos terminais (Figura 1) (KO; ROBITAILLE, 2015).

Nos nervos terminais existem zonas ativas de liberação de vesículas sinápticas contendo neurotransmissores, de forma que estas zonas ativas atuam no agrupamento das vesículas, recrutam canais iônicos de cálcio dependente de voltagem para a região pré-sináptica e contribuem com a plasticidade da sinapse; além disso, possuem morfologia alongada e estão dispostas de forma alinhada e oposta com os receptores específicos de neurotransmissores presentes na superfície muscular pós-sináptica (Figura 1) (SÜDHOF, 2012).

A partir da liberação do neurotransmissor acetilcolina (Ach) no sulco sináptico, essas proteínas difundem, se ligam aos aglomerados (*clusters*) de AchR na região pós-sináptica, promovem a despolarização da membrana muscular e

desencadeiam o potencial de ação que resulta na contração muscular (BURDEN; HUIJBERS; REMEDIO, 2018).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da junção neuromuscular.



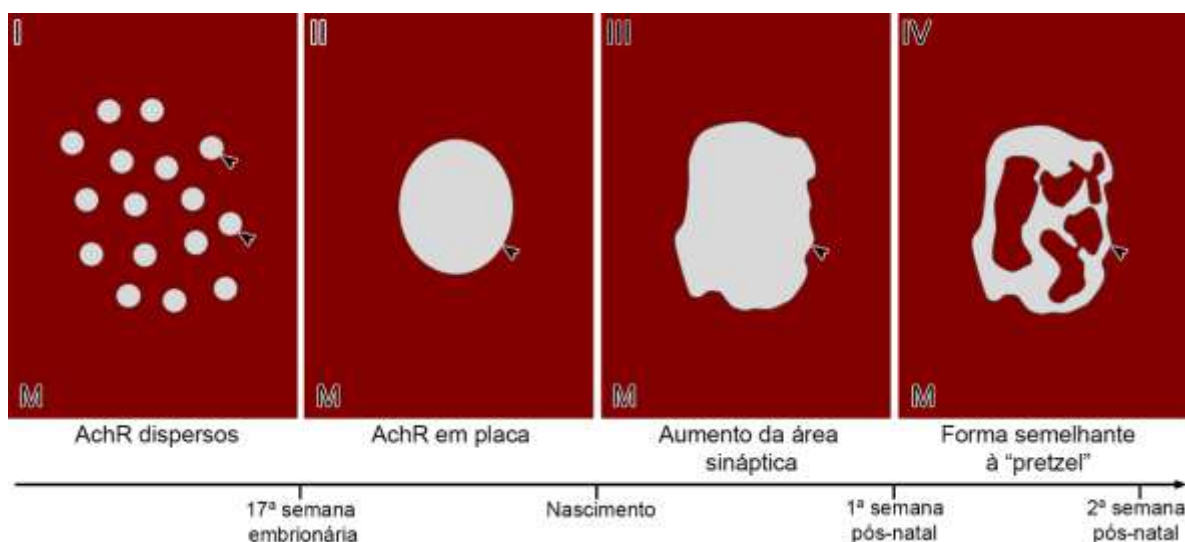
Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Esquema ilustrativo da junção neuromuscular. A região pré-sináptica é formada pelo nervo terminal (**N**) e pela célula de Schwann perisináptica (**Sp**), que circunda parcialmente o nervo terminal e o sulco sináptico (**Ss**). Nas zonas ativas (**seta**) do nervo terminal (**N**), ocorre o agrupamento de vesículas sinápticas (**v**) contendo neurotransmissor acetilcolina (Ach). Com a transmissão do estímulo nervoso, ocorre a fusão das vesículas sinápticas (**v**) à membrana do nervo terminal (**N**), a liberação e difusão da Ach (**cabeça de seta**) no sulco sináptico (**Ss**). Posteriormente, a Ach (**cabeça de seta**) é reconhecida pelos receptores de acetilcolina (AchR) (*) da região pós-sináptica, localizada na miofibra (**M**). A região pós-sináptica é compreendida pela placa motora, a qual é formada por sulcos (**Su**) e cristas (**Cr**), e se localiza na superfície da miofibra (**M**). No topo das cristas estão dispostos aglomerados (*clusters*) de AchR (*).

A matriz extracelular (MEC) contribui para o desenvolvimento sináptico através da via de ação molecular que envolve as proteínas Agrin–Lrp4–MuSK–Dok7–Rapsyn: na qual a Agrin, localizada na lâmina basal pré-sináptica, forma um complexo com Lrp4 e MuSK, ambas proteínas transmembranas da lâmina basal pós-sináptica, e com Dok7 (presente no meio intracelular muscular). Esse complexo possui a função de promover a fosforilação da tirosina de MuSK e permitir a aglomeração dos AchR, através do processo específico de ubiquitinação entre as

unidades de AchR promovido pela Rapsyn. Dessa forma, esse complexo proteico atua na formação, na manutenção, na diferenciação pós-sináptica, na ancoragem e na aglomeração dos AchR (BURDEN; HUIJBERS; REMEDIO, 2018).

Durante o desenvolvimento da morfologia da placa motora existem estágios, no qual o primeiro é caracterizado por aglomerados dispersos de AchR até a 17ª semana embrionária (Figura 2I), assume a forma de placa oval ou redonda até o nascimento do indivíduo (Figura 2II), apresenta aumento da área sináptica na primeira semana pós-natal (Figura 2III) e exibe o remodelamento da estrutura para a forma semelhante a *pretzel* ao final da segunda semana pós-natal (Figura 2IV) (MARQUES; CONCHELLO; LICHTMAN, 2000).

Figura 2 – Esquema ilustrativo do desenvolvimento da morfologia da placa motora da junção neuromuscular.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Esquema ilustrativo do desenvolvimento da morfologia da placa motora da junção neuromuscular. (I) Os AchR (**cabeça de seta**) ficam dispostos em aglomerados dispersos na miofibrila (**M**) até a 17ª semana embrionária. (II) Os AchR assumem a forma de placa (**cabeça de seta**) na miofibrila (**M**) até o nascimento do indivíduo. (III) Ocorre o aumento da área sináptica da placa motora (**cabeça de seta**) na miofibrila (**M**) até a 1ª semana pós-natal. (IV) Na superfície da miofibrila (**M**), a placa motora (**cabeça de seta**) se reorganiza e apresenta a forma semelhante à *pretzel* ao final da 2ª semana pós-natal.

As regiões pré e pós-sinápticas da JNM adulta possuem plasticidade de acordo com estímulos externos recebidos, de forma que a modalidade física e a forma de realização do movimento exercem influência nas adaptações promovidas nessa região de interação entre nervo periférico e tecido muscular estriado

esquelético; entretanto, essas modificações são músculo-específicas (NISHIMUNE; STANFORD; MORI, 2014).

Um estudo prévio demonstrou que o músculo gastrocnêmio, submetido ao treinamento em esteira motorizada, apresentou aumento do número de genes expressos relacionados ao funcionamento e desenvolvimento da JNM, tais como o Receptor 6 da efrina tipo A (*EphA6*), proteína tirosina receptor fosfatase μ (*Ptprm*) e a catenina alfa (*Ctnna1*); o aumento de transcritos de protocaderinas envolvidas na formação da sinapse (*Pcdh1, 12, 17, 18*), de proteínas relacionadas aos AchR (Proteína quinase C (*Pkc*) e proteína tirosina quinase 6 (*Ptk6*)) e na redução de transcritos associados ao crescimento neuronal (Fator de troca de nucleotídeos da guanina (*Vav2*)) (FERRAIUOLO *et al.*, 2009). Não obstante, após a meta análise dos efeitos morfológicos do treinamento com sobrecarga, foi observada que essa intervenção acarretou aumento da área total da placa motora das fibras rápidas (KRAUSE NETO *et al.*, 2015).

1.1.2 Músculo Estriado Esquelético

O tecido muscular estriado esquelético é formado por células cilíndricas, longas e multinucleadas, que possuem a capacidade de realizar movimentos de contração e relaxamento muscular, a partir da indução de estímulos oriundos dos neurônios motores, via JNM (GONZALEZ-FREIRE *et al.*, 2016). As fibras musculares podem apresentar metabolismo oxidativo (Tipo I), glicolítico (Tipo IIx) ou ambos (Tipo IIa); no entanto, a plasticidade da composição miofibrilar está relacionada com a carga mecânica, que resulta na hipertrofia, e com a frequência do impulso nervoso e vias de sinalização intracelular, que promovem a mudança no padrão da fibra adulta (QAISAR; BHASKARAN; VAN REMMEN, 2016).

Em relação à sua constituição, as fibras musculares são compostas por miofibrilas e formadas por sarcômeros seriados (RASSIER, 2017). A morfologia do sarcômero é delimitada por dois discos Z, composto por filamentos de actina e miosina associados com nebulina e titina, respectivamente, além de proteínas que auxiliam a estrutura e função como troponina, tropomiosina, obscurina e proteína C de ligação à miosina (MyBP-C); por conseguinte, os sarcômeros são as menores unidades contráteis do músculo (LIN; SONG; SADAYAPPAN, 2017).

Existem duas teorias para a realização da contração muscular nas unidades contráteis: (a) pelo deslizamento e sobreposição dos filamentos de actina e miosina, e (b) que o deslizamento dos filamentos é propiciado pela rotação de pontes cruzadas entre os filamentos (RASSIER, 2017). Portanto, a sobreposição dos filamentos produz força de forma proporcional e, concomitantemente, a estrutura sarcomérica seriada, os filamentos intermediários e os discos Z, estabilizados pela titina, coordenam e compartilham a força gerada, além de manter os comprimentos dos sarcômeros durante o alongamento muscular (JOUAAA *et al.*, 2018).

Adjacente ao músculo, os tecidos conjuntivos como os tendões, os ligamentos e o tecido conjuntivo intramuscular são essenciais para o crescimento, diferenciação, desenvolvimento e auxílio na regeneração muscular frente às lesões; sobretudo, inerente as miofibras está a camada de tecido conjuntivo endomísio, o qual expressa a quimiocina 12 do C-X-C *motif* (CXCL12), que auxilia no recrutamento e na fusão de células satélites (CSs) na região da lesão muscular (NASSARI; DUPREZ; FOURNIER-THIBAUT, 2017).

No presente estudo o músculo gastrocnêmio foi utilizado para analisar e compreender as alterações morfológicas propiciadas por diferentes estímulos externos. O músculo gastrocnêmio é formado pelos ventres medial e lateral, com extremidades proximais nos côndilos femorais medial e lateral, respectivamente (CAZEAU; STIGLITZ, 2014). Trata-se de um músculo superficial composto por fibras Tipo II, localizado na região posterior da perna, os ventres formam uma aponeurose na extremidade distal que se estende ao tendão calcâneo e exerce função na flexão plantar, na marcha, na propulsão, no balanço e auxilia na flexão do joelho (DAYTON, 2017).

1.1.3 Alongamento Estático

O alongamento estático é uma prática física difundida entre atletas e praticantes de treinamento físico, com o intuito de melhorar a amplitude articular da região alvo e reduzir o risco de lesões, na qual o músculo ou grupamento muscular de interesse é alongado por um período curto de tempo (BEHM *et al.*, 2015). Além disso, o alongamento estático é incorporado em exercícios de aquecimento prévio ao treinamento físico (BEHM *et al.*, 2021). Essa prática possui a capacidade de reduzir a rigidez muscular, contudo, a duração do alongamento estático e a

arquitetura muscular afetam os resultados obtidos (KONRAD; STAFILIDIS; TILP, 2017).

O período necessário de execução do alongamento estático para que ocorra o aumento da flexibilidade muscular tem característica músculo-específica; contudo, em um estudo conduzido em humanos, o período de cinco minutos de alongamento estático conseguiu promover aumento da amplitude de movimento nos músculos quadríceps, bíceps femoral, semitendinoso, semimembranoso, gastrocnêmio e sóleo (TAKEUCHI; TSUKUDA, 2019). Em um estudo realizado com humanos, o uso do protocolo de alongamento estático de 10 repetições de 30 segundos, com o volume total de 300 segundos, foi capaz de garantir os efeitos na amplitude de movimento e de manter a intensidade tolerável ao indivíduo (MATSUO *et al.*, 2019). Entretanto, em humanos, o alongamento estático aparenta ser uma prática que compromete a geração de força muscular quando realizado em período superior a 60 segundos (CHAABENE *et al.*, 2019).

Em estudos experimentais, o alongamento causa uma diversidade de efeitos na vascularização, nas fibras musculares, nos sarcômeros em série e no tecido conjuntivo intramuscular. Em ratos jovens, a prática do alongamento induziu a angiogênese, o aumento do volume microvascular e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HOTTA *et al.*, 2018). Em relação às fibras musculares, o alongamento foi capaz de aumentar o comprimento da fibra e reduzir o número de sarcômeros no músculo gastrocnêmio (PEIXINHO *et al.*, 2014).

A quantificação dos sarcômeros em série demonstrou resultados diversificados visto que, no músculo sóleo, essa prática induziu a sarcomerogênese em ratos saudáveis submetidos à 10 repetições de alongamento estático passivo de 1 minuto, com 30 segundos de intervalo, por 10 e 15 dias (PEVIANI *et al.*, 2018). Contudo, o músculo sóleo submetido ao alongamento de 30 segundos, com intervalo de 30 segundos, por três dias consecutivos, revelou resultados contrários ao indicar que a intervenção de alongamento não promoveu alterações no número e no comprimento dos sarcômeros em série (BERTOLINI; BARBIERI; MAZZER, 2009).

O alongamento é uma intervenção eficiente na modulação do tecido conjuntivo intramuscular. Em ratas idosas, o efeito agudo do protocolo de alongamento estático de 4 repetições de 1 minuto, com 30 segundos de intervalo, por três sessões, resultou em modificações na distribuição dos tipos de colágeno,

provocou a redução da área de colágeno tipo I e aumento da área do tipo II, além de demonstrar redução da área de secção transversa das fibras musculares (ZOTZ *et al.*, 2016). Além disso, o uso terapêutico do alongamento após a imobilização de sete dias, em ratos de 21 dias de idade, revelou a redução dos níveis de colágeno tipo IV (GIANELO *et al.*, 2016). Em contrapartida, em ratos denervados, essa prática se mostrou capaz de aumentar a proliferação do tecido conjuntivo e contribuir com a fibrose (FATURI *et al.*, 2016).

Sob o ponto de vista da estrutura celular e das CSs, o alongamento mecânico *in vitro* atuou na modulação e direcionamento do citoesqueleto, na ativação de CSs através da via de ação molecular da Calmodulina-nNOS-NO-MMP2-HGF-cMet, que resultou na regulação da massa muscular estriada esquelética, devido ao estímulo da síntese proteica e da proliferação dos mioblastos (WANG *et al.*, 2020).

1.1.4 Escada vertical

A escada vertical é um modelo experimental de treinamento resistido amplamente utilizado, visto que é um equipamento de fácil construção, os animais adaptados realizam, principalmente, contração concêntrica e são capazes de realizar o treinamento sozinhos, o que reduz a necessidade de reforço do comportamento; inclusive, a intensidade do treino pode ser modificada através da carga, do número de escaladas e de repetições (KRAUSE NETO *et al.*, 2016).

O treinamento em escada vertical realizado com sobrecarga mostrou a capacidade de alterar as características da JNM dos músculos plantar e extensor longo dos dedos (EDL) (DESCHENES *et al.*, 2016), do músculo sóleo (DESCHENES *et al.*, 2000), ambos em ratos jovens, e dos músculos sóleo e plantar em ratos idosos (KRAUSE NETO *et al.*, 2017b, 2017a). Além disso, promoveu aumento da massa muscular e da área de secção transversa dos músculos reto femoral, sóleo, plantar e EDL (DUNCAN; WILLIAMS; LYNCH, 1998). Estudo recente demonstrou que os sarcômeros da junção miotendínea apresentaram alterações morfoquantitativas distintas sob o treinamento em escada vertical realizado com e sem sobrecarga adicional ao peso corporal de ratos *Wistar* adultos (ROCHA *et al.*, 2020b).

Considerando o treinamento resistido, este é constituído por um exercício com poucas repetições, que visa o estímulo da resistência muscular de um

grupamento muscular específico (MARZETTI *et al.*, 2017). O treinamento resistido compreende a movimentação decorrente das contrações concêntricas e excêntricas promovidas pelas repetições musculares; além disso, as adaptações do sistema nervoso, da morfologia e arquitetura muscular e da hipertrofia das fibras Tipo II, devido ao aumento da síntese proteica, resultam em desenvolvimento de maior força muscular (DOUGLAS *et al.*, 2017).

As respostas musculares a essa categoria de treinamento dependem de variáveis como a carga, número de repetições, tipo de exercício, duração e velocidade dos movimentos (SPIERING *et al.*, 2008). Dentre os modelos animais, os roedores são sensíveis ao volume de treinamento, compreendido pela multiplicação das séries, repetições e da carga utilizada, de modo que consiste de uma característica modulatória do treinamento (LOURENÇO *et al.*, 2020).

A partir do estudo com diferentes volumes de treinamento conduzido em humanos, existiu uma relação dose-dependente do volume de treino e a hipertrofia das fibras Tipo II, além de que o uso do volume moderado provocou o aumento da espessura muscular (SCHOENFELD *et al.*, 2016). Por outro lado, um estudo de escada vertical realizada, com quatro e oito escaladas, com ratos *Wistar* revelou que o volume de carga menor resultou em hipertrofia sem alterações no proteoma muscular, enquanto que o volume de carga maior ocasionou hipertrofia e redução da quantidade de proteínas relacionadas à síntese proteica, metabolismo de carboidratos, defesa antioxidante e transporte de oxigênio (TIBANA *et al.*, 2017).

A execução do treinamento sem carga extra é uma alternativa que demanda de uso mínimo ou não necessita de equipamentos (KOTARSKY *et al.*, 2018). Além disso, é uma modalidade de exercício que pode ser realizada em situações de *lockdown* e de distanciamento social (FERREIRA-JÚNIOR; FREITAS; CHAVES, 2020). Estudo conduzido com homens adultos saudáveis revelou que, mesmo com baixa intensidade, o treinamento com peso corporal promoveu hipertrofia e aumento na força muscular nos músculos peitoral maior e tríceps braquial (KIKUCHI; NAKAZATO, 2017).

1.2 Justificativa

O treinamento resistido é reconhecido como um conjunto de atividades que promovem a redução do risco de doenças crônicas, além de influenciar complexos

arranjos estruturais, ultraestruturais, histoquímicos e morfométricos da JNM e do ventre muscular. O estudo conduzido por Rocha *et al.* (2020b) demonstrou que houve diferenças histoquímicas e morfométricas das fibras musculares em modelo experimental submetido às diferentes modalidades de escada vertical, revelando que a plasticidade desse componente depende da carga utilizada e exercício realizado.

A baixa infraestrutura requerida pelo treinamento sem carga extra a torna uma forma acessível de treinamento. Inclusive, estudos prévios analisaram que, o uso por indivíduos humanos saudáveis, promoveu hipertrofia e aumento da força muscular (KIKUCHI; NAKAZATO, 2017) e da espessura muscular (KOTARSKY *et al.*, 2018). Portanto, torna-se necessário investigar as plasticidades neuro-musculares desencadeadas pelo uso dessa modalidade.

Por sua vez, o alongamento estático é uma prática física amplamente utilizada e estudos experimentais revelaram sua capacidade de modulação dos componentes musculares, tais como o tecido conjuntivo intramuscular e a indução da sarcomerogênese. Desse modo, torna-se essencial a compreensão das adaptações na morfologia da JNM e nos componentes musculares frente ao alongamento estático e a sua associação prévia às modalidades de escada vertical.

A relação neuro-muscular é uma interessante, complexa e relevante área de investigação, ao se considerar a sua essencial função no movimento e a plasticidade de seus componentes diante de estímulos externos, inclusive, sendo suscetível ao exercício físico. No presente estudo, pretende-se compreender a plasticidade da placa motora e as adaptações das miofibras e componentes do ventre muscular que são primordiais à contração muscular.

2 OBJETIVO

Descrever as adaptações morfológicas na junção neuromuscular (JNM), nas fibras musculares e na organização do ventre muscular de ratos *Wistar* submetidos ao alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical.

2.1 Objetivos específicos

- a) Descrever e caracterizar a JNM dos diferentes grupos experimentais através do método de imunofluorescência;
- b) Realizar a análise das dimensões da placa motora, através da mensuração do diâmetro, área e perímetro da placa motora; da área, perímetro e número de *clusters* de AchR; e obter a compacidade, área média por *cluster* e índice de fragmentação – através das imagens de imunofluorescência;
- c) Realizar a análise morfométrica, área de secção transversa, dos diferentes tipos de fibras musculares – através da técnica de ATPase miofibrilar;
- d) Quantificar o volume numérico dos diferentes tipos de fibras musculares e do volume numérico total – através da técnica de ATPase miofibrilar;
- e) Descrever os aspectos estruturais do ventre muscular através do método da microscopia de luz, a partir das colorações de Hematoxilina-Eosina e Picro-sírius red;
- f) Determinar a complexidade de organização mionuclear e de colágeno intersticial do ventre muscular - através de análise da geometria da dimensão fractal;
- g) Realizar a análise funcional do tempo, movimento e trabalho por sessão de treinamento em escada vertical - através dos dados registrados durante as sessões;
- h) Realizar a análise funcional do trabalho inicial e final – através do teste de Carga Máxima Carregada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

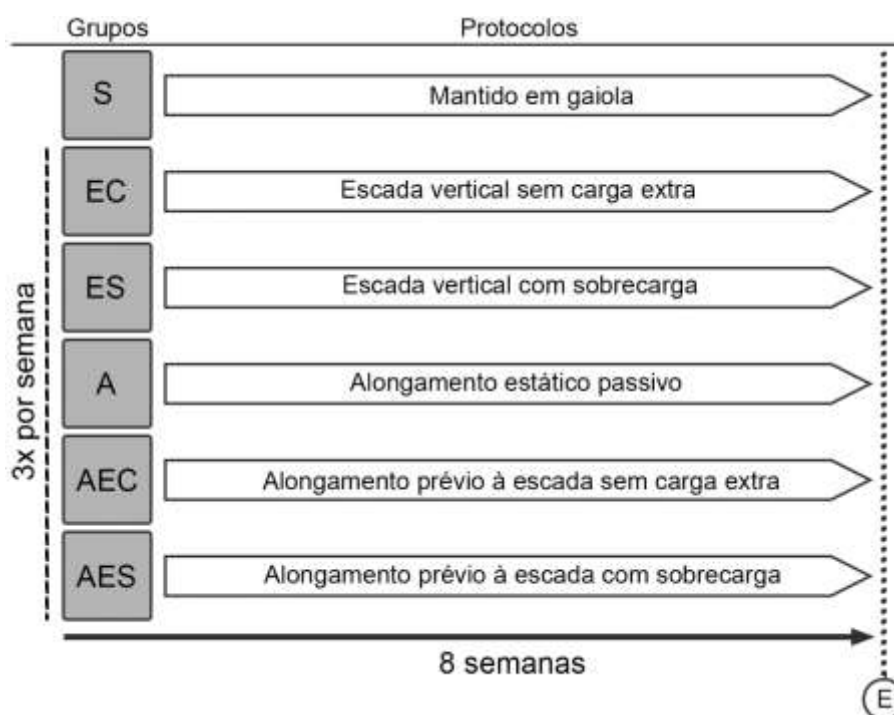
Os ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* são modelos animais amplamente utilizados na pesquisa científica experimental, contudo, a relação entre a idade de humanos e dos ratos não possui equivalência direta e apresentam diferença entre os períodos de desenvolvimento do animal (SENGUPTA, 2013). O início do período reprodutivo e o comportamento dos animais mostraram que a transição do período puberal para a idade adulta se inicia, em média, após 63 dias do período pós-natal (SENGUPTA, 2013). Dessa forma, para o delineamento experimental do presente estudo (Figura 3) foram utilizados 60 ratos *Wistar*, com 60 dias de idade, separados aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n = 10):

- a) **Sedentário (S)**: os animais foram mantidos em gaiolas;
- b) **Escada vertical sem carga extra (EC)**: os animais foram submetidos ao treinamento de escalada sem sobrecarga;
- c) **Escada vertical com sobrecarga (ES)**: os animais foram submetidos ao treinamento de escalada com sobrecarga;
- d) **Alongado (A)**: os animais foram submetidos ao alongamento estático passivo;
- e) **Alongado e Escada vertical sem carga extra (AEC)**: os animais foram submetidos ao alongamento estático passivo prévio ao treinamento de escalada sem sobrecarga e;
- f) **Alongado e Escada vertical com sobrecarga (AES)**: os animais foram submetidos ao alongamento estático passivo prévio ao treinamento de escalada com sobrecarga.

Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu – SP – Brasil. Foram mantidos em gaiolas com 5 ratos, alocados no Biotério Setorial do Laboratório de Morfologia e Atividade Física do Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências, UNESP – Campus Rio Claro – SP – Brasil, com temperatura controlada à $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 12h, e com água e ração balanceada *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Processo nº

13/2019) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro – SP – Brasil.

Figura 3 – Delineamento experimental.



Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Delineamento dos grupos experimentais. Grupos: **S**: Sedentário; **EC**: Escada vertical sem carga extra; **ES**: Escada vertical com sobrecarga. **A**: Alongado; **AEC**: Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. Os grupos EC, ES, A, AEC e AES foram submetidos aos respectivos protocolos 3x por semana, intercalados com um dia de intervalo e, sem a realização dos protocolos aos finais de semana. O tempo de experimentação foi de oito semanas, totalizando 24 sessões e, ao final do experimento, foi realizado a eutanásia dos animais (**E**) e coleta dos materiais biológicos.

3.2 Protocolo de alongamento estático passivo

Os animais dos grupos **A**, **AEC** e **AES** foram submetidos ao protocolo de alongamento estático passivo. O músculo gastrocnêmio possui extremidades proximais nos côndilos femorais, e sua extremidade distal contribui para a formação do tendão calcâneo (CAZEAU; STIGLITZ, 2014). Dessa forma, a força máxima de alongamento é obtida com o joelho em extensão máxima e em dorsiflexão plantar (DAYTON, 2017). Para a execução do protocolo, os animais tiveram a região anterior imobilizada com o auxílio do contensor (Figura 4A), o joelho direito foi mantido em extensão máxima e foi aplicada força manual (realizada pelo mesmo executor durante todo experimento) na porção plantar da pata posterior direita, com

movimento de dorsiflexão da articulação talocrural (Figura 4B), seguido por repouso na posição articular neutra (Figura 4A). Cada sessão consistiu em 10 repetições de 30 segundos de alongamento, seguido por 30 segundos de intervalo (GIANELO *et al.*, 2016). Foi realizado 3x na semana, intercalados com um dia de intervalo e sem a realização dos protocolos aos finais de semana, por 8 semanas, totalizando 24 sessões ao final do protocolo.

Figura 4 – Protocolo de alongamento estático passivo.



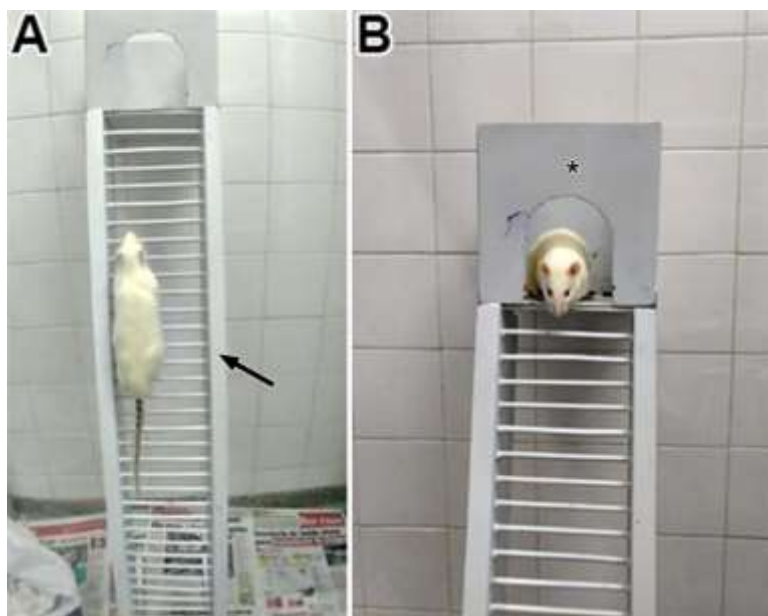
Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: **A.** A região anterior do animal foi imobilizada com auxílio de um contensor (*) enquanto a articulação talocrural permanece na posição articular neutra (**seta**). **B.** Contensor (*) imobilizando a região anterior do animal e movimento de dorsiflexão da articulação talocrural (**seta**) da pata posterior direita.

3.3 Protocolos de escada vertical

Os protocolos de escada vertical foram realizados no equipamento de 1,1m de altura, 80° de inclinação e com uma câmara de alojamento localizada na parte superior da escada (Figura 5A, B). Os animais dos grupos de treinamento de escalada foram adaptados à escada vertical, através da realização de cinco escaladas por três dias intercalados, com um dia de intervalo. Os grupos **EC** e **AEC** foram adaptados sem carga adicional, enquanto os grupos **ES** e **AES** carregaram um peso de chumbo equivalente a 50% da massa corpórea individual, fixado à região proximal da cauda. Além disso, os grupos **AEC** e **AES** foram submetidos ao

alongamento estático passivo prévio ao treinamento de escada vertical sem carga extra e com sobrecarga, respectivamente.

Figura 5 – Protocolo de escada vertical.



Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: **A.** Treinamento de escalada vertical foi realizado em equipamento de escada vertical (**seta**). **B.** Câmara de alojamento (*) destinado para o descanso do animal entre as escaladas.

3.3.1 Protocolo de escada vertical sem carga extra

Os animais dos grupos **EC** e **AEC** realizaram nove escaladas sem carga extra, e permaneceram na câmara de alojamento por 60 segundos de intervalo entre as escaladas (NEVES *et al.*, 2016; PIMENTEL NETO *et al.*, 2020). O protocolo de treinamento foi executado 3x por semana, intercalados com um dia de intervalo e sem a realização dos protocolos aos finais de semana, por oito semanas, e foi finalizado ao completar 24 sessões (TIBANA *et al.*, 2017). Em cada sessão foram coletados dados do n° de escaladas, o tempo e os movimentos da pata direita anterior realizados para cada escalada.

Após a finalização do protocolo de treinamento, foram analisados os trabalhos (T) realizados no decorrer das sessões, com o auxílio do *software* Excel®. Para isso, em cada sessão foi obtido o trabalho a partir da massa corporal em gramas (MC), aceleração da gravidade ($9,8 \text{ m/s}^2$) e altura da escada (1,1m), através do cálculo matemático por escalada ($T_{\text{escalada}} = MC \times 9,8 \times 1,1$), e posteriormente,

obtido o trabalho da sessão através da somatória dos T_{escalada} , ambos expressos em joules (J) (DROR *et al.*, 2018).

3.3.2 Protocolo de escada vertical com sobrecarga

Os animais dos grupos **ES** e **AES** realizaram nove escaladas com sobrecarga e permaneceram na câmara de alojamento por 120 segundos entre as escaladas. As quatro primeiras escaladas foram realizadas com o valor de 50%, 75%, 90% e 100% da massa corporal individual, e foram adicionadas 30g a cada escalada (KRAUSE NETO *et al.*, 2018; PIMENTEL NETO *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2014). As sobrecargas foram construídas com pesos de chumbo referentes à massa corpórea individual, corrigidas semanalmente, e foram fixadas à região proximal da cauda. O protocolo de treinamento foi executado 3x por semana, intercalados com um dia de intervalo e sem a realização dos protocolos aos finais de semana, por oito semanas, e foi finalizado ao completar 24 sessões (TIBANA *et al.*, 2017)

Em cada sessão foram coletados dados do nº de escaladas, o tempo e os movimentos da pata direita anterior realizados para cada escalada. Na 1ª sessão e na 24ª sessão foram realizados os Testes de Carga Máxima Carregada (TCMC) (descrito na subseção 3.4). Após a finalização do protocolo de treinamento, foram analisados os trabalhos (T) realizados no decorrer das sessões, com o auxílio do *software* Excel®. Para isso, a cada sessão individual foi obtido o trabalho a partir da massa corporal em gramas (MC), sobrecarga (g), aceleração da gravidade (9,8 m/s²) e altura da escada (1,1m), através do cálculo matemático por escalada ($T_{\text{escalada}} = (MC + \text{sobrecarga}) \times 9,8 \times 1,1$), e posteriormente, obtido o trabalho individual da sessão através da somatória dos T_{escalada} , ambos expressos em joules (J) (DROR *et al.*, 2018).

3.4 Teste de carga máxima carregada (TCMC)

Os grupos **ES** e **AES** realizaram o TCMC em dois momentos: o teste pré, realizado na 1ª sessão, e o teste pós, na 24ª sessão. A realização desse teste permitiu avaliar a carga máxima dos animais e quais as variações entre os grupos experimentais de treinamento de escada vertical com sobrecarga. Em ambos os

testes do TCMC, a escalada inicial foi realizada com adição de peso de chumbo correspondente a 50% da massa corpórea do animal, fixado à região proximal da cauda; foram adicionados 30g de peso de chumbo extra a cada escalada completada, e os animais tiveram 120 segundos de intervalo entre as escaladas. As escaladas foram realizadas até que o animal não conseguisse completar a escalada após três tentativas (KRAUSE NETO *et al.*, 2017b).

Para cada grupo experimental foram analisados os trabalhos (T) realizados no em ambos os testes, com o auxílio do *software* Excel[®]. Para cada teste individual foi obtido o trabalho, a partir da massa corporal em gramas (MC), sobrecarga (g), aceleração da gravidade ($9,8 \text{ m/s}^2$) e altura da escada (1,1m), através do cálculo matemático por escalada ($T_{\text{escalada}} = (MC + \text{sobrecarga}) \times 9,8 \times 1,1$), e posteriormente, obtido o trabalho individual da sessão através da somatória dos T_{escalada} , ambos expressos em joules (J) (DROR *et al.*, 2018).

3.5 Massa corporal

As massas corporais (MC) dos grupos foram mensuradas em balança semianalítica (Marte LC1[®]) a cada duas semanas: no início (*baseline*) da 1^a, 3^a, 5^a e 7^a semanas e ao final do experimento, para a obtenção da massa corporal final.

3.6 Massa muscular

A massa muscular (MM) do gastrocnêmio foi mensurada, após a eutanásia, com o auxílio de uma balança semianalítica (Marte Científica[®], AD330). Posteriormente, foi obtida a relação da massa muscular dividida pela massa corporal final (MM/MC) (HOTTA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2014), com o auxílio do *software* Excel[®].

3.7 Eutanásia, coleta e armazenamento das amostras biológicas

Os animais ($n = 10$) de cada grupo experimental foram eutanasiados por overdose de anestésico (Ketamina, 200 mg/kg, e Xilazina, 50 mg/kg, via intraperitoneal), e em seguida, as amostras do ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito foram dissecadas. As amostras foram revestidas em talco

neutro (Tragacanth[®], SIGMA), estabilizadas com cola biológica (Meio Tissue Tek[®] O.C.T., Sakura), alocadas em criomolde (Tissue-Tek[®] Cryomold[®], modelo Standart, Sakura), criofixadas em nitrogênio líquido e armazenadas no Freezer -80°C.

3.8 Microscopia de Luz

3.8.1 Histoquímica Miofibrilar – ATPase

As amostras do ventre do músculo gastrocnêmio (n = 5) de cada grupo experimental foram seccionadas em direção transversal de 10 µm de espessura, com o auxílio de equipamento criostato (Leica CM1860 UV), no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelha (LECA), UNESP – Campus Rio Claro, SP, Brasil.

Para a diferenciação dos tipos de fibras, as secções foram processadas nos pHs 4,3 e 9,4. Para o pH 4,3, as secções foram pré-incubadas em uma solução tampão de acetato de sódio 0,1 M e EDTA 10 mM por 10 minutos à 4 °C. Todas as lâminas foram incubadas por 30 minutos à 37 °C, com uma solução contendo 15 mg de ATP, 15 mL de tampão glicina/NaCl/CaCl₂ e 46,5 mg de Ditiotretol (DTT). Então, as lâminas foram lavadas com água destilada, incubadas com cloreto de cobalto a 2% por 7 minutos, novamente lavadas com água destilada, desidratadas em série de alcoois (70% a absoluto), finalizadas com xilol e montadas com Entellan[®] (ROCHA *et al.*, 2020b).

As imagens foram obtidas através do microscópio de luz (Axioskop 2, Zeiss, Alemanha), através do *software* AxioVision (versão 4.8.2. SP3 (08-2013)), no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura, ESALQ – USP, Piracicaba, SP. A partir de imagens (n = 10 por grupo) com ampliação de 200x, o número de miofibras (Tipo I, IIa, IIx e Total) foi manualmente contado para análise do volume numérico miofibrilar (VN) (ROCHA *et al.*, 2020a). Posteriormente, a área de secção transversa (AST) das miofibras Tipo I, IIa e IIx (n = 100 por tipo/grupo) foi mensurada com o auxílio do *software* ImageJ[®] (NIH, Bethesda, MD, USA) (Figura 6) (DESCHENES *et al.*, 2000; KRAUSE NETO *et al.*, 2018).

Figura 6 – Reação histoquímica de ATPase, identificação e delimitação da área de secção transversa dos tipos miofibrilares.



Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Reação histoquímica de ATPase, onde é possível identificar as miofibras Tipo I (escura), IIa (clara) e IIx (intermediária). Barra: 50 μ m. Em destaque, a delimitação da miofibra Tipo I.

3.8.2 Técnicas de coloração

Foram realizadas secções transversais de 10 μ m de espessura no ventre muscular (n = 5) com o auxílio de equipamento criostato (Leica CM1860 UV), no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelha (LECA), UNESP – Campus Rio Claro, SP. As lâminas de ventre muscular foram coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), para a evidenciação dos componentes celulares (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014), e para destaque do tecido conjuntivo associado foi utilizado Picro-sírius red (PSR) (BHUTDA *et al.*, 2017). As imagens (n = 16 imagens por grupo) foram obtidas com o auxílio do microscópio de luz (Axioskop 2, Zeiss, Alemanha), através do *software* AxioVision (versão 4.8.2. SP3 (08-2013)), no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura, ESALQ – USP, Piracicaba, SP.

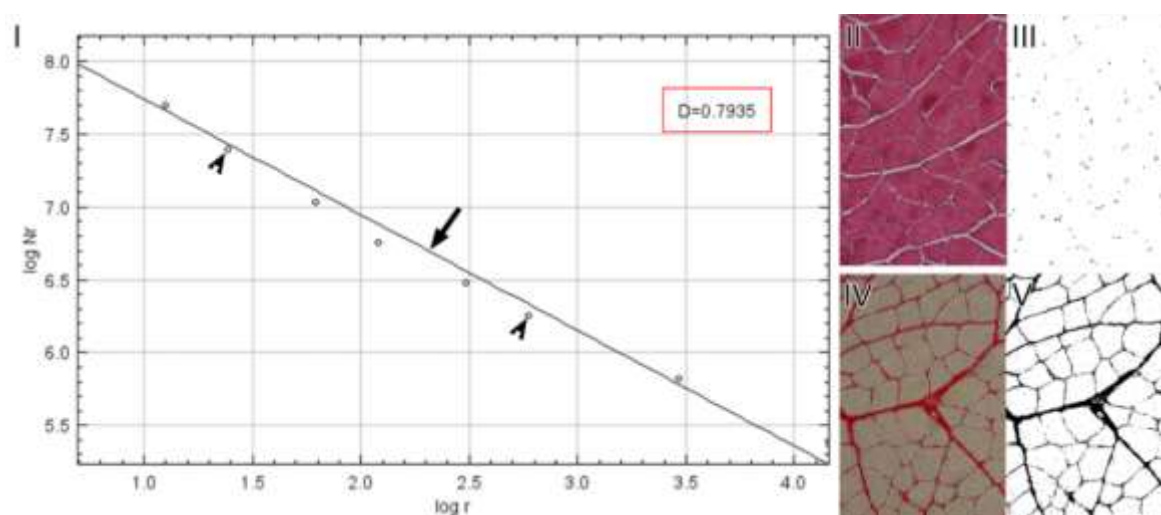
3.8.3 Análise da Dimensão Fractal (DF)

A geometria da dimensão fractal (DF) é uma relação entre a escala total da imagem que pode ser medida e o valor mensurado; além disso é possível estabelecer essa relação a partir da similaridade de formas (Ds), e que pode ser realizado pelo método de *box counting*, no qual os padrões da imagem são mensurados por quadrados de tamanhos decrescentes. Dessa forma, é

estabelecido uma relação logarítmica entre o número total de cada quadrado necessário para cobrir a imagem (Nr) e os tamanhos específicos do quadrado (r) ($D_s = \left(\frac{\log Nr}{\log r^{-1}}\right)$), e o valor de DF é obtido pela inclinação da linha de regressão entre esses valores (Figura 7I) (KARPERIEN *et al.*, 2008).

A partir dessa análise foi possível estabelecer de forma indireta um valor para complexidade das imagens histológicas, visto que cada imagem foi binarizada e apenas a fase preta foi contabilizada (Figura 7II–V) (STANKOVIC *et al.*, 2016). A quantificação não considera a textura e o valor de DF é expresso entre 0 e 2, onde quanto mais próximo de 2, maior a complexidade de organização tecidual (CURY *et al.*, 2018; PACAGNELLI *et al.*, 2016).

Figura 7 – Análise da dimensão fractal dos mionúcleos e interstício do ventre muscular.



Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Análise da dimensão fractal dos mionúcleos e interstício do ventre muscular. (I) A dimensão fractal (DF) por *box counting* é uma relação logarítmica entre o número total de quadrados necessários para cobrir a imagem (log Nr, no eixo y) e o tamanho do quadrado utilizado (log r, no eixo x). A partir dos pontos obtidos dessa relação logarítmica (**cabeça de seta**), é estabelecida uma regressão linear (**seta**) e a inclinação desta regressão informa o valor da dimensão fractal da imagem (**em destaque**). Para a obtenção do valor de DF mionuclear e intersticial, foram utilizadas imagens de secções transversais do ventre muscular coradas com HE (II) e PSR (IV). As imagens foram binarizadas para análise dos mionúcleos (III) e do interstício (V), e apenas a fase preta foi contabilizada para a determinação do valor da DF.

No presente estudo, para o estabelecimento da comparação da complexidade tecidual entre os grupos experimentais, foi utilizado a análise da dimensão fractal pelo método de *box counting*, com o auxílio do *plugin* FraCLac® do

software ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, USA) (Configurações: *Use Binary; Lock white background; Num G: 12; Series: Default Sample Sizes; Sizes: 0; Min size (pixel): 0; Max (% of image): 45*) (KARPERIEN; JELINEK, 2015). O valor de DF foi expresso como unidade arbitrária (UA). Na coloração de HE foi analisada a complexidade de organização dos mionúcleos, e com as imagens de PSR foram analisados a complexidade de organização do tecido conjuntivo associado e a quantificação da área intersticial.

3.9 Imunofluorescência

As amostras do ventre muscular ($n = 5$) foram processadas em secções longitudinais com espessura de 100 μm em equipamento criostato (HM 505 E, MICROM), no Laboratório de Morfologia, UNESP – Campus Rio Claro, SP. Os cortes foram coletados em lâminas silanizadas, lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), tratados com solução com 0,1% de Triton-X e lavados três vezes com PBS. Após esta etapa, os cortes foram incubados *overnight* à 4°C, em solução contendo rodamina conjugada com α -bungarotoxina (BTX, Molecular Probes, Eugene), diluída a 1:600 em PBS, contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS, revestidas com Prolong® (Molecular Probes, Eugene, P36934), e armazenadas em -20°C (ROCHA *et al.*, 2020a).

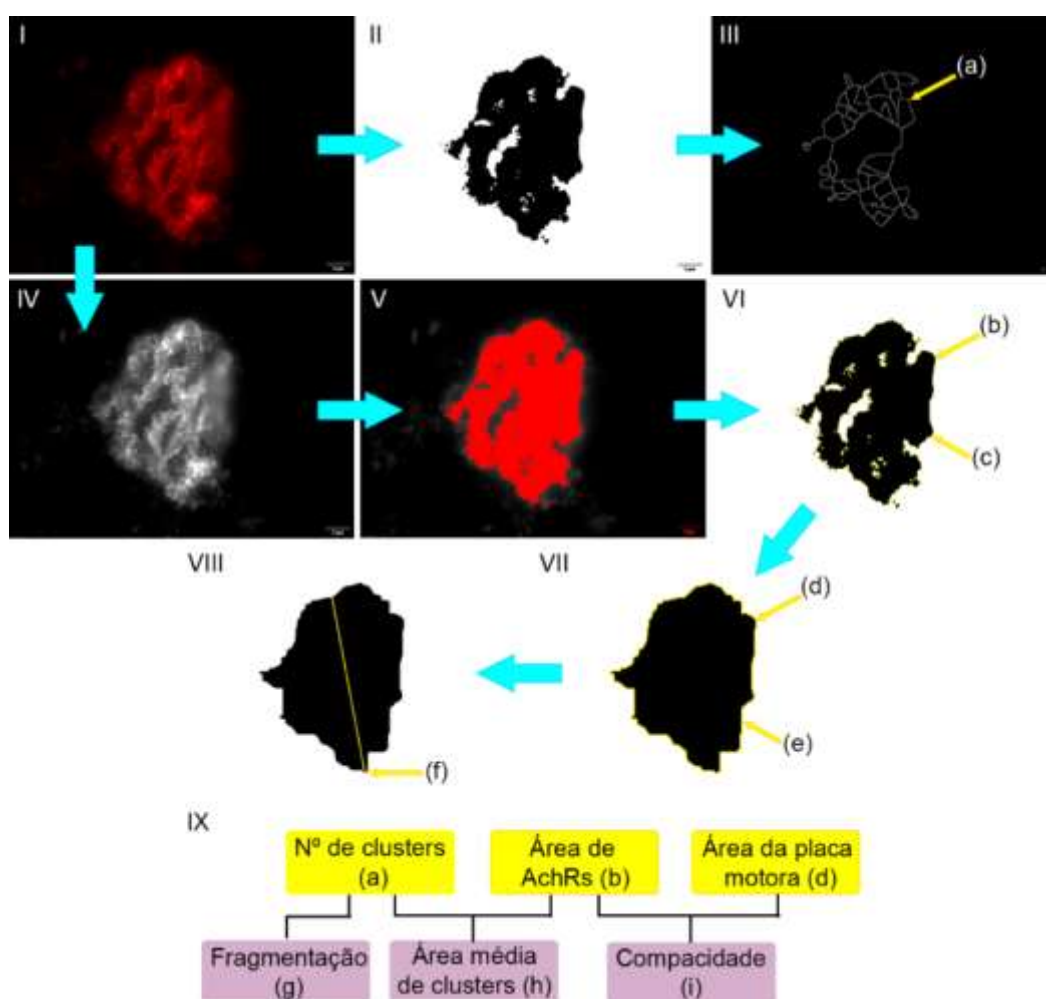
As amostras foram examinadas por um Microscópio de Fluorescência Olympus BX61 (Shinjuku, Japão), com um sistema óptico de fluorescência UIS2, no Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) – UNESP – Campus Rio Claro, SP, Brasil. Para a observação da fluorescência da placa motora foi usado o filtro Texas Red (excitação 596 nm / emissão 620 nm). As imagens ($n = 31$ por grupo) foram obtidas em uma câmera monocromática Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu, Japão), com o *software* CellSens v.11 (Olympus™) e ampliação de 1000x.

As análises morfométricas foram realizadas com o auxílio do *software* ImageJ® (NIH, Bethesda, MD, USA). Para isso, o fluxo de trabalho foi utilizado para definir as variáveis principais: (a) número de *clusters* de AchR; (b) área dos AchR e (c) perímetro dos AchR, ambos delimitados pela região fluorescente dos *clusters* de AchR; (d) área da placa motora e (e) perímetro da placa motora, ambos delimitados pela região fluorescente e sem fluorescência da placa motora; e (f) diâmetro da

placa motora, obtido pelo maior diâmetro da placa motora (Figura 8) (JONES *et al.*, 2016).

Em seguida, as variáveis derivadas foram obtidas, sendo elas: (g) fragmentação, obtido a partir do cálculo $\left(1 - \left(1/\text{Número de clusters de AchRs}\right)\right)$, que gera um índice do estado da morfologia da placa motora, de estrutura sólida (valor próximo a 0) à estrutura altamente fragmentada (valor próximo a 1); (h) área média de *clusters* de AchR, obtido pela divisão da área dos AchR pelo número de clusters de AchR; e (i) compacidade, valor percentual obtido pela divisão da área de AchR pela área da placa motora, e multiplicado o valor por 100 (Figura 8) (JONES *et al.*, 2016).

Figura 8 – Fluxo de trabalho utilizado para as variáveis principais e derivadas da placa motora.



Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Fluxo de trabalho para a obtenção das variáveis principais e derivadas da placa motora. A partir da imagem de imunofluorescência da placa motora (I), a imagem foi binarizada (II), e os segmentos foram evidenciados (III) para a contagem manual dos *clusters* de AchR (a). A imagem de imunofluorescência da placa

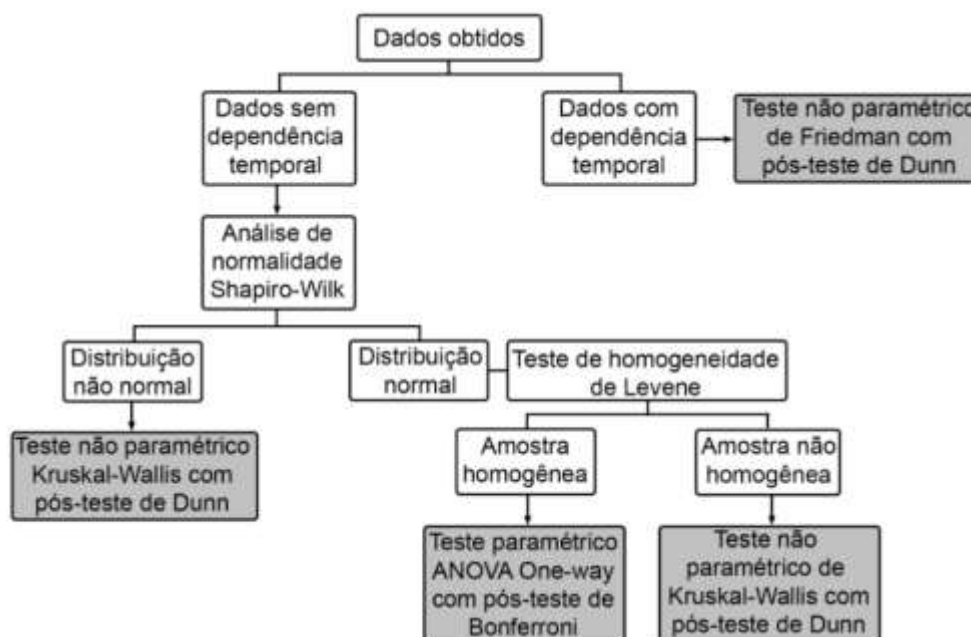
motora (I) passou pelo processo de separação dos canais de cor RGB (vermelho, verde e azul), e o canal vermelho (IV) foi utilizado para delimitar a região com fluorescência (V), e posteriormente, foi binarizado (VI) e aferido a área (b) e perímetro (c) dos AchR. Subsequentemente, a região da placa motora foi estabelecida (VII), foram obtidos a área (d) e perímetro (e) da placa motora, e foi delimitado manualmente (VIII) o maior diâmetro da placa motora (f). (IX) O fluxograma representa as variáveis principais (a, b e d) que foram utilizadas para os cálculos do índice de fragmentação da placa motora (g), a área média de *clusters* de AchR (h) e compacidade da placa motora (i).

3.10 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software* GraphPad Prism® 8.0.1. e para a determinação do tratamento estatístico adequado foram consideradas a distribuição dos dados (distribuição gaussiana), a homogeneidade da variâncias e a dependência temporal (Figura 9). A normalidade de distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk (alfa = 0,05), e as variáveis com distribuição não normal foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

Os dados com distribuição normal foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene, a partir da subtração dos valores individuais pela mediana do grupo, e os resultados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA One-way (paramétrica). Caso o valor de p fosse baixo ($p < 0,05$), a amostra foi considerada sem homogeneidade e analisada pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Por outro lado, se o valor de p obtido fosse alto ($p > 0,05$), a amostra foi considerada homogênea e submetida à análise de variância ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Ainda, os dados que verificaram a progressão intragrupo foram considerados como dados dependentes e, dessa forma, foi escolhido o teste não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

Figura 9 – Fluxograma da determinação do tratamento estatístico com base na dependência temporal, na distribuição dos dados e na homogeneidade de variância.



Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Fluxograma da escolha do tratamento estatístico. O teste não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn foi utilizado para os dados que apresentaram dependência temporal. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para os dados independentes, com distribuição não normal e nos dados com distribuição normal de uma amostra com variância não homogênea. O teste paramétrico ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para os dados independentes, com distribuição normal e com variância homogênea.

Os tratamentos estatísticos realizados para todas as variáveis analisadas no presente estudo estão representados na Tabela 1. A análise de variância ANOVA One-way (paramétrica) com pós-teste de Bonferroni foi utilizada para os dados de massa corporal (MC) da 1^a, 3^a, 5^a e 7^a semanas de treinamento, na relação da massa muscular e da massa corporal (MM/MC), no volume numérico miofibrilar (VN) (Tipo IIa e IIx) e Total, na dimensão fractal mionuclear e intersticial e no trabalho realizado na 8^a semana de treinamento.

As análises da MC final, massa muscular, variáveis da placa motora (diâmetro da placa, área e perímetro da placa, área e perímetro dos AchR, compacidade, número de *clusters* de AchR, área média de *clusters* de AchR e índice de fragmentação), área de secção transversa das miofibras (Tipo I, IIa e IIx), volume numérico miofibrilar Tipo I, área intersticial e do trabalho da 1^a semana de treinamento foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O teste não paramétrico de Friedman com pós-

teste de Dunn foi escolhido para a análise dos dados de tempo e movimento das semanas de treinamento e trabalho do TCMC.

Tabela 1 – Tabela dos tratamentos estatísticos utilizados para as variáveis analisadas.

	Tratamento estatístico		
	ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni	Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn	Friedman com pós-teste de Dunn
1ª MC	X		
3ª MC	X		
5ª MC	X		
7ª MC	X		
MC final		X	
MM		X	
MM/MC	X		
Diâmetro da placa		X	
Área da placa		X	
Perímetro da placa		X	
Área dos AchR		X	
Perímetro dos AchR		X	
Compacidade		X	
Nº de <i>clusters</i> de AchR		X	
Área média dos <i>clusters</i> de AchR		X	
Índice de fragmentação		X	
AST das miofibras		X	
VN Tipo I		X	
VN Tipos IIa e IIx	X		
VN total	X		
DF mionuclear	X		
DF intersticial	X		
Área intersticial		X	
Tempo			X
Movimento			X
T da 1ª semana		X	

T da 8ª semana X

T do TCMC

X

Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Tabela de tratamento estatístico utilizado nas variáveis analisadas. As variáveis estão listadas (**coluna à esquerda**) e o tratamento utilizado está assinalado (**X**). O teste paramétrico ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para a 1ª MC, 3ª MC, 5ª MC, 7ª MC, MM/MC, VN dos Tipos IIa e IIx, VN Total, DF mionuclear, DF intersticial e T da 8ª semana. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi usado para a MC final, MM, diâmetro da placa, área da placa, perímetro da placa, área dos AchR, perímetro dos AchR, compacidade, nº de *clusters* de AchR, área média dos *clusters* de AchR, índice de fragmentação, AST das miofibras, VN do Tipo I, área intersticial e T da 1ª semana. O teste não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn foi utilizado para tempo, movimento e T do TCMC. MC: massa corporal; MM: massa muscular; MM/MC: relação da massa muscular e massa corporal; AchR: receptores de acetilcolina; Nº: número; AST: área de secção transversa; VN: volume numérico miofibrilar; DF: dimensão fractal; T: trabalho; TCMC: teste de carga máxima carregada.

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal e muscular

A massa corporal foi mensurada em quatro períodos durante a execução dos protocolos, e os valores obtidos estão expressos em média e desvio padrão na Tabela 2. A massa corporal da primeira semana (*baseline*) mostrou que os animais de grupo S apresentaram valores menores em comparação com os grupos EC ($p < 0,0001$), ES ($p < 0,0001$), A ($p < 0,001$), AEC ($p < 0,01$) e AES ($p < 0,001$). Ao decorrer da terceira, quinta e sétima semanas, foi possível observar que, em todos os grupos, houve o aumento das massas corporais, e mesmo com valores divergentes, não ocorreu diferenças estatisticamente relevantes. As massas corporais finais dos grupos experimentais estão representadas na Tabela 3.

Tabela 2 – Médias e desvios padrões da massa corporal dos grupos experimentais.

Semanas	Grupos					
	S	EC	ES	A	AEC	AES
1 ^a	217,2±14,55	294±8,89****	305±32,70****	280±21,85***	273±15,17**	287,4±20,45***
3 ^a	297±31,02	335,6±16,35	343±36,01	339,6±19,46	313±18,92	325,8±26,20
5 ^a	352±42,36	356,2±13,99	367,2±31,64	364,8±22,38	339,6±22,73	348,6±28,29
7 ^a	402,6±56,23	372,8±12,79	385,4±33,28	379±34,87	350±19,9	369,2±31,85

Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Valores expressos em média ± desvio padrão. As médias das massas corporais estão expressas em gramas. No início da 1^a semana de treinamento (*baseline*) os animais do grupo S apresentaram menor massa corporal do que os demais grupos. No entanto, no decorrer das semanas de treinamento, a massa corporal entre os grupos não apresentou diferença significativa. **S**: Sedentário; **EC**: Escada vertical sem carga extra; **ES**: Escada vertical com sobrecarga. **A**: Alongado; **AEC**: Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste paramétrico ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para 1^a, 3^a, 5^a e 7^a semana. **AEC≠S ($p < 0,01$); ***S≠A, AES ($p < 0,001$); ****S≠EC, ES ($p < 0,0001$).

A Tabela 3 contém os dados obtidos da mensuração da massa corporal final (MC), da massa muscular (MM) e a relação entre ambas (MM/MC); todos expressos em média e desvio padrão. A MC final dos grupos revelou que o grupo S apresentou valores significativamente maiores em comparação a AEC ($p < 0,01$); além disso, apresentou valores maiores do que EC, ES, A e AES ($p > 0,05$). A MM dos grupos AEC (1,02g) e AES (1,26g) demonstraram valores menores em comparação com o

grupo S ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Os grupos EC, ES e A revelaram valores similares, com médias entre 1,70g a 1,79g, enquanto que o grupo S apresentou a média de 1,99g; contudo, essas diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

Considerando a diferença entre a MC e MM dos grupos experimentais, a relação entre ambas (MM/MC) revelou um resultado normalizado, no qual ainda houve a predominância das diferenças para os grupos de alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical. O grupo AEC apresentou valores menores em relação aos grupos S ($p < 0,01$), EC e A (ambos com $p < 0,001$); enquanto que o grupo AES demonstrou diferença significativa com o grupo A ($p < 0,05$). Além disso, o grupo AEC ($2,72 \text{mg g}^{-1}$) apresentou valores menores do que o AES ($3,22 \text{mg g}^{-1}$), mas sem diferença estatística ($p > 0,05$). Apesar do grupo S indicar maior MC e MM, a relação entre esses dois dados são similares nos grupos S ($4,23 \text{mg g}^{-1}$) e ES ($4,23 \text{mg g}^{-1}$), e maiores nos grupos EC ($4,53 \text{mg g}^{-1}$) e A ($4,4 \text{mg g}^{-1}$), todos com $p > 0,05$.

Tabela 3 – Médias e desvios padrões da massa corporal final, massa muscular e da relação MM/MC dos grupos experimentais.

	Grupos					
	S	EC	ES	A	AEC	AES
MC (g)	471,6±36,62	395,2±19,40	405,4±38,95	399,4±16,12	372,2±15,64**	388±24,27
MM (g)	1,99±0,09	1,79±0,18	1,70±0,08	1,75±0,23	1,02±0,13***	1,26±0,37*
MM/MC (mg g⁻¹)	4,23±0,31**	4,53±0,38	4,23±0,4	4,4±0,64	2,72±0,24***	3,22±0,81*

Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Valores expressos em média ± desvio padrão. MC (g): Massa corporal final em gramas; MM (g): Massa muscular em gramas; MM/MC (mg g^{-1}) relação entre a MM e a MC, expressa em miligramas por gramas. Os grupos experimentais apresentaram redução da MC final, com destaque para o grupo AEC. Além disso, os grupos experimentais apresentaram menor MM, com destaque para os grupos AEC e AES. Contudo, a relação MM/MC revelou que os grupos EC e A apresentaram maiores valores, o grupo ES foi similar ao S, e houve menores valores para o AEC e AES. **S:** Sedentário; **EC:** Escada vertical sem carga extra; **ES:** Escada vertical com sobrecarga. **A:** Alongado; **AEC:** Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES:** Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para a MC final e para a MM, enquanto que o teste paramétrico ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para os dados de MM/MC. MC: **AEC≠C ($p < 0,01$); MM: *AES≠C ($p < 0,05$); ***AEC≠C ($p < 0,001$); MM/MC: *AES≠A ($p < 0,05$); **AEC≠S ($p < 0,01$); ***AEC≠EC, A ($p < 0,001$).

4.2 Junção Neuromuscular

A imunomarcção dos AchR da placa motora revelou as características morfológicas de cada grupo experimental. O grupo S demonstrou morfologia circular com *clusters* globulares demarcados. O EC apresentou *clusters* dispersos e maior área interna sem fluorescência, enquanto que o ES revelou tamanho menor, com formato elipsoide e intensa fluorescência nos *clusters* presentes na porção externa da placa motora. Nos grupos A e AEC, os AchR presentes no tecido muscular mostraram pequeno tamanho com *clusters* globulares evidentes. O AES apresentou maior região de imunomarcção e *clusters* globulares delimitados (Figura 10).

A análise do diâmetro da placa motora demonstrou que os grupos S ($31,44 \pm 7,39 \mu\text{m}$), A ($31,73 \pm 6,06 \mu\text{m}$), ES ($32,43 \pm 7,17 \mu\text{m}$) e AEC ($32,97 \pm 6,69 \mu\text{m}$) possuem diâmetros similares ($p > 0,05$). Os grupos EC ($35,80 \pm 7,45 \mu\text{m}$) e AES ($37,28 \pm 9,23 \mu\text{m}$) apresentaram os maiores diâmetros, no entanto, as comparações intergrupos não revelaram diferenças ($p > 0,05$) (Figura 10I).

O perímetro dos AchR do grupo EC apresentou valores maiores do que S (43,81%, $p < 0,05$), ES (28,75%, $p > 0,05$) e AEC (43,42%, $p < 0,05$). Em comparação a S, o ES apresentou valor maior (11,70%, $p > 0,05$) e o grupo A apresentou perímetro 11,52% menor ($p > 0,05$). No grupo AEC foi encontrado valores maiores do que S (0,27%, $p > 0,05$) e A (13,32%, $p > 0,05$); por outro lado, o AES revelou percentuais maiores que S (39,26%, $p > 0,05$), ES (24,68%, $p > 0,05$), A (57,39%, $p < 0,01$) e AEC (38,89%, $p > 0,05$) (Figura 10II).

O perímetro da placa motora revelou que os valores de EC foram maiores do que S (20,72%), ES (5,73%) e AEC (13,05%), enquanto que o grupo ES possui comprimento maior em 14,18% em relação a S e 2,94% menor em comparação a AES; porém, sem diferença estatística ($p > 0,05$). Em comparação a S, o grupo A apresentou redução (8,79%, $p > 0,05$), e o AEC (6,78%, $p > 0,05$) e AES (17,64%, $p > 0,05$) apresentaram aumento deste parâmetro. Em relação a A, houve aumento de 17,08% ($p > 0,05$) e 28,98% ($p < 0,05$) para AEC e AES, respectivamente. Ainda, o AES foi 10,16% ($p > 0,05$) maior do que AEC (Figura 10III).

A área dos AchR demonstrou que, comparado a S, o EC (4,55%), AEC (4,81%) e AES (26,17%) apresentaram valores maiores, enquanto que no ES (4,06%) e A (13,08%) houve a redução da área dos AchR; contudo, sem diferença estatística ($p > 0,05$). O grupo EC exibiu maior área de receptores do que ES (8,98%,

$p > 0,05$) e menor do que AEC (0,25%, $p > 0,05$). Em relação a A, o AEC e AES apresentaram percentuais maiores, 20,58% ($p > 0,05$) e 45,15% ($p < 0,05$) respectivamente; ademais, o grupo AES foi 20,37% e 31,51% (ambos com $p > 0,05$) maior do que AEC e ES, respectivamente (Figura 10IV).

A área da placa motora revelou que, em comparação a S, no grupo A foi observado a redução de 11,98% ($p > 0,05$), e nos grupos ES, AEC e AES ocorreu o aumento em 8,48%, 3,62% e 30,30%, respectivamente; todos sem diferença estatística ($p > 0,05$). Ainda, EC apresentou valores maiores do que S (17,41%, $p > 0,05$), ES (8,23%, $p > 0,05$) e AEC (13,30%, $p > 0,05$). Em relação ao grupo A, o AEC (17,73%, $p > 0,05$) e AES (48,05%, $p < 0,01$) apresentaram placas motoras com áreas maiores; além disso, o AES foi 20,12% ($p > 0,05$) e 25,75% ($p > 0,05$) maior do que ES e AEC, respectivamente (Figura 10V).

A compacidade da placa motora revelou que os grupos EC (77,74%), ES (79,07%) e AES (82,16%) obtiveram as menores porcentagens, enquanto que o S (83,47%), A (83,51%) e AEC (85,27%) demonstraram valores crescentes desse parâmetro. A comparação intergrupos revelou que AEC apresentou valores de compacidade maiores do que EC ($p < 0,05$), enquanto as demais comparações não revelaram diferença ($p > 0,05$) (Figura 10VI).

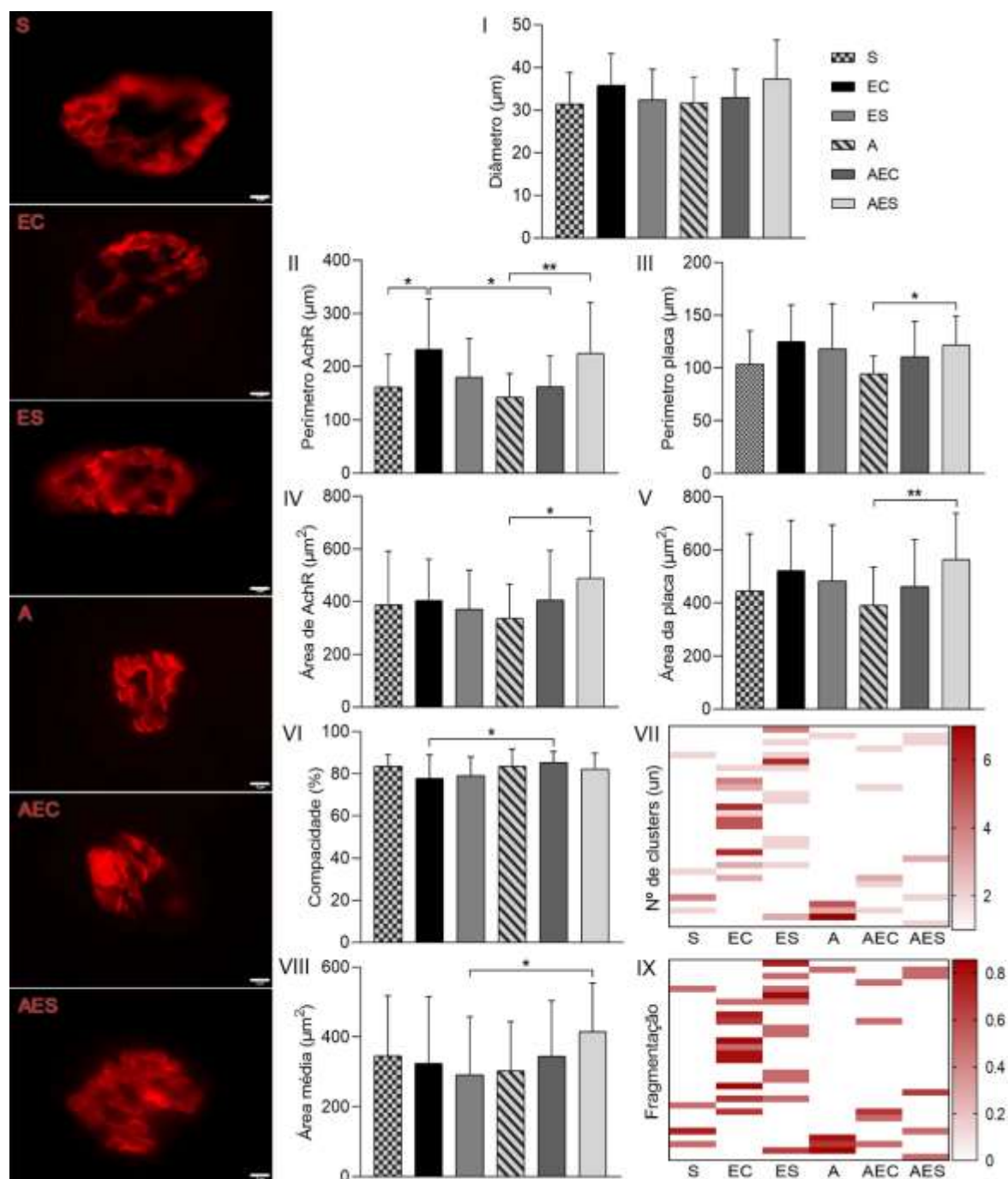
A quantificação manual do número de *clusters* de AchR demonstrou que os grupos S ($1,19 \pm 0,60$), AEC e AES (ambos com $1,19 \pm 0,48$) apresentaram médias semelhantes, enquanto que os grupos A ($1,42 \pm 1,31$), ES ($1,58 \pm 1,09$) e EC ($1,94 \pm 1,61$) resultaram em maior número de clusters e amplo desvio padrão; porém, sem diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 10VII).

A partir da obtenção do número de *clusters* e da área dos AchR foi possível calcular a área média dos *clusters* de AchR. Em comparação a S, o EC (6,37%, $p > 0,05$), ES (15,84%, $p > 0,05$), A (12,61%, $p > 0,05$) e AEC (0,52%, $p > 0,05$) demonstraram valores menores, enquanto que AES apresentou área média maior (19,73%, $p > 0,05$). O EC foi maior do que ES (11,25%, $p > 0,05$) e o AEC foi 6,24% e 13,83% (ambos com $p > 0,05$) maior do que EC e A, respectivamente. Ainda, o AES resultou em área média maior do que ES (42,26%, $p < 0,05$), A (36,99%, $p > 0,05$) e AEC (20,35%, $p > 0,05$) (Figura 10VIII).

O índice de fragmentação da placa motora indicou que o S apresentou menor índice de fragmentação ($0,07 \pm 0,20$), seguido pelos grupos A ($0,09 \pm 0,25$), AEC e AES (ambos com $0,09 \pm 0,20$), enquanto que os grupos ES ($0,20 \pm 0,29$) e EC

($0,23 \pm 0,34$) revelaram os maiores índices de fragmentação; contudo, todas as comparações não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 10IX).

Figura 10 – Imunomarcacão e morfometria da placa motora dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Imunomarcacão da placa motora (**coluna à esquerda**) revela as morfologias distintas observadas nos grupos experimentais, no qual no grupo **S** apresentou morfologia circular, o grupo **EC** mostrou clusters dispersos, **ES** revelou tamanho menor com formato elipsoide, os grupos **A** e **AEC** mostraram pequeno tamanho com clusters globulares evidentes, enquanto o **AES** apresentou maior região de imunomarcacão e clusters globulares delimitados. Barras: 5 µm. Os gráficos I, II, III, IV, V,

VI e VIII foram expressos em média \pm desvio padrão. Os gráficos VII e IX foram expressos em *heat map*. **I.** Diâmetro da placa motora (μm) revelou aumento nos grupos EC e AES; **II.** Perímetro dos AchR (μm) apresentou aumento nos grupos EC e AES; **III.** Perímetro da placa motora (μm) mostrou aumento, com destaque, para o AES; **IV.** Área dos AchR (μm^2) demonstrou aumento no grupo AES; **V.** Área da placa motora (μm^2) apresentou aumento, com destaque, para o AES; **VI.** Compacidade (%) da placa motora mostrou aumento, com destaque, para o AEC; **VII.** Número de *clusters* de AchR (un) aumentou, com destaque, nos grupos EC e ES; **VIII.** Área média dos *clusters* de AchR (μm^2) apresentou aumento para o grupo AES; **IX.** Índice de fragmentação da placa motora demonstrou aumento, com destaque, nos grupos EC e ES. Grupos: **S:** Sedentário; **EC:** Escada vertical sem carga extra; **ES:** Escada vertical com sobrecarga. **A:** Alongado; **AEC:** Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES:** Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para as variáveis analisadas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.3 Histoquímica miofibrilar – ATPase

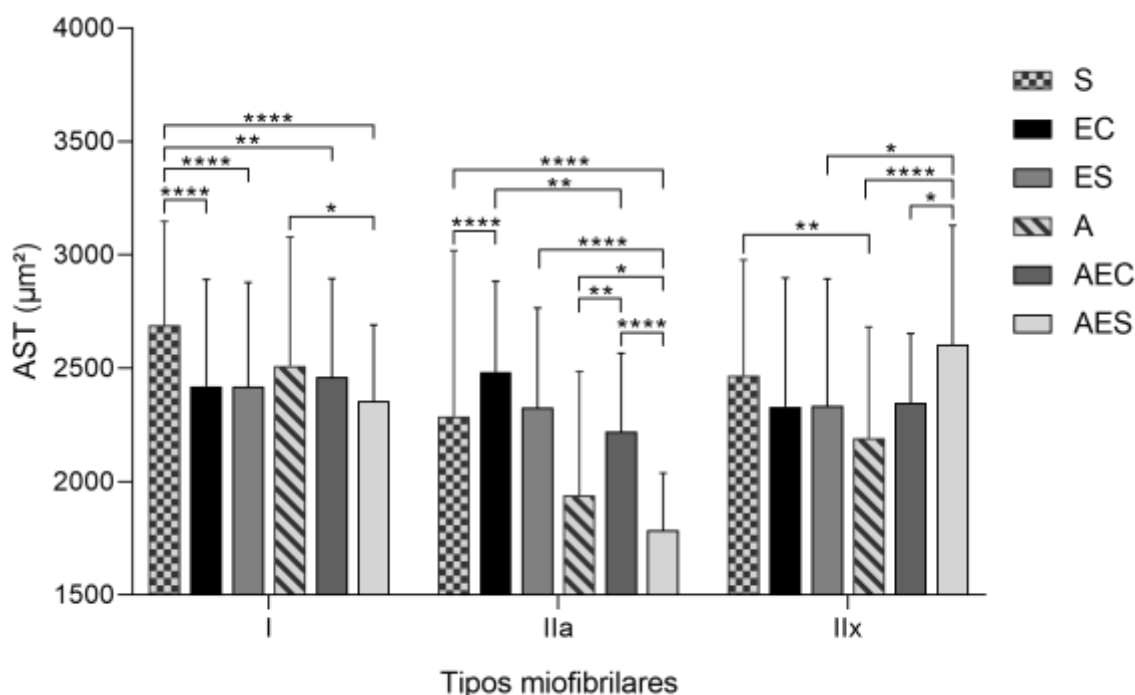
4.3.1 Área de secção transversa (AST) miofibrilar

Foi realizada a mensuração da área de secção transversa (AST) das miofibras Tipo I, IIa e IIx (Figura 11). Em relação ao Tipo I, os grupos EC ($p < 0,0001$), ES ($p < 0,0001$), A ($p > 0,05$), AEC ($p < 0,01$) e AES ($p < 0,0001$) apresentaram valor menor do que S. O grupo EC mostrou valor maior do que ES ($p > 0,05$) e menor do que AEC ($p > 0,05$); enquanto que o grupo ES revelou-se maior do que AES ($p > 0,05$). O grupo A demonstrou valor maior do que AEC ($p > 0,05$) e AES ($p < 0,05$); enquanto o AES foi menor do que AEC ($p > 0,05$).

Em relação ao Tipo IIa, os grupos EC ($p < 0,0001$) e ES ($p > 0,05$) apresentaram valores maiores do S. Por outro lado, os valores dos grupos A ($p > 0,05$), AEC ($p > 0,05$) e AES ($p < 0,0001$) foram menores do S. O grupo EC foi maior do ES ($p > 0,05$) e AEC ($p < 0,01$), enquanto o ES foi maior do que AES ($p < 0,0001$). O grupo A revelou valor menor que AEC ($p < 0,01$) e maior do que AES ($p < 0,05$); enquanto que o AES foi menor do que AEC ($p < 0,0001$).

Para as miofibras do Tipo IIx, houve redução nos grupos EC ($p > 0,05$), ES ($p > 0,05$), A ($p < 0,01$) e AEC ($p > 0,05$), e aumento no AES ($p > 0,05$), quando comparado a S. O grupo EC foi menor do ES e AEC (ambos com $p > 0,05$), enquanto ES foi menor do que AES ($p < 0,05$). O grupo A apresentou menor valor do que AEC ($p > 0,05$) e AES ($p < 0,0001$); além disso, o AES foi maior do AEC ($p < 0,05$).

Figura 11 – Área de secção transversa dos tipos miofibrilares dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legendas: Médias e desvios padrões da área de secção transversa (AST) das miofibras Tipo I, IIa e IIx (μm^2). **Tipo I:** Houve a redução nos grupos EC, ES, AEC e, com destaque, no AES; **Tipo IIa:** O grupo EC apresentou aumento, enquanto os grupos A, AEC e AES mostraram redução. **Tipo IIx:** O grupo A revelou expressiva redução, enquanto o grupo AES apresentou aumento. **S:** Sedentário; **EC:** Escada vertical sem carga extra; **ES:** Escada vertical com sobrecarga; **A:** Alongado; **AEC:** Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES:** Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

4.3.2 Volume numérico miofibrilar (VN)

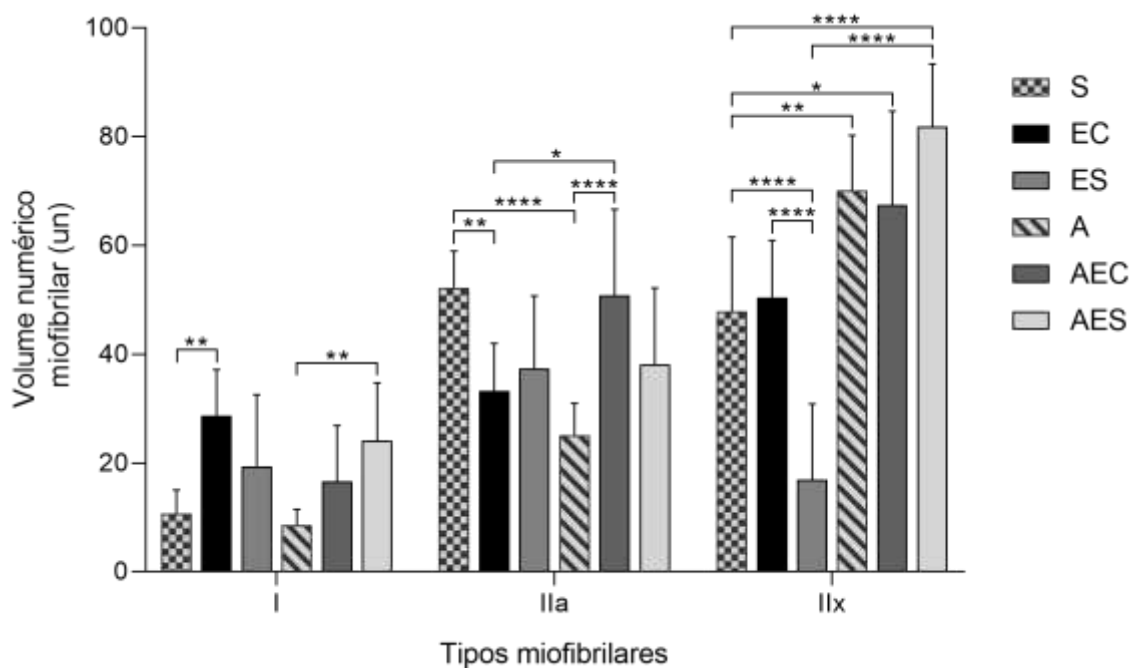
A partir das imagens da histoquímica miofibrilar, foi observado o volume numérico miofibrilar dos Tipos I, IIa e IIx (Figura 12). Em comparação às miofibras Tipo I do grupo S, os grupos EC ($p<0,01$), ES ($p>0,05$), AEC ($p>0,05$) e AES ($p>0,05$) apresentam valores maiores, enquanto houve a redução no grupo A ($p>0,05$). O grupo EC revelou valor maior do que ES e AEC (ambos com $p>0,05$); e o grupo ES foi menor do que AES ($p>0,05$). No grupo A foi observado valor menor do que AEC ($p>0,05$) e AES ($p<0,01$), enquanto o AES foi maior do que AEC ($p>0,05$).

Em relação ao Tipo IIa, nos grupos EC ($p<0,01$), ES ($p>0,05$), A ($p<0,0001$), AEC e AES (ambos com $p>0,05$) houve valores menores do que S. O grupo EC foi

menor do que ES ($p>0,05$) e AEC ($p<0,05$), enquanto o ES foi menor do que AES ($p>0,05$). No grupo A foi observado valor menor do que AEC ($p<0,0001$) e AES ($p>0,05$), além disso, AES foi menor do que AEC ($p>0,05$).

Em comparação ao Tipo IIX do grupo S, houve redução para o ES ($p<0,0001$) e aumento para o EC ($p>0,05$), A ($p<0,01$), AEC ($p<0,05$) e AES ($p<0,0001$). O grupo EC foi maior do que ES ($p<0,0001$) e menor do que AEC ($p>0,05$), enquanto que o grupo ES foi menor do que AES ($p<0,0001$). Além disso, o grupo A foi maior do que AEC ($p>0,05$) e menor do que AES ($p>0,05$); e o AES foi maior do que AEC ($p>0,05$).

Figura 12 – Volume numérico dos tipos miofibrilares dos grupos experimentais.

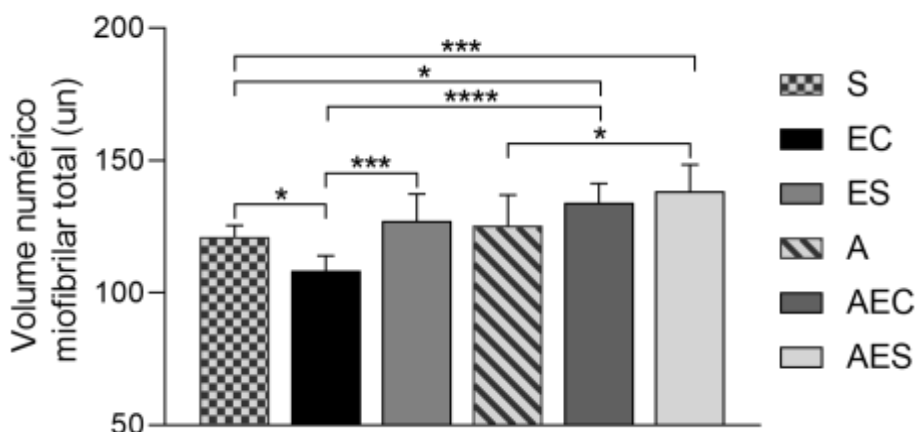


Fonte: Elaborado pela autora. Legendas: Médias e desvios padrões do volume numérico miofibrilar dos Tipos I, Ila e IIX (un). **Tipo I:** Os grupos EC, ES, AEC e AES apresentaram aumento, com destaque para EC e AES; **Tipo Ila:** Houve a redução nos grupos EC, ES, A e AES, com destaque, para os grupos EC e A. **Tipo IIX:** O grupo ES revelou redução, enquanto os grupos A, AEC e AES mostraram aumento. **S:** Sedentário; **EC:** Escada vertical sem carga extra; **ES:** Escada vertical com sobrecarga; **A:** Alongado; **AEC:** Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES:** Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para a miofibrila Tipo I. O teste paramétrico ANOVA One-Way com pós-teste de Bonferroni foi usado as miofibrilas Ila e IIX. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

Foi observado o volume numérico miofibrilar total dos grupos experimentais (Figura 13). Em comparação a S, houve a redução no grupo EC ($p<0,05$) e aumento nos grupos ES ($p>0,05$), A ($p>0,05$), AEC ($p<0,05$) e AES ($p<0,001$). O grupo EC

apresentou valor menor do que ES ($p < 0,001$) e AEC ($p < 0,0001$), enquanto o ES foi menor do que AES ($p > 0,05$). O grupo A revelou valor menor do que AEC ($p > 0,05$) e AES ($p < 0,05$), além disso, o AES foi maior do que AEC ($p > 0,05$).

Figura 13 – Volume numérico miofibrilar total dos grupos experimentais.

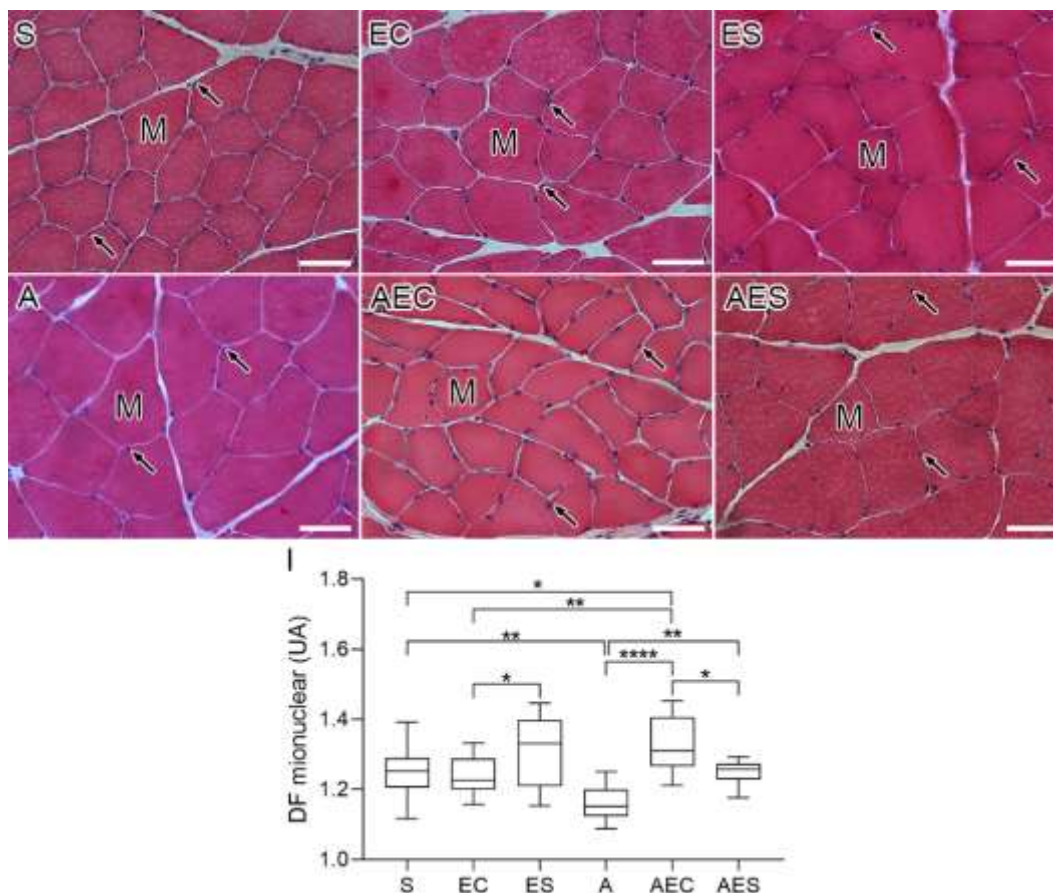


Fonte: Elaborado pela autora. Legendas: Médias e desvios padrões do volume numérico miofibrilar total (un). Houve a redução no grupo EC, enquanto ocorreu aumento nos grupos ES, AEC e AES. **S**: Sedentário; **EC**: Escada vertical sem carga extra; **ES**: Escada vertical com sobrecarga; **A**: Alongado; **AEC**: Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste paramétrico ANOVA One-Way com pós-teste de Bonferroni foi utilizado. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.4 Análise da dimensão fractal

Os mionúcleos e miofibras foram evidenciados pela técnica de coloração de Hematoxilina-Eosina. Foi observado a relação dos mionúcleos dispostos adjacentes às miofibras (Figura 14). A análise da dimensão fractal mionuclear demonstrou que, quando comparado a S, os grupos EC ($p > 0,05$) e A ($p < 0,01$) apresentaram valores menores, os grupos ES ($p > 0,05$) e AEC ($p < 0,05$) foram maiores, e o AES ($p > 0,05$) foi similar. Houve redução do EC em relação a ES ($p < 0,05$) e AEC ($p < 0,01$); enquanto o ES foi maior do AES ($p > 0,05$). Além disso, o grupo A foi menor do que AEC ($p < 0,0001$) e AES ($p < 0,01$), e o AEC foi maior do que AES ($p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14 – Microscopia de luz dos mionúcleos e dimensão fractal mionuclear dos grupos experimentais.

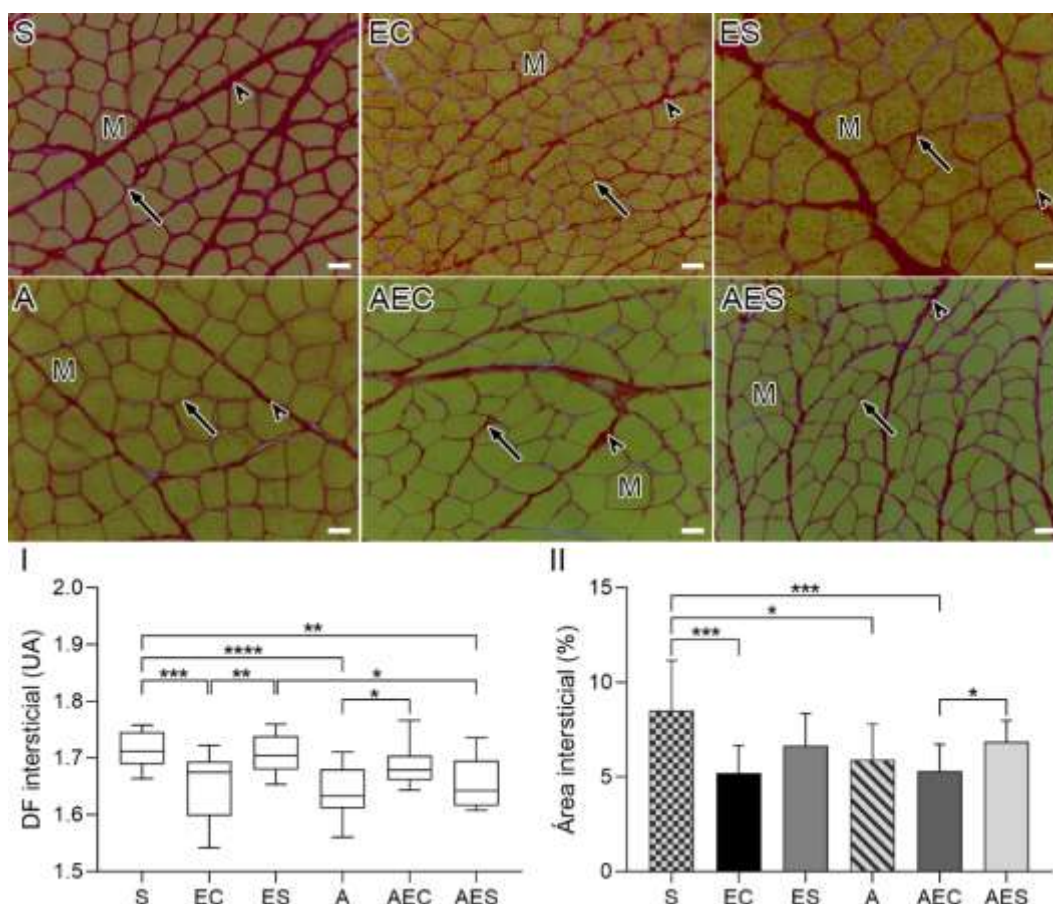


Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Mionúcleos corados com a técnica de Hematoxilina-Eosina e dimensão fractal mionuclear. Os mionúcleos (**setas**) estão dispostos adjacentes às miofibras (**M**). Barras: 50 μ m. Grupos: **S**: Sedentário; **EC**: Escada vertical sem carga extra; **ES**: Escada vertical com sobrecarga; **A**: Alongado; **AEC**: Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. **I**. *Box-plot* da dimensão fractal mionuclear (UA), com destaque para a redução observada no grupo A e para o aumento nos grupos ES e AEC. Valor expresso em unidade arbitrária (UA). O teste paramétrico ANOVA One-Way com pós-teste de Bonferroni foi utilizado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

O interstício do ventre muscular foi evidenciado pela técnica de coloração de Picro-sírius red. Foi observado a relação do interstício, composto por endomísio e perimísio, circundante às miofibras (Figura 15). A análise da dimensão fractal (DF) revelou a redução nos grupos EC ($p < 0,001$), ES ($p > 0,05$), A ($p < 0,0001$), AEC ($p > 0,05$) e AES ($p < 0,01$), em comparação a S. O grupo EC foi menor do que ES ($p < 0,01$) e AEC ($p > 0,05$), enquanto que o ES foi maior do que AES ($p < 0,05$). Foi observado a redução no grupo A em comparação a AEC ($p < 0,05$) e AES ($p > 0,05$); além disso, o AEC foi maior do que AES ($p > 0,05$) (Figura 15I).

Houve a redução da área intersticial nos grupos EC ($p < 0,001$), ES ($p > 0,05$), A ($p < 0,05$), AEC ($p < 0,001$) e AES ($p > 0,05$), quando comparados a S. O grupo EC foi menor do que ES e AEC (ambos com $p > 0,05$), e o ES foi menor do que AES ($p > 0,05$). Além disso, o grupo A foi maior do que AEC e menor que AES (ambos com $p > 0,05$), e o AES foi maior do que AEC ($p < 0,05$) (Figura 15II).

Figura 15 – Microscopia de luz do interstício, dimensão fractal intersticial e área intersticial dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Interstício corado com a técnica de Picro-sírius red, dimensão fractal intersticial e área intersticial. É possível observar a disposição do endomísio (**setas**) e perimísio (**cabeça de seta**) circundante às miofibras (**M**). Barras: 40 μ m. Grupos: **S**: Sedentário; **EC**: Escada vertical sem carga extra; **ES**: Escada vertical com sobrecarga; **A**: Alongado; **AEC**: Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. I. *Box-plot* da dimensão fractal intersticial (UA), a qual, com destaque, houve a redução para os grupos EC, A e AES. Valor expresso em unidade arbitrária (UA). II. Média \pm desvio padrão da área intersticial (%), onde ocorre a redução, com destaque, nos grupos EC, A e AEC. Valor expresso em porcentagem (%). O teste paramétrico ANOVA One-Way com pós-teste de Bonferroni foi usado para a dimensão fractal intersticial. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para a área intersticial. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

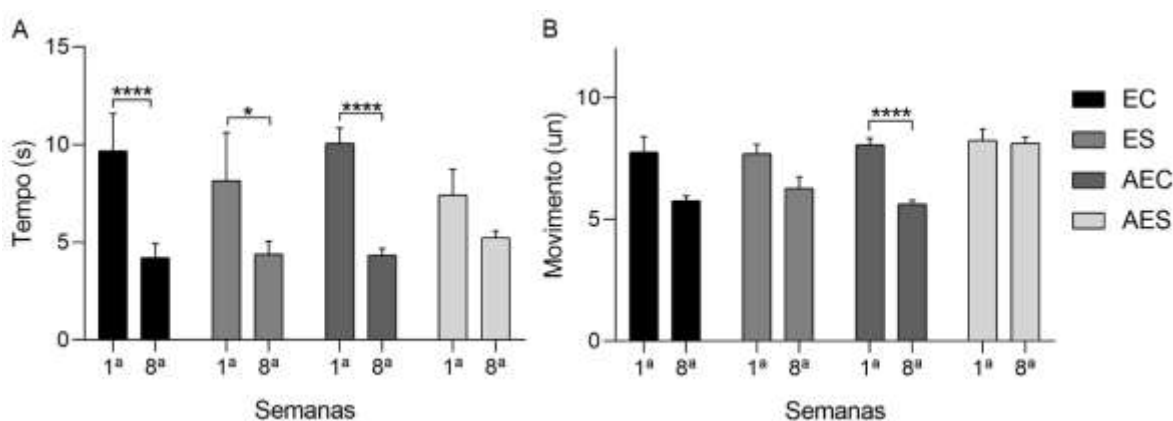
4.5 Análise funcional

Foram realizadas as análises funcionais do tempo, dos movimentos e do trabalho realizado pelos animais na 1ª e 8ª semana de treinamento em escada vertical para os grupos EC, AEC, ES e AES; além disso, o trabalho realizado nos Testes de Carga Máxima Carregada (TCMC) foi analisado para os grupos ES e AES.

O tempo da 1ª semana de treinamento dos grupos apresentou médias entre 7 e 10 segundos para os grupos EC, ES, AEC e AES. Na 8ª semana, os grupos EC, ES, AEC e AES apresentaram menor tempo, entre 4 e 6 segundos, para a realização do protocolo de treinamento. A comparação intragrupo revelou que houve redução para os grupos EC ($p < 0,0001$), ES ($p < 0,05$) e AEC ($p < 0,0001$), enquanto que o AES não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre as semanas analisadas (Figura 16A).

Os movimentos executados pela pata anterior direita dos animais na 1ª semana revelaram o uso entre 7 a 9 movimentos para os grupos EC, ES, AEC e AES. Na 8ª semana, os grupos EC, ES e AEC apresentaram menor número de movimentos, entre 5 a 7 movimentos, enquanto que o AES permaneceu com média de oito movimentos. A análise intragrupo demonstrou que o grupo AEC apresentou redução ($p < 0,0001$); no entanto, o EC, ES e AES não apresentaram diferença ($p > 0,05$) (Figura 16B).

Figura 16 – Média e desvio padrão de tempo e movimento da 1ª e 8ª semana de treinamento dos grupos experimentais.

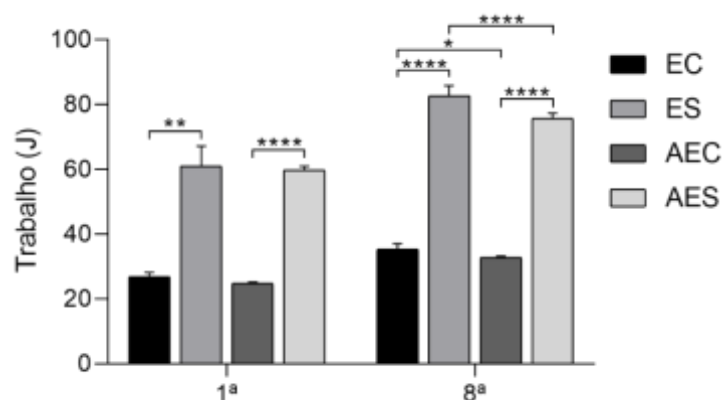


Fonte: Elaborado pela autora. Legendas: Médias e desvios padrões do tempo e movimento realizado pelos animais na 1ª e 8ª semana de treinamento. **A.** Tempo (segundos), no qual ocorre a redução, com destaque, nos grupos EC, ES e AEC; **B.** Movimento da pata direita

(un), onde ocorre a redução significativa no grupo AEC. **EC**: Escada vertical sem carga extra; **ES**: Escada vertical com sobrecarga; **AEC**: Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn foi utilizado para o tempo e movimento. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

As médias do trabalho realizado evidenciaram que os grupos ES e AES apresentaram trabalho inicial entre 59J e 61J, enquanto que no EC e AEC, foi de 24J a 27J. Na 8ª semana, os grupos ES e AES revelaram trabalho entre 75J e 83J; ainda, os valores de EC e AEC foi de 32J a 36J. Na 1ª semana o ES realizou trabalho 127,69% maior do que EC ($p < 0,01$), enquanto o trabalho do AES foi 141,51% maior do que o AEC ($p < 0,0001$). Ainda, a comparação entre EC-AEC e ES-AES, não apresentou diferença ($p > 0,05$). Na 8ª semana, o ES (133,85%) e AES (131,45%) revelaram valores de trabalhos maiores do que EC ($p < 0,0001$) e AEC ($p < 0,0001$), respectivamente; enquanto que EC apresentou valor 8,12% ($p < 0,05$) maior do que AEC, e em ES foi 9,24% ($p < 0,0001$) maior do que AES (Figura 17).

Figura 17 – Média de trabalho da 1ª e 8ª semana de treinamento dos grupos experimentais.

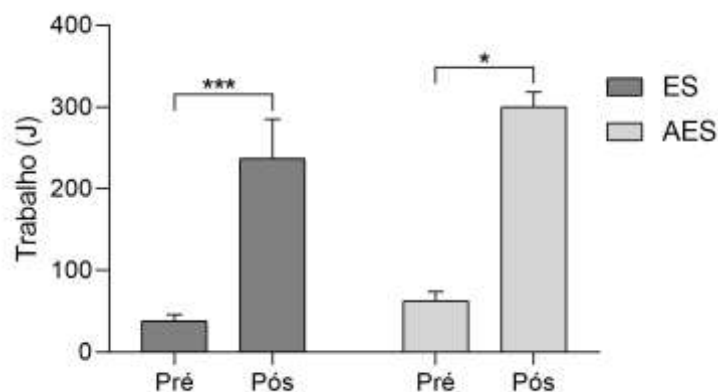


Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Médias e desvios padrões de trabalho realizado na 1ª e 8ª semana, expresso em Joules (J), no qual é evidenciado a diferença de trabalho realizado na 1ª e 8ª semana, principalmente, entre os grupos de escada vertical sem carga extra (EC e AEC) e os grupos de escada vertical com sobrecarga (ES e AES). **EC**: Escada vertical sem carga extra; **ES**: Escada vertical com sobrecarga; **AEC**: Alongado e Escada vertical sem carga extra; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para a análise do trabalho da 1ª semana. O teste paramétrico ANOVA One-way com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para os dados da 8ª semana. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

No teste pré do TCMC, os grupos ES e AES demonstraram médias de trabalho de 38J e 62J, respectivamente, enquanto que no teste pós, os grupos realizaram

trabalho de 236J para ES e 299J para o AES. A comparação intragrupo demonstrou que o ES apresentou aumento de trabalho de 519,68% ($p < 0,001$), enquanto que o AES revelou aumento de 378,45% ($p < 0,05$) (Figura 18).

Figura 18 – Média e desvio padrão de trabalho no teste de carga máxima carregada.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Médias e desvios padrões de trabalho realizado no teste Pré e Pós do teste de carga máxima carregada (TCMC), expresso em Joules (J). É possível observar que, em ambos os grupos, ocorre o aumento do TCMC após o período de treinamento experimental. **ES**: Escada vertical com sobrecarga; **AES**: Alongado e Escada vertical com sobrecarga. O teste não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn foi utilizado para a análise do trabalho da 1ª e 8ª semana. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou as aferições das massas corporais e musculares, a morfologia e as dimensões da placa motora, o diâmetro e densidade miofibrilares, as análises de complexidade dos componentes musculares e as análises funcionais de tempo, movimento e trabalho dos grupos experimentais de modalidades de treinamento em escada vertical, do alongamento estático e do alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical.

Os grupos de escada vertical (EC e ES), de alongamento estático (A) e, principalmente, de alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical (AEC e AES) apresentaram menor massa corporal após oito semanas de treinamento. De acordo com Shen *et al.* (2021), a redução da massa corporal após os treinamentos resistido e aeróbico estava relacionada com o aumento do consumo de energia, devido a alterações endócrinas e metabólicas, função das mioquinas e pela intensidade do exercício.

Aamann *et al.* (2019) descrevem que a relação da massa muscular e da massa corporal é uma forma de normalização destes dados. Dessa forma, verificamos que houve aumento nos grupos de escada vertical sem carga extra (EC) e de alongamento estático (A), enquanto que o alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical (AEC e AES) apresentaram redução na relação da massa muscular e da massa corporal. Possivelmente, os resultados nas massas musculares observadas nos grupos A e EC ocorreram devido à síntese proteica desencadeada pelo alongamento estático (GOLDSPINK, 1999), e pela repressão do regulador negativo da massa muscular (miostatina), através da expressão de PGC-1 α 4 induzida pelo treinamento resistido (RUAS *et al.*, 2012).

Segundo Peviani *et al.* (2007), o alongamento estático promoveu a expressão de mRNA de miostatina após a execução do alongamento e no decorrer de sete dias com execução diária. Diante disso, nossos dados sugerem que, possivelmente, o alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical (AEC e AES) desencadeiam vias de ação intracelular que atuam na regulação negativa da massa muscular.

De acordo com Rocha *et al.* (2020a), a placa motora do músculo gastrocnêmio demonstrou *clusters* de AchR ramificados após treinamento de

natação com ratos *Wistar* previamente imobilizados. Este resultado difere do encontrado no presente estudo e revela que a morfologia da placa motora é influenciada pelo estímulo externo.

A partir das imagens de imunofluorescência foi possível analisar as dimensões da placa motora. O primeiro parâmetro analisado foi o diâmetro da placa motora que demonstrou aumento nos grupos experimentais, com destaque para EC e AES. De acordo com Boehm *et al.* (2020), a placa motora apresenta estabilidade do seu diâmetro em humanos em diferentes graus de desenvolvimento da caquexia do câncer. No entanto, os resultados do presente estudo revelam que a plasticidade dessa característica pode ser modulada pelo treinamento físico.

Os grupos de escada vertical (EC e ES) revelaram aumento da placa motora, com destaque para EC; embora o grupo ES apresentou redução da área dos AchR. Segundo Krause Neto *et al.* (2015), a partir de um estudo de meta análise sobre os efeitos do treinamento nos componentes da JNM, o treinamento com sobrecarga induz ao aumento da área total das placas motoras das fibras rápidas. Diante disso, verificamos que a escada vertical sem carga extra provocou aumento significativo da dimensão da placa motora em comparação à escada vertical com sobrecarga.

De acordo com Yamashita, Ishii e Oota (1992), o alongamento promoveu aumento da condução dos íons de Ca^{2+} no nervo periférico terminal do músculo sóleo e, dessa forma, facilitou a atividade neuromuscular. Nossos dados mostram que o alongamento estático diminui a dimensão da placa motora, com possível melhora na função neuromuscular, enquanto que os grupos de alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical resultaram em aumento da placa motora, principalmente o AES, o que demonstra o remodelamento proveniente da associação desses estímulos.

Deschenes *et al.* (2000) descrevem que a dispersão (compacidade) é a porcentagem da ocupação dos AchR dentro da placa motora; e estabelecem que a diminuição da fadiga muscular em contração de alta intensidade poderia ser resultado benéfico desse remodelamento da JNM. Dessa forma, verificamos que o alongamento estático e de associação prévia à escada vertical sem carga extra (A e AEC) promovem o aumento na ocupação dos AchR, com possível redução da fadiga muscular. Segundo Shembel *et al.* (2020), a intensidade do treinamento promoveu a redução da compacidade da placa motora. No presente estudo, o treinamento em escada vertical (EC e ES) e o alongamento estático associado

previamente a escada vertical com sobrecarga se configuraram como estímulos com intensidade para provocar a redução da compacidade.

Jones *et al.* (2017a) descreveram que a quantidade de *clusters* de AchR tem diferenças interespecíficas. Observamos que os estímulos decorrentes de treinamento físico, principalmente a escada vertical (EC e ES) e o alongamento estático (A), foram capazes de modular esse parâmetro. Além disso, Mech *et al.* (2020) relatam que a área média dos *clusters* de AchR não apresenta diferenças significantes entre músculos. No presente estudo, verificamos que os treinamentos modularam a área média, principalmente no alongamento estático associado previamente à escada vertical com sobrecarga.

De acordo com Jones *et al.* (2017b), a partir do cálculo proposto, é possível verificar o nível de fragmentação, de placa motora sólida à placa motora altamente fragmentada. Por conseguinte, o índice de fragmentação revelou que os grupos de escada vertical (ES e EC) apresentaram os maiores índices de fragmentação, enquanto que o grupo de alongamento estático e de alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical (AEC e AES) apresentaram menor índice de fragmentação.

A fragmentação dos AchR foi relacionada com a regeneração e degeneração da fibra muscular em modelos experimentais de envelhecimento (LI; LEE; THOMPSON, 2011) e de distrofia muscular de Duchenne (HADDIX *et al.*, 2018). Dessa forma, os resultados do presente estudo mostram que o treinamento nas modalidades de escada vertical (EC e ES) resultam em fragmentação da placa motora, e possivelmente, no ciclo de regeneração e degeneração da fibra muscular, enquanto que o alongamento estático (grupo A) não desencadeia esse ciclo. Ainda, a associação do alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical (AEC e AES) reduzem a fragmentação. Esses resultados sugerem que o alongamento possui um efeito protetor na placa motora.

A escada vertical sem carga extra, o alongamento estático e ambos os treinamentos de alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical (EC, A, AEC e AES) apresentaram predominância de miofibras Tipo IIx, enquanto a escada vertical com sobrecarga (ES) revelou predominância de Tipo IIa. De acordo com Qaisar, Bhaskaran e Van Remmen (2016), as miofibras Tipo IIa apresentam metabolismo intermediário (glicolítico/oxidativo) e o Tipo IIx mostram metabolismo glicolítico. Dessa forma, verificamos que os grupos experimentais,

exceto ES, se configuraram como estímulos para a conversão miofibrilar para o Tipo IIx.

Por outro lado, a escada vertical com sobrecarga, alongamento estático e ambos os treinamentos de alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical (ES, A, AEC e AES) mostraram maior volume numérico miofibrilar total, enquanto que a escada vertical sem carga extra (EC) revelou menor volume total. Segundo Jorgenson, Phillips e Hornberger (2020), o aumento longitudinal das miofibras resulta no aumento da quantidade de miofibras observadas na análise da secção transversa muscular, ocasionado pelas miofibras com terminações intramusculares.

Em um estudo realizado por Masschelein *et al.* (2020), a quantidade de células satélites que se fusionaram à extremidade das miofibras pré-existentes mostrou relação com a carga utilizada no treinamento físico. Dessa forma, verificamos que o treinamento em escada vertical sem carga extra (EC) não promoveu a fusão intensa de células satélites, enquanto que a escada vertical com sobrecarga (ES) desencadeou esse efeito. Por outro lado, o alongamento estático promoveu o aumento no comprimento da fibra muscular do músculo gastrocnêmio, conforme descrito por Peixinho *et al.* (2014). Considerando isso, os resultados do presente estudo sugerem que o alongamento estático promoveu o aumento do comprimento da fibra muscular, principalmente, em ambos os grupos de alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical.

O treinamento resistido promoveu o aumento do diâmetro das miofibras Tipo II, com conseqüente aumento de força muscular, conforme descrito por Douglas *et al.* (2017). Diante disso, verificamos que os treinamentos de escada vertical propostos (EC e ES) desencadearam alteração morfológicas nas miofibras Tipo IIa, principalmente, no grupo que realizou o treinamento em escada vertical sem carga extra.

Além disso, nos grupos que realizaram o treinamento em escada vertical (EC, ES, AEC e AES) ocorreu o aumento da quantidade miofibrilar e redução do diâmetro das miofibras Tipo I. As miofibras Tipo I promovem maior resistência à fadiga muscular, conforme descrito por Farenia *et al.* (2019) e, de acordo com Deschenes *et al.* (2020), a redução da secção transversa das miofibras Tipo I auxilia o transporte de oxigênio dos capilares para o meio intracelular. Dessa forma, o treinamento em escada vertical promoveu a melhora da capacidade oxidativa do

músculo gastrocnêmio, principalmente nos grupos de escada vertical sem carga extra (EC) e de alongamento estático associado previamente à escada vertical com sobrecarga (AES).

Segundo Zotz *et al.* (2016), o alongamento estático promoveu a redução da AST, e sugerem que esse efeito foi ocasionado pelas diferentes vias de ativação de crescimento transversal e longitudinal das miofibras. Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que o alongamento estático não promoveu a via de crescimento transversal. Apesar deste efeito, alongamento estático associado previamente à escada vertical sem carga extra (AEC) revelou aumento da capacidade oxidativa e alta velocidade de contração (Tipo IIa), enquanto a modalidade da escada vertical com sobrecarga (AES) demonstrou aumento do metabolismo glicolítico e alta velocidade de contração (Tipo IIx), conforme descrito por Qaisar, Bhaskaran e Van Remmen (2016).

De acordo com Kim *et al.* (2020), a dimensão fractal (DF) é uma ferramenta de análise da complexidade geométrica utilizada para objetos que não seguem a relação da matemática Euclideana. Além disso, Korolj, Wu e Radisic (2019) reportaram que a DF é uma forma de mensurar o estado de saúde dos tecidos. Dessa forma, nós verificamos que o treinamento físico foi capaz de alterar essa característica mionuclear, visto que a escada vertical com sobrecarga e o alongamento estático associado previamente à escada vertical sem carga extra (ES e AEC) conseguiram promover maior complexidade de organização mionuclear, enquanto que o alongamento estático (grupo A) desencadeou menor complexidade de organização mionuclear. Além disso, observamos que a DF intersticial foi influenciada pelo treinamento físico, ao se considerar que houve menor complexidade de organização intersticial na escada vertical sem carga extra, no alongamento estático e no alongamento estático associado previamente à escada vertical com sobrecarga (grupos EC, A e AES).

De acordo com Guzzoni *et al.* (2018), o treinamento em escada vertical com sobrecarga por 12 semanas reduziu o tecido conjuntivo intramuscular. Dessa forma, verificamos que a escada vertical, principalmente quando realizada sem carga extra (grupos EC), foi uma modalidade de treinamento capaz de modular a área de interstício. Peviani *et al.* (2018) reportaram que o alongamento por 10 e 15 dias reduziu o depósito de colágeno no músculo sóleo. No presente estudo, observamos que oito semanas de alongamento estático (grupo A) e da sua associação prévia às

modalidades de escada vertical (grupos AEC e AES) também foi capaz de reduzir a área de colágeno no músculo gastrocnêmio.

A análise do tempo dos grupos revelou que, ao final do treinamento, a média de tempo realizado pelos animais por escalada permaneceu entre quatro e cinco segundos (grupos EC, ES, AEC e AES). De acordo Krause Neto *et al.* (2016), a redução do tempo utilizado na escalada durante o período de adaptação ao equipamento pode estar relacionada ao processo de aprendizagem do animal. Portanto, as reduções do tempo obtido entre os grupos experimentais sugerem o processo de aprendizagem pelos animais analisados.

Sousa Neto *et al.* (2017) descreveram que a escalada de um equipamento de 110 cm de altura, por ratos *Wistar*, demanda de oito a doze movimentos. Contudo, verificamos que apenas o grupo de alongamento estático associado previamente à escada vertical com sobrecarga (AES) apresentou esse padrão, enquanto que os demais grupos (EC, ES e AEC) revelaram menor quantidade de movimentos necessários para a realização da escalada, o que demonstra a variação desse parâmetro de acordo com o protocolo físico utilizado.

Conforme descrito por Dror *et al.* (2018), o trabalho realizado pelos grupos são uma ferramenta para quantificar o volume de treinamento dos protocolos experimentais. Os trabalhos obtidos revelaram a diferença de volume de treinamento, visto que os valores dos grupos submetidos a escada vertical com sobrecarga foram maiores do que a escada vertical sem carga extra, mesmo nos grupos associados ao alongamento estático prévio (AEC e AES).

O treinamento em escada vertical é uma ferramenta capaz de aumentar a carga máxima carregada em ratos *Wistar* jovens (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; PADILHA *et al.*, 2019). Verificamos que os grupos que realizaram a escada vertical com sobrecarga (ES e AES) apresentaram aumento na capacidade de carga após oito semanas de treinamento, contudo, o aumento foi mais expressivo no grupo ES. Segundo Chaabene *et al.* (2019), o tempo de duração do alongamento estático pode apresentar prejuízo à força muscular ou ser uma etapa não prejudicial à performance do movimento. Diante disso, os resultados obtidos no presente estudo sugerem o alongamento estático associado previamente à escada vertical com sobrecarga ocasionou prejuízo à capacidade de carga.

O alongamento estático associado previamente às modalidades de escada vertical demonstraram efeitos benéficos na estrutura da placa motora e nas

miofibras, com repercussões na organização dos mionúcleos e interstício do ventre muscular e na resposta funcional. Diante disso, espera-se que este estudo possa orientar futuras pesquisas em humanos, com o intuito de proporcionar o treinamento físico adequado para as necessidades do indivíduo.

6 CONCLUSÃO

- O treinamento em escada sem carga extra promove a manutenção das massas corporal e muscular, remodela a placa motora, com aumento acentuado das dimensões, reduz a área ocupada pelos AchR e resulta em região fragmentada. Promove a conversão miofibrilar para o Tipo IIx e aumenta o diâmetro das miofibras Tipo IIa, além de ocasionar maior complexidade de organização mionuclear, menor complexidade de organização intersticial e reduzir a área de interstício.
- O treinamento em escada com sobrecarga atua na manutenção das massas corporal e muscular, promove a reorganização da placa motora, através do aumento das dimensões e redução da área ocupada pelos AchR, e maior fragmentação da placa motora. No ventre muscular, estimula o aumento do diâmetro e densidade das miofibras Tipo IIa, maior complexidade de organização mionuclear, manutenção da complexidade intersticial e reduz a área de interstício. Além disso, propicia o aumento acentuado na capacidade de carregar sobrecarga.
- O alongamento estático promove a manutenção das massas corporal e muscular, reduz a placa motora, com estrutura sólida (menos fragmentada), e ocasiona o aumento da ocupação dos AchR. Além disso, desencadeia a redução dos diâmetros miofibrilares e a predominância do Tipo IIx, resulta em menores complexidades de organização mionuclear e intersticial, e reduz a área de interstício.
- O alongamento estático associado previamente à escada vertical sem carga extra acarreta na redução das massas corporal e muscular, provoca o aumento da placa motora, com estrutura sólida (menos fragmentada) e proporciona o aumento da ocupação dos AchR. Promove a redução dos tipos miofibrilares, a predominância do Tipo IIx e aumento da quantidade total de miofibras. Além disso, ocasiona maior complexidade de organização mionuclear, manutenção da complexidade intersticial e reduz a área de interstício.

- O alongamento estático associado previamente à escada vertical com sobrecarga estimula a manutenção da massa corporal e redução da massa muscular, promove o aumento da placa motora, com estrutura sólida (menos fragmentada), com redução da ocupação dos AchR. No ventre muscular, ocorre a redução do diâmetro das miofibras do Tipo I e IIa, propicia o aumento do diâmetro e conversão miofibrilar para o Tipo IIx, e maior quantidade total de miofibras. Ocasiona maior complexidade de organização mionuclear, estimula a menor complexidade intersticial e reduz a área do interstício. Além disso, propicia o aumento na capacidade de carregar sobrecarga.

REFERÊNCIAS

- AAMANN, L.; OCHOA-SANCHEZ, R.; OLIVEIRA, M.; TREMBLAY, M.; BÉMEUR, C.; DAM, G.; VILSTRUP, H.; AAGAARD, N. K.; ROSE, C. F. Progressive resistance training prevents loss of muscle mass and strength in bile duct-ligated rats. **Liver International**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 676–683, 2019. DOI: 10.1111/liv.13997.
- ANTONIO-SANTOS, J.; FERREIRA, D. J. S.; COSTA, G. L. G.; MATOS, R. J. B.; TOSCANO, A. E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; LEANDRO, C. G. Resistance training alters the proportion of skeletal muscle fibers but not brain neurotrophic factors in young adult rats. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 3531–3538, 2016. DOI: 10.1519/1533-4287(2004)18<625.
- BEHM, D. G.; BLAZEVIČH, A. J.; KAY, A. D.; MCHUGH, M. Acute effects of muscle stretching on physical performance, range of motion, and injury incidence in healthy active individuals: A systematic review. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 1–11, 2015. DOI: 10.1139/apnm-2015-0235.
- BEHM, D. G.; KAY, A. D.; TRAJANO, G. S.; BLAZEVIČH, A. J. Mechanisms underlying performance impairments following prolonged static stretching without a comprehensive warm-up. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 67–94, 2021. DOI: 10.1007/s00421-020-04538-8.
- BERTOLINI, G. R. F.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Análise longitudinal de músculos sóleos, de ratos, submetidos a alongamento passivo com uso prévio de ultrassom terapêutico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 115–118, 2009. DOI: 10.1590/s1517-86922009000200006.
- BHUTDA, S.; SURVE, M.; ANIL, A.; KAMATH, K.; SINGH, N.; MODI, D.; BANERJEE, A. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. **Bio-Protocol**, [s. l.], v. 7, n. 21, p. 1–10, 2017. DOI: 10.21769/bioprotoc.2592.
- BOEHM, I.; MILLER, J.; WISHART, T.; WIGMORE, S. J.; SKIPWORTH, R. J. E.; JONES, R. A.; GILLINGWATER, T. H. Neuromuscular junctions are stable in patients with cancer cachexia. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 130, n. 3, p. 1461–1465, 2020. DOI: 10.1172/JCI128411.
- BURDEN, S. J.; HUIJBERS, M. G.; REMEDIO, L. Fundamental molecules and mechanisms for forming and maintaining neuromuscular synapses. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 1–19, 2018. DOI: 10.3390/ijms19020490.
- BUTLER, E. E.; DOMINY, N. J. Architecture and functional ecology of the human gastrocnemius muscle-tendon unit. **Journal of Anatomy**, [s. l.], v. 228, n. 4, p. 561–568, 2016. DOI: 10.1111/joa.12432.
- CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2014,

n. 6, p. 655–658, 2014. DOI: 10.1101/pdb.prot073411.

CARDOZO, C. P.; GRAHAM, Z. A. Muscle–bone interactions: Movement in the field of mechano–humoral coupling of muscle and bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1402, n. 1, p. 10–17, 2017. DOI: 10.1111/nyas.13411.

CAZEAU, C.; STIGLITZ, Y. Effects of gastrocnemius tightness on forefoot during gait. **Foot and Ankle Clinics**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 649–657, 2014. DOI: 10.1016/j.fcl.2014.08.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcl.2014.08.003>.

CHAABENE, H.; BEHM, D. G.; NEGRA, Y.; GRANACHER, U. Acute Effects of Static Stretching on Muscle Strength and Power : An Attempt to Clarify Previous Caveats. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 10, n. 1468, p. 1–8, 2019. DOI: 10.3389/fphys.2019.01468.

CURY, S. S.; FREIRE, P. P.; MARTINUCCI, B.; DOS SANTOS, V. C.; DE OLIVEIRA, G.; FERRETTI, R.; DAL-PAI-SILVA, M.; PACAGNELLI, F. L.; DELELLA, F. K.; CARVALHO, R. F. Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 503, n. 1, p. 109–115, 2018. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.189.

DAYTON, P. Anatomic, Vascular, and Mechanical Overview of the Achilles Tendon. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 107–113, 2017. DOI: 10.1016/j.cpm.2016.10.002.

DESCHENES, M. R.; KRESSIN, K. A.; GARRATT, R. N.; LEATHRUM, C. M.; SHAFFREY, E. C. Effects of exercise training on neuromuscular junction morphology and pre- to post-synaptic coupling in young and aged rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 316, p. 167–177, 2016. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.004.

DESCHENES, M. R.; JUDELSON, D. A.; KRAEMER, W. J.; MESKAITIS, V. J.; VOLEK, J. S.; NINDL, B. C.; HARMAN, F. S.; DEEVER, D. R. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1576–1581, 2000. DOI: 10.1002/1097-4598(200010)23:10<1576::AID-MUS15>3.0.CO;2-J.

DESCHENES, M. R.; TUFTS, H. L.; OH, J.; LI, S.; NORONHA, A. L.; ADAN, M. A. Effects of exercise training on neuromuscular junctions and their active zones in young and aged muscles. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 95, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.001.

DOUGLAS, J.; PEARSON, S.; ROSS, A.; MCGUIGAN, M. Chronic Adaptations to Eccentric Training: A Systematic Review. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 917–941, 2017. DOI: 10.1007/s40279-016-0628-4.

DROR, A. D.; VIRK, K.; LEE, K.; GERSTON, A.; PRAKASH, A.; ABBOTT, M. J.;

JAQUE, S. V.; SUMIDA, K. D. Resistance Training Threshold for Elevating Bone Mineral Density in Growing Female Rats. **International Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 382–389, 2018. DOI: 10.1055/s-0043-125447.

DUNCAN, N. D.; WILLIAMS, D. A.; LYNCH, G. S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, [s. l.], v. 77, n. 4, p. 372–378, 1998. DOI: 10.1007/s004210050347.

EGUCHI, T.; TEZUKA, T.; FUKUDOME, T.; WATANABE, Y.; SAGARA, H.; YAMANASHI, Y. Overexpression of Dok-7 in skeletal muscle enhances neuromuscular transmission with structural alterations of neuromuscular junctions: Implications in robustness of neuromuscular transmission. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 523, n. 1, p. 214–219, 2020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.12.011.

FARENIA, R.; LESMANA, R.; UCHIDA, K.; IWASAKI, T.; KOIBUCHI, N.; SHIMOKAWA, N. Changes in biomarker levels and myofiber constitution in rat soleus muscle at different exercise intensities. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 458, n. 1–2, p. 79–87, 2019. DOI: 10.1007/s11010-019-03532-9.

FATURI, F. M.; FRANCO, R. C.; GIGO-BENATO, D.; TURI, A. C.; SILVA-COUTO, M. A.; MESSA, S. P.; RUSSO, T. L. Intermittent stretching induces fibrosis in denervated rat muscle. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 118–126, 2016. DOI: 10.1002/mus.24702.

FERRAIUOLO, L.; DE BONO, J. P.; HEATH, P. R.; HOLDEN, H.; KASHER, P.; CHANNON, K. M.; KIRBY, J.; SHAW, P. J. Transcriptional response of the neuromuscular system to exercise training and potential implications for ALS. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 109, n. 6, p. 1714–1724, 2009. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06080.x.

FERREIRA-JÚNIOR, J. B.; FREITAS, E. D. S.; CHAVES, S. F. N. Exercise: A Protective Measure or an “Open Window” for COVID-19? A Mini Review. **Frontiers in Sports and Active Living**, [s. l.], v. 2, 2020. DOI: 10.3389/fspor.2020.00061.

GIANELO, M. C. S.; POLIZZELO, J. C.; CHESCA, D.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Three days of intermittent stretching after muscle disuse alters the proteins involved in force transmission in muscle fibers in weanling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1590/1414-431X20154118.

GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **Journal of Anatomy**, [s. l.], v. 194, n. 3, p. 323–334, 1999. DOI: 10.1017/S0021878298004439.

GONZALEZ-FREIRE, M.; SEMBA, R. D.; UBAIDA-MOHIEN, C.; FABBRI, E.; SCALZO, P.; HØJLUND, K.; DUFRESNE, C.; LYASHKOV, A.; FERRUCCI, L.. The

Human Skeletal Muscle Proteome Project: a reappraisal of the current literature. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1002/jcsm.12121.

GUZZONI, V.; RIBEIRO, M. B. T.; LOPES, G. N.; MARQUETI, R. C.; DE ANDRADE, R. V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; DURIGAN, J. L. Q. Effect of resistance training on extracellular matrix adaptations in skeletal muscle of older rats. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 9, n. apr, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.00374.

HADDIX, S. G.; LEE, Y. II; KORNEGAY, J. N.; THOMPSON, W. J. Cycles of myofiber degeneration and regeneration lead to remodeling of the neuromuscular junction in two mammalian models of Duchenne muscular dystrophy. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 10, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0205926.

HOTTA, K.; BEHNKE, B. J.; ARJMANDI, B.; GHOSH, P.; CHEN, B.; BROOKS, R.; MARAJ, J. J.; ELAM, M. L.; MAHER, P.; KURIEN, D.; CHURCHILL, A.; SEPULVEDA, J. L.; KABOLOWSKY, M. B.; CHRISTOU, D. D.; MULLER-DELP, J. M. Daily muscle stretching enhances blood flow, endothelial function, capillarity, vascular volume and connectivity in aged skeletal muscle. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 596, n. 10, p. 1903–1917, 2018. DOI: 10.1113/JP275459.

JONES, R. A.; HARRISON, C.; EATON, S. L.; HURTADO, M. L.; GRAHAM, L. C.; ALKHAMMASH, L.; OLADIRAN, O. A.; GALE, A.; LAMONT, D. J.; SIMPSON, H.; SIMMEN, M. W.; SOELLER, C.; WISHART, T. M.; GILLINGWATER, T. H. Cellular and molecular anatomy of the human neuromuscular junction. **Cell Reports**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 2348–2356, 2017. a. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.008.

JONES, R. A.; REICH, C. D.; DISSANAYAKE, K. N.; KRISTMUNSDOTTIR, F.; FINDLATER, G. S.; RIBCHESTER, R. R.; SIMMEN, M. W.; GILLINGWATER, T. H. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction - Supplementary Figures and Tables. **Open Biology**, [s. l.], v. 6, n. 12, 2016. DOI: 10.1098/rsob.160240.

JONES, R. A.; REICH, C. D.; DISSANAYAKE, K. N.; KRISTMUNSDOTTIR, F.; FINDLATER, G. S.; RIBCHESTER, R. R.; SIMMEN, M. W.; GILLINGWATER, T. H. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure - Function relationships at the neuromuscular junction. **Open Biology**, [s. l.], v. 6, n. 160240, p. 1–16, 2017. b. DOI: 10.1098/rsob.160240.

JORGENSON, K. W.; PHILLIPS, S. M.; HORNBERGER, T. A. Identifying the Structural Adaptations that Drive the Mechanical Load-Induced Growth of Skeletal Muscle: A Scoping Review. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2020. DOI: 10.3390/cells9071658.

JOUMAA, V.; BERTRAND, F.; LIU, S.; POSCENTE, S.; HERZOG, W. Does partial titin degradation affect sarcomere length nonuniformities and force in active and passive myofibrils? **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 315, n. 3, p. C310–C318, 2018. DOI: 10.1152/ajpcell.00183.2017.

KARPERIEN, A.; JELINEK, H. F.; LEANDRO, J. J.G.; SOARES, J. V. B.; CESAR JR, R. M.; LUCKIE, A. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. **Clinical Ophthalmology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 109–122, 2008. DOI: 10.2147/oph.s1579.

KARPERIEN, A. L.; JELINEK, H. F. Fractal, multifractal, and lacunarity analysis of microglia in tissue engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. apr, 2015. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00051.

KIKUCHI, N.; NAKAZATO, K. Low-load bench press and push-up induce similar muscle hypertrophy and strength gain. **Journal of Exercise Science and Fitness**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2017. DOI: 10.1016/j.jesf.2017.06.003.

KIM, S.; PARK, Y. W.; PARK, S. H.; AHN, S. S.; CHANG, J. H.; KIM, S. H.; LEE, S. Comparison of Diagnostic Performance of Two-Dimensional and Three-Dimensional Fractal Dimension and Lacunarity Analyses for Predicting the Meningioma Grade. **Brain Tumor Research and Treatment**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 36, 2020. DOI: 10.14791/btrt.2020.8.e3.

KO, C. P.; ROBITAILLE, R. Perisynaptic schwann cells at the neuromuscular synapse: Adaptable, multitasking glial cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1–19, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a020503.

KONRAD, A.; STAFILIDIS, S.; TILP, M. Effects of acute static, ballistic, and PNF stretching exercise on the muscle and tendon tissue properties. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 1070–1080, 2017. DOI: 10.1111/sms.12725.

KOROLJ, A.; WU, H.; RADISIC, M. A healthy dose of chaos : Using fractal frameworks for engineering higher- fidelity biomedical systems. **Biomaterials**, [s. l.], v. 219, n. February, p. 119363, 2019. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119363.

KOTARSKY, C. J.; CHRISTENSEN, B. K.; MILLER, J. S.; HACKNEY, K. J. Effect of progressive calisthenic push-up training on muscle strength and thickness. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 651–659, 2018. DOI: 10.1519/jsc.0000000000002345.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A.; FLANAGAN, S. D.; SHURLEY, J. P.; TODD, J. S.; TODD, T. C. Understanding the Science of Resistance Training: An Evolutionary Perspective. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 12, p. 2415–2435, 2017. DOI: 10.1007/s40279-017-0779-y.

KRAUSE NETO, W.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; DE SOUZA, R. R.; GAMA, E. F. Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: Systematic review of animal experimental studies. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1186/s13104-015-1644-4.

KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Divergent effects of resistance training and anabolic steroid on the postsynaptic region of different skeletal muscles of aged rats. **Experimental Gerontology**, [s.

l.], v. 98, n. July, p. 80–90, 2017. a. DOI: 10.1016/j.exger.2017.08.018.

KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; DE SOUZA, R. R.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Aging induces changes in the somatic nerve and postsynaptic component without any alterations in skeletal muscles morphology and capacity to carry load of wistar rats. **Frontiers in Neuroscience**, [*s. l.*], v. 11, n. DEC, p. 1–17, 2017. b. DOI: 10.3389/fnins.2017.00688.

KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Vertical climbing for rodent resistance training: a discussion about training parameters. **International Journal of Sports Science**, [*s. l.*], v. 6, n. 1A, p. 36–49, 2016. DOI: 10.5923/s.sports.201601.07.

KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; BOCALINI, D.; NUCCI, R. A. B.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Total training load may explain similar strength gains and muscle hypertrophy seen in aged rats submitted to resistance training and anabolic steroids. **Aging Male**, [*s. l.*], v. 21, n. 1, p. 65–76, 2018. DOI: 10.1080/13685538.2017.1365832.

LEITE, T.; DE SOUZA TEIXEIRA, A.; SAAVEDRA, F.; LEITE, R. D.; RHEA, M. R.; SIMÃO, R. Influence of strength and flexibility training, combined or isolated, on strength and flexibility gains. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [*s. l.*], v. 29, n. 4, p. 1083–1088, 2015. DOI: 10.1519/JSC.0000000000000719.

LI, Y.; LEE, Y. I.; THOMPSON, W. J. Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. **Journal of Neuroscience**, [*s. l.*], v. 31, n. 42, p. 14910–14919, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3590-11.2011.

LIN, B. L.; SONG, T.; SADAYAPPAN, S. Myofilaments: Movers and rulers of the sarcomere. **Comprehensive Physiology**, [*s. l.*], v. 7, n. 2, p. 675–692, 2017. DOI: 10.1002/cphy.c160026.

LOURENÇO, Í.; KRAUSE NETO, W.; AMORIM, L. S. P.; ORTIZ, V. M. M.; GERALDÓ, V. L.; FERREIRA, G. H. S.; CAPERUTO, É. C.; GAMA, E. F. Muscle hypertrophy and ladder-based resistance training for rodents : A systematic review and meta-analysis. **Physiological Reports**, [*s. l.*], n. September, p. 1–25, 2020. DOI: 10.14814/phy2.14502.

MARQUES, M. J.; CONCHELLO, J. A.; LICHTMAN, J. W. From plaque to pretzel: Fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. **Journal of Neuroscience**, [*s. l.*], v. 20, n. 10, p. 3663–3675, 2000. DOI: 10.1523/jneurosci.20-10-03663.2000.

MARZETTI, E.; CALVANI, R.; TOSATO, M.; CESARI, M.; DI BARI, M.; CHERUBINI, A.; BROCCATELLI, M.; SAVERA, G.; D'ELIA, M.; PAHOR, M.; BERNABEI, R.; LANDI, F. Physical activity and exercise as countermeasures to physical frailty and sarcopenia. **Aging Clinical and Experimental Research**, [*s. l.*], v. 29, n. 1, p. 35–42, 2017. DOI: 10.1007/s40520-016-0705-4.

MASSCHELEIN, E.; D'HULST, G.; ZVICK, J.; HINTE, L.; SORO-ARNAIZ, I.; GORSKI, T.; VON MEYENN, F.; BAR-NUR, O.; DE BOCK, K. Exercise promotes satellite cell contribution to myofibers in a load-dependent manner. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 34, n. S1, p. 1–1, 2020. DOI: 10.1096/fasebj.2020.34.s1.09179.

MATSUO, S.; IWATA, M.; MIYAZAKI, M.; FUKAYA, T.; YAMANAKA, E.; NAGATA, K.; TSUCHIDA, W.; ASAI, Y.; SUZUKI, S. Changes in Flexibility and Force are not Different after Static Versus Dynamic Stretching. **Sports Medicine International Open**, [s. l.], v. 03, n. 03, p. E89–E95, 2019. DOI: 10.1055/a-1001-1993.

MECH, A. M.; BROWN, A.; SCHIAVO, G.; SLEIGH, J. N. Morphological variability is greater at developing than mature mouse neuromuscular junctions. **Journal of Anatomy**, [s. l.], n. June, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1111/joa.13228.

MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–46, 2020. DOI: 10.1002/wsbm.1462.

NASSARI, S.; DUPREZ, D.; FOURNIER-THIBAUT, C. Non-myogenic contribution to muscle development and homeostasis: The role of connective tissues. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 5, n. mar, p. 1–17, 2017. DOI: 10.3389/fcell.2017.00022.

NEVES, R. V. P.; SOUZA, M. K.; PASSOS, C. S.; BACURAU, R. F. P.; SIMOES, H. G.; PRESTES, J.; BOIM, M. A.; CÂMARA, N. O. S.; FRANCO, M. C. P.; MORAES, M. R. Resistance training in spontaneously hypertensive rats with severe hypertension. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 201–209, 2016. DOI: 10.5935/abc.20160019.

NISHIMUNE, H.; STANFORD, J. A.; MORI, Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 315–324, 2014. DOI: 10.1002/mus.24095.

PACAGNELLI, F. L.; SABELA, A. K. D. A.; MARIANO, T. B.; OZAKI, G. A. T.; CASTOLDI, R. C.; DO CARMO, E. M.; CARVALHO, R. F.; TOMASI, L. C.; OKOSHI, K.; VANDERLEI, L. C. M. Fractal dimension in quantifying experimental-pulmonary-hypertension-induced cardiac dysfunction in rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 33–39, 2016. DOI: 10.5935/abc.20160083.

PADILHA, C. S.; CELLA, P. S.; RIBEIRO, A. S.; VOLTARELLI, F. A.; TESTA, M. T. J.; MARINELLO, P. C.; IAROSZ, K. C.; GUIRRO, P. B.; DEMINICE, R. Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats. **Life Sciences**, [s. l.], v. 238, n. October, p. 116964, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116964.

PEIXINHO, C. C.; MARTINS, N. S. F.; DE OLIVEIRA, L. F.; MACHADO, J. C. Structural adaptations of rat lateral gastrocnemius muscle-tendon complex to a chronic stretching program and their quantification based on ultrasound biomicroscopy and optical microscopic images. **Clinical Biomechanics**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 57–62, 2014. DOI: 10.1016/j.clinbiomech.2013.11.002.

PEVIANI, S. M.; GUZZONI, V.; PINHEIRO-DARDIS, C. M.; SILVA, Y. P. D.; FIORAVANTE, A. C. R.; SAGAWA, A. H.; DELFINO, G. B.; DURIGAN, J. L. Q.; SALVINI, T. F. Regulation of extracellular matrix elements and sarcomerogenesis in response to different periods of passive stretching in the soleus muscle of rats. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27239-x.

PEVIANI, S. M.; GOMES, A. R. S.; MOREIRA, R. F. C.; MORISCOT, A. S.; SALVINI, T. F. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle and Nerve**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 363–370, 2007. DOI: 10.1002/mus.20695.

PIMENTEL NETO, J.; ROCHA, L. C.; BARBOSA, G. K.; JACOB, C. S.; KRAUSE NETO, W.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Myotendinous junction adaptations to ladder-based resistance training: identification of a new telocyte niche. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70971-6.

PURSLOW, P. P. The Structure and Role of Intramuscular Connective Tissue in Muscle Function. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 11, n. 495, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.00495.

QAISAR, R.; BHASKARAN, S.; VAN REMMEN, H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 98, p. 56–67, 2016. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025.

RASSIER, D. E. Sarcomere mechanics in striated muscles: From molecules to sarcomeres to cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 313, n. 2, p. C134–C145, 2017. DOI: 10.1152/ajpcell.00050.2017.

ROCHA, L. C.; JACOB, C. S.; BARBOSA, G. K.; PIMENTEL NETO, J.; KRAUSE NETO, W.; GAMA, E. F.; CIENA, A. P. Remodeling of the skeletal muscle and postsynaptic component after short-term joint immobilization and aquatic training. **Histochemistry and Cell Biology**, [s. l.], n. 2018, p. 1–8, 2020. a. DOI: 10.1007/s00418-020-01910-9.

ROCHA, L. C.; PIMENTEL NETO, J.; DE SANT'ANA, J. S.; JACOB, C. S.; BARBOSA, G. K.; KRAUSE NETO, W.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Repercussions on sarcomeres of the myotendinous junction and the myofibrillar type adaptations in response to different trainings on vertical ladder. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], n. February, p. 1–8, 2020. b. DOI: 10.1002/jemt.23510.

RUAS, J. L.; WHITE, J. P.; RAO, R. R.; KLEINER, S.; BRANNAN, K. T.; HARRISON, B. C.; GREENE, N. P.; WU, J.; ESTALL, J. L.; IRVING, B. A.; LANZA, I. R.; RASBACH, K. A.; OKUTSU, M.; NAIR, K. S.; YAN, Z.; LEINWAND, L. A.; SPIEGELMAN, B. M. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. **Cell**, [s. l.], v. 151, n. 6, p. 1319–1331, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.10.050.

SCHOENFELD, B. J.; CONTRERAS, B.; VIGOTSKY, A. D.; PETERSON, M.

Differential effects of heavy versus moderate loads on measures of strength and hypertrophy in resistance-trained men. **Journal of Sports Science and Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 715–722, 2016.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: Relating its age with human's. **International Journal of Preventive Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 624–630, 2013.

SHEMBEL, A. C.; LENELL, C.; CHEN, S.; JOHNSON, A. M. Effects of Vocal Training on Thyroarytenoid Muscle Neuromuscular Junctions and Myofibers in Young and Older Rats. **The Journals of Gerontology: Series A**, [s. l.], 2020. DOI: 10.1093/gerona/glaa173.

SHEN, F.; ZHAO, Y.; DING, W.; LIU, K.; REN, X.; ZHANG, Q.; YU, J.; HU, Y.; ZUO, H.; GUO, M.; JIN, L.; GONG, M.; WU, W.; GU, X.; XU, L.; YANG, F.; LU, J. Autonomous climbing: An effective exercise mode with beneficial outcomes of aerobic exercise and resistance training. **Life Sciences**, [s. l.], v. 265, n. 118786, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118786.

SOUSA NETO, I. V.; TIBANA, R. A.; NASCIMENTO, D. C.; VIEIRA, D. C. L.; DURIGAN, J. L. Q.; PEREIRA, G. B.; NAVALTA, J. W.; MARQUETI, R. C.; PRESTES, J. Effects of Resistance Training Volume on MMPs in Circulation, Muscle and Adipose Tissue. **International Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 307–313, 2017. DOI: 10.1055/s-0042-123192.

SOUZA, M. V. C.; LEITE, R. D.; LINO, A. D. S.; DE CÁSSIA, R. M.; BERNARDES, C. F.; DE ARAÚJO, H. S. S.; BOUSKELLA, E.; SHIGUEMOTO, G. E.; PEREZ, S. E. A.; KRAEMER-AGUIAR, L. G. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. **Clinics**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 265–270, 2014. DOI: 10.6061/clinics/2014(04)08.

SPIERING, B. A.; KRAEMER, W. J.; ANDERSON, J. M.; ARMSTRONG, L. E.; NINDL, B. C.; VOLEK, J. S.; MARESH, C. M. Resistance Exercise Biology. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 527–540, 2008. DOI: 10.2165/00007256-200838070-00001.

STANKOVIC, M.; PANTIC, I.; DE LUKA, S. R.; PUSKAS, N.; ZALETEL, I.; MILUTINOVIC-SMILJANIC, S.; PANTIC, S.; TRBOVICH, A. M. Quantification of structural changes in acute inflammation by fractal dimension, angular second moment and correlation. **Journal of Microscopy**, [s. l.], v. 261, n. 3, p. 277–284, 2016. DOI: 10.1111/jmi.12330.

STRICKLAND, J. C.; SMITH, M. A. Animal models of resistance exercise and their application to neuroscience research. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 273, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2016.08.003.

SÜDHOF, T. C. The Presynaptic Active Zone. **Neuron**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 11–25, 2012. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.012.The.

TAKEUCHI, K.; TSUKUDA, F. Comparison of the effects of static stretching on

range of motion and jump height between quadriceps, hamstrings and triceps surae in collegiate basketball players. **BMJ Open Sport and Exercise Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–4, 2019. DOI: 10.1136/bmjsem-2019-000631.

TIBANA, R. A.; FRANCO, O. L.; CUNHA, G. V.; SOUSA, N. M. F.; SOUSA NETO, I. V.; CARVALHO, M. M.; ALMEIDA, J. A.; DURIGAN, J. L. Q.; MARQUETI, R. C.; NAVALTA, J. W.; LOBO, M. O.; VOLTARELLI, F. A.; PRESTES, J. The Effects of Resistance Training Volume on Skeletal Muscle Proteome. **International journal of exercise science**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1051–1066, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29170706> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5685085>. Acesso em: 22 maio. 2020.

TRAJANO, G. S.; NOSAKA, K.; BLAZEVIČH, A. J. Neurophysiological Mechanisms Underpinning Stretch-Induced Force Loss. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 8, p. 1531–1541, 2017. DOI: 10.1007/s40279-017-0682-6.

WANG, Y.; SONG, J.; LIU, X.; LIU, J.; ZHANG, Q.; YAN, X.; YUAN, X.; REN, D. Multiple Effects of Mechanical Stretch on Myogenic Progenitor Cells. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 336–352, 2020. DOI: 10.1089/scd.2019.0286.

YAMASHITA, T.; ISHII, S.; OOTA, I. Effect of muscle stretching on the activity of neuromuscular transmission. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 80–84, 1992. DOI: 10.1249/00005768-199201000-00014.

ZOTZ, T. G.; CAPRIGLIONE, L. G. A.; ZOTZ, R.; NORONHA, L.; VIOLA DE AZEVEDO, M. L.; FIUZA MARTINS, H. R.; SILVEIRA GOMES, A. R. Acute effects of stretching exercise on the soleus muscle of female aged rats. **Acta Histochemica**, [s. l.], v. 118, n. 1, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1016/j.acthis.2015.10.004.