



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
HUMANO E TECNOLOGIAS
(TECNOLOGIAS E DESEMPENHO HUMANO)**

CAROLINA DOS SANTOS JACOB

**ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS AO ALONGAMENTO ESTÁTICO E
EXERCÍCIO RESISTIDO: ANÁLISES MORFOLÓGICAS,
MOLECULARES E FUNCIONAIS**

Rio Claro/SP
2021



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E
TECNOLOGIAS
(TECNOLOGIAS E DESEMPENHO HUMANO)**

**ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE RATOS *WISTAR*
SUBMETIDOS AO ALONGAMENTO ESTÁTICO E EXERCÍCIO RESISTIDO:
ANÁLISES MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E FUNCIONAIS**

CAROLINA DOS SANTOS JACOB

Orientador: Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA

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

Rio Claro/SP
2021

J15a

Jacob, Carolina dos Santos

Adaptações na junção neuromuscular de ratos Wistar submetidos ao alongamento estático e exercício resistido: análises morfológicas, moleculares e funcionais / Carolina dos Santos Jacob. -- Rio Claro, 2021

84 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Junção neuromuscular. 2. Fenda pós sináptica. 3. Alongamento estático. 4. Escada vertical. 5. Dimensão fractal. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE RATOS WISTAR
SUBMETIDOS AO ALONGAMENTO ESTÁTICO E EXERCÍCIO RESISTIDO:
ANÁLISES MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E FUNCIONAIS**

AUTORA: CAROLINA DOS SANTOS JACOB

ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em DESENVOLVIMENTO HUMANO E TECNOLOGIAS, área: Tecnologias nas Dinâmicas Corporais pela Comissão Examinadora:

Adriano Polican Ciena:

Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA (Participação Virtual)

Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro

Gladson Ricardo Flor Bertolini

Prof. Dr. GLADSON RICARDO FLOR BERTOLINI (Participação Virtual)

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Cascavel / PR

Taciane Stein

Profa. Dra. TACIANE STEIN DA SILVA LEAL (Participação Virtual)

Departamento de Farmacologia / Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis / SC

Rio Claro, 26 de maio de 2021

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar saúde, força e discernimento durante todo tempo. Por ter me guardado e protegido, por me tranquilizar e me fazer enxergar o motivo de cada situação.

À minha família: mãe Roseli, avó Helena e irmão Samuel pelos exemplos de luta e determinação diária, por proporcionar tranquilidade, conforto e acreditarem em mim desde quando saí de casa.

Ao Renan Vieira Barreto pela fiel companhia desde 2015. Agradeço todo o amor, compreensão, incentivo, discussões acadêmicas e não acadêmicas que me proporcionam amadurecimento diário.

Agradeço ao Prof. Dr. Adriano Polican Ciena por abrir as portas de seu laboratório lá em 2016 e, desde então acreditou em mim, e incansavelmente acredita no trabalho de todos seus alunos. Aos auxílios técnicos e anatômicos durante o desenvolvimento deste trabalho, aos ensinamentos dentro e fora da sala de aula e pela infinita paciência.

Aos meus companheiros de pós-graduação Jurandyr, Lara e André por tantas discussões, brilhantes ideias, cervejas, risada boa, ombro amigo e todo socorro sem medir esforços de segunda a segunda. Um agradecimento especial à Gabriela Klein Barbosa, companheira de bancada e escadas, que muito contribuiu na minha formação e execução deste trabalho; uma das pessoas mais maravilhosas que conheci na vida, expert em ciências da vida, leonina e muito ocupada para raramente topiar uma cerveja pós trabalho.

Aos meus colegas e alunos de IC do LAMAF, agradeço a ajuda nos dias que eram necessários uma mão-amiga durante a limpeza e treinamento dos animais. Em especial à Mariana Pasquini Rodrigues por vezes nos acompanhar horas e horas na sala de treinamento, nos trazer cookies e doces com Nutella em dias difíceis, além de ter uma dedicação que inspira.

Às moradoras da República Misseduz: Manuela, Rita e Luiza onde compartilhamos uma fase muito importante e de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao técnico José Roberto “Beto” pela aprendizagem no Laboratório de Morfologia e por toda ajuda durante as dissecações.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e seus alunos do Laboratório de Genética de Bactérias por disponibilizar o Microscópio de Fluorescência.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo Câmpus Piracicaba (ESALQ/USP) por disponibilizar o Microscópio de Luz e o Microscópio Eletrônico de Transmissão.

À Prof. Ma. Paula Camargo e ao Departamento de Botânica pela assistência no armazenamento de todas as amostras sempre que necessário.

À técnica Sonia Yokomizo do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo (ICB III - USP) por todo auxílio na Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira, todos os professores e funcionários que estão à frente do programa de pós-graduação Desenvolvimento Humano e Tecnologias.

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

O presente trabalho também foi financiado pelo processo nº 2017/12525-1 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Este trabalho busca descrever as diversas adaptações no ventre muscular e na região pós-sináptica da junção neuromuscular (JNM) frente ao alongamento estático prévio e a sua combinação ou não com as diferentes modalidades de treinamento resistido. Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos com 60 dias de idade divididos em 6 grupos: Controle (C); Alongamento (AL); Escada Vertical (EV); Escada Vertical com Sobrecarga (EVS); Alongamento + Escada Vertical (AEV); Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga (AEVS). O protocolo de alongamento estático consistiu em aplicação manual de dorsiflexão até o limite da amplitude de movimento da articulação talocrural. No protocolo de treinamento resistido dos Grupos EV e AEV, foi utilizada uma escada vertical onde os animais realizaram 24 sessões de treinamento durante 8 semanas, cada sessão consistindo em 9 escaladas. Os Grupos EVS e AEVS realizaram o mesmo protocolo, porém com adição de sobrecarga progressiva. Foram obtidos dados funcionais de tempo, movimento e trabalho realizado em cada sessão, a massa corporal e muscular. Após a eutanásia dos animais, foram coletadas e processadas as amostras dos músculos sóleo e plantar para as técnicas de microscopia de luz, histoquímica e imunomarcagem (α -bulgarotoxina). A análise funcional revelou redução do tempo para EV, EVS e AEV, de movimento para EV e AEV, e de trabalho em EVS $\neq$ EV e AEVS $\neq$ AEV. Houve diferença na massa corporal apenas entre AEV $\neq$ AEVS. O músculo sóleo apresentou diferença em sua massa entre C $\neq$ AEV e AL $\neq$ AEV, enquanto o músculo plantar entre C, AL $\neq$ AEV e EV $\neq$ AEV. A região pós-sináptica do sóleo revelou redução da área total e corada, bem como no perímetro total e corado em EV e AL, redução no número de clusters e fragmentação em AL e AEVS, enquanto a dispersão de AEVS apresentou maiores valores. No plantar, o aumento da área total e corada possui uma relação direta com o aumento da intensidade do exercício, onde EVS apresentou maior valor e, o alongamento prévio revelou ser um fator moderador. Concluímos que o treinamento em escada vertical e o tipo miofibrilar resultam em diferentes efeitos na atividade morfológica do tecido músculo-esquelético e na região pós-sináptica, onde as adaptações de trabalho e hipertrofia muscular são diretamente proporcionais a intensidade do exercício físico. O alongamento prévio a exercícios menos intensos resultou em adaptações semelhantes na JNM do sóleo causadas pelo treinamento com sobrecarga, enquanto o alongamento prévio em ambos os protocolos de escada vertical reduziu a área corada e total da região pós-sináptica do plantar.

Palavras-chave: Junção Neuromuscular. Fenda Pós-sináptica. Área de Secção Transversa. Dimensão Fractal. Alongamento Estático. Escada Vertical. Treinamento Resistido.

ABSTRACT

This work describes the adaptations in the muscular belly and the postsynaptic region of the neuromuscular junction (NMJ) in the face of previous static stretching combined or not with the different types of resistance training. Sixty male *Wistar* rats aged 60 days were divided into 6 groups: Control (C); Stretching (S); Vertical Ladder (VL); Vertical Ladder with Load (VLL); Stretching + Vertical Ladder (SVL); Stretching + Vertical Ladder with Load (SVLL). The static stretching protocol consisted of manual application of dorsiflexion up to the limit of the range of motion of the talocrural joint. In the resistance training protocol of the EV and AEV Groups, a vertical ladder was used which the animals performed 24 sessions during 8 weeks, each session consisting of 9 climbs. The EVS and AEVS performed the same protocol with the addition of overload. Functional data of time, movement, and work performed in each session, body and muscle mass were obtained. After, the samples from the soleus and plantar muscle belly were collected and processed for the techniques of light microscopy, histochemistry, and immunostaining (α -bulgarotoxin). Functional analysis revealed decreased time for EV, EVS, and AEV. Decreased movement for EV and AEV; and work for EVS $\neq$ EV and AEVS $\neq$ AEV. There was a difference in body mass between AEV $\neq$ AEVS. The muscular mass of the soleus a difference between C $\neq$ AEV and AL $\neq$ AEV, while the plantar muscle there was a difference between C, AL $\neq$ AEV, and EV $\neq$ AEV. The postsynaptic region of the soleus showed a decrease in the total and stained area, as well as in the total and stained perimeter in EV and AL, decrease in the number of clusters and fragmentation in AL and AEVS, while the dispersion of AEVS showed higher values. In the plantar, the increase in the total and stained area has a direct relation to the increase in the intensity of the exercise, where EVS presented a higher value and, the previous stretching proved to be a moderating factor. We concluded the training in the vertical ladder results in different effects on the morphological activity of musculoskeletal tissue and in the postsynaptic region, where the adaptations of work and muscle hypertrophy are directly proportional to the intensity of physical exercise. Static stretching before less intense exercise resulted in similar adaptations in the soleus NMJ induced by overload training, while the previous stretching in both vertical ladder protocols decreased the stained and total area of the plantar postsynaptic region.

Keywords: Neuromuscular Junction. Motor Endplate. Cross-section Area. Fractal Dimension. Static Stretching. Vertical Ladder. Resistance Training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Músculos da perna esquerda, face posterior. Gastrocnêmio parcialmente removido	17
Figura 2 – Representação da sinapse química do sistema nervoso periférico.....	20
Figura 3 – Delineamento Experimental do presente trabalho.	27
Figura 4 – Protocolo de alongamento estático.	28
Figura 5 – Protocolo de treinamento livre em escada vertical.	29
Figura 6 – Binarização das imagens para análise da dimensão fractal dos mionúcleos e interstício do ventre muscular.....	32
Figura 7 – Morfometria utilizada para a mensuração da área de secção transversa (AST) e densidade/volume das fibras musculares.....	34
Figura 8 – Morfometria utilizada para as principais variáveis da região pós-sináptica da região neuromuscular.....	36
Figura 9 – Fluxograma da determinação do tratamento estatístico com base na dependência temporal, na distribuição dos dados e na homogeneidade de variância.....	37
Figura 10 – Médias do tempo (s), do movimento da pata anterior direita (un) e do trabalho (J) na primeira e última semana de protocolo de treinamento em escada vertical dos grupos EV, EVS, AEV e AEVS.....	40
Figura 11 – Médias e desvios-padrões do Trabalho (Joules) no teste de CMC nos períodos PRÉ e PÓS dos grupos EVS e AEVS.....	41
Figura 12 – Microscopia de Luz do ventre muscular do sóleo e análise de DF mionuclear dos grupos experimentais.	44
Figura 13 – Microscopia de Luz do ventre muscular do plantar e análise de DF mionuclear dos grupos experimentais.	46
Figura 14 – Box-plot da Área de Secção Transversa das fibras dos Tipos I e II do sóleo dos grupos experimentais.	47
Figura 15 – Box-plot da Área de Secção Transversa das fibras dos Tipos I e II do sóleo dos grupos experimentais.	49
Figura 16 – Médias da análise de Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, II e interstício do sóleo dos grupos experimentais.....	51

Figura 17 – Médias da análise de Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, IIx, IIa e interstício do plantar dos grupos experimentais.	53
Figura 18 – Médias e desvios-padrões dos componentes da fenda pós-sináptica do músculo sóleo.	56
Figura 19 – Médias e desvios-padrões dos componentes da fenda pós-sináptica do músculo plantar.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos estatísticos utilizados para as variáveis analisadas.	38
Tabela 2 – Média e desvio padrão da massa corporal (g) dos grupos experimentais em quatro períodos.	42
Tabela 3 – Média, desvio padrão e relação de massa corporal final e massa muscular do sóleo e plantar dos grupos experimentais.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\neq$	Diferente
+	Soma
$\pm$	Mais ou menos
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μm	Micrômetros
μm^2	Micrômetros quadrados
Ach	Acetilcolina
AChR	Receptores de acetilcolina
ACSM	American College of Sports Medicine
AL	Alongamento
AEV	Alongamento + Escada Vertical
AEVS	Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga
AST	Área de secção transversa
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
C	Controle
cm	Centímetros
DF	Dimensão Fractal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EV	Escada Vertical
EVS	Escada Vertical com Sobrecarga
g	Gramas
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
JNM	Junção Neuromuscular
kg	Quilogramas
MC	Massa corporal
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramas
mg.g⁻¹	Miligrama por grama
min	Minutos

mL	Mililitros
MM	Massa muscular
MM/MC	Relação entre massa muscular e massa corporal
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
nº	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	Solução de salina tamponada com fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSR	Picro-sírus Red
T_{CMC}	Teste de Carga Máxima Carregada
TR	Treinamento Resistido
x	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Músculo Estriado Esquelético	15
2.2 Junção Neuromuscular.....	18
2.3 Alongamento.....	20
2.4 Exercício Físico	21
3 JUSTIFICATIVA	24
4 OBJETIVO GERAL.....	25
4.1 Objetivos Específicos	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1 Animais.....	26
5.2 Protocolo de Alongamento Estático	27
5.3 Protocolo de Escada Vertical	28
5.4 Análises Funcionais	30
5.5 Massa Corporal	30
5.6 Massa Muscular	31
5.7 Microscopia de Luz	31
5.8 Histoquímica Miofibrilar - ATPase	33
5.9 Imunofluorescência (Junção Neuromuscular)	34
5.10 Análises Estatísticas.....	36
6 RESULTADOS	39
6.1 Análises Funcionais	39
6.3 Massa muscular (MM).....	42
6.5 ATPase Miofibrilar	46
6.6 Junção Neuromuscular.....	53
7 DISCUSSÃO	61
7.1 Análise Funcional	61
7.2 Massa corporal e muscular	62
7.3 Dimensão Fractal	64
7.4 ATPase Miofibrilar	65
7.5 Junção Neuromuscular.....	68
8 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A plasticidade muscular é uma das características adaptativas que o tecido músculoesquelético apresenta, responsável pela capacidade em alterar suas propriedades ultraestruturais e funcionais em resposta a diferentes estímulos recebidos do ambiente externo; dessa forma, o desenvolvimento das fibras musculares pode depender de fatores como condições neurais e hormonais, tipo miofibrilar, nutrição, treinamento físico e idade (CURY et al., 2018; DESCHENES et al., 2018; FRONTERA; RODRIGUEZ ZAYAS; RODRIGUEZ, 2012).

A contração muscular ocorre a partir da transmissão unidirecional do impulso nervoso de um neurônio motor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O neurotransmissor acetilcolina liberado pelo neurônio motor na fenda sináptica, liga-se aos seus respectivos receptores na membrana pós-sináptica e, após a despolarização, um potencial de ação percorre todo o comprimento da fibra muscular e estimula a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático (WOOD; SLATER, 2001).

A região de comunicação do terminal de um neurônio motor, com a fibra muscular esquelética e as células gliais não mielinizantes assistentes (i.e. células Schwann perisinápticas) é denominada de junção neuromuscular (JNM) (ALVAREZ-SUAREZ; GAWOR; PRÓSZYŃSKI, 2020) e, seu componente pós-sináptico apresenta ampla plasticidade morfológica diante de condições como a prática de exercícios físicos, envelhecimento e uso de esteroides (DESCHENES et al., 2016; KRAUSE NETO et al., 2017a).

A prática regular de um programa de exercício físico, principalmente o exercício resistido, é altamente recomendada por importantes organizações nacionais e internacionais de saúde como uma intervenção não-medicamentosa, prevenção e tratamento de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, sarcopenia, obesidade e diabetes mellitus tipo II (FLACK et al., 2010; STRASSER; SCHOBERSBERGER, 2011).

Na literatura vigente, inúmeras são as divergências na combinação ou não de alongamentos musculares prévios a exercícios resistidos (NUZZO, 2019). Foram demonstrados que o treinamento de flexibilidade, realizado imediatamente antes do exercício excêntrico, pode atenuar marcadores indiretos de dano muscular, melhorar a estabilidade e o equilíbrio postural (BARROSO et al., 2012; CHEN et al., 2015; COSTA; RTJAS; SMITH, 2017).

Em contrapartida, foram reveladas evidências que o alongamento prévio ao exercício resistido pode atenuar adaptações neuromusculares importantes como força máxima e hipertrofia muscular, além de reduzir também o volume total de treinamento e os resultados em testes de desempenho que requerem força ou potência muscular (SHRIER, 2004; BARROSO et al., 2012; MORIGGI JUNIOR et al., 2017).

O alongamento muscular prévio e os exercícios resistidos são altamente prescritos em programas de treinamento. As principais adaptações teciduais induzidas pelo alongamento estático presumivelmente podem resultar em alterações na atividade neuromuscular, desta forma, este trabalho visa a compreensão das alterações e perspectivas referente à região pós-sináptica da JNM, decorrentes da combinação ou não entre modalidades de exercício em escada vertical em modelo experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Músculo Estriado Esquelético

O tecido muscular esquelético é constituído estruturalmente por células multinucleadas alongadas e cilíndricas, denominadas miofibrilas, com numerosos núcleos que se localizam em sua periferia, nas proximidades do sarcolema (ROMAN; GOMES, 2018).

Cada miofibrila possui propriedades diferentes em relação à sua velocidade na resposta de contração, metabolismo e, principalmente, pela expressão da isoforma da cadeia pesada da miosina (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013; QAISAR; BHASKARAN; VAN REMMEN, 2016). Desta forma, três principais tipos de miofibras podem ser identificadas: Tipo I (fibras lentas, resistentes à fadiga e metabolismo aeróbio); Tipo IIa (fibras intermediárias rápidas e resistentes à fadiga); Tipo IIx (fibras rápidas, rapidamente fatigáveis e metabolismo glicolítico predominante) (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013).

Ainda, as miofibrilas são constituídas por feixes de miofilamentos cilíndricos dispostos longitudinalmente, estes feixes são compostos pelas principais proteínas contráteis: actina, miosina e titina (TONINO et al., 2017; HERZOG, 2018; SWEENEY; HAMMERS, 2018). As proteínas estão distribuídas e organizadas de maneira a compor os sarcômeros, unidades funcionais da contração muscular (RIGOARD et al., 2009; GONZALEZ-FREIRE et al., 2016; HENDERSON, 2017; SQUIRE; PAUL; MORRIS, 2017).

Por ser um tecido que apresenta alta plasticidade, o desenvolvimento das fibras musculares depende de fatores como condições neurais e hormonais, tipo miofibrilar, nutrição, treinamento físico e idade (CURY et al., 2018; DESCHENES et al., 2018; FRONTERA; ZAYAS; RODRIGUEZ, 2012).

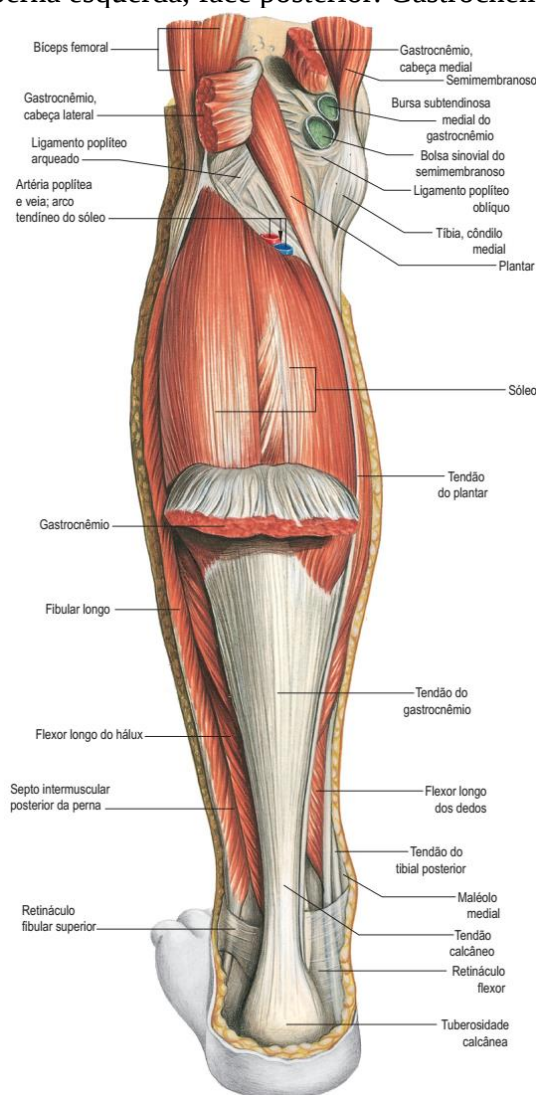
O músculo sóleo, em humanos, é um músculo largo e achatado localizado no compartimento posterior da perna, profundamente ao músculo gastrocnêmio (MOORE; DALLEY; ARGUR, 2019). Possui fixação proximal em formato de U, na face posterior da cabeça da fíbula e no quarto proximal da diáfise da fíbula (MOORE; DALLEY; ARGUR, 2019; STANDRING et al., 2010). A maior parte das fibras musculares emergem da face posterior, e passam obliquamente para o tendão de fixação distal. Fibras musculares oblíquas e bipenadas surgem na face anterior da aponeurose, convergem para um tendão intramuscular central, que por sua vez, torna-se estreito e espesso para se fundir ao tendão do gastrocnêmio

e formar o tendão calcâneo, fixado na face posterior do osso calcâneo (AVERS; BROWN, 2013; STANDRING et al., 2010) (Figura 1).

O músculo sóleo apresenta um papel postural importante na manutenção do bipedismo, com predominância de fibras musculares do Tipo I, responsável pela flexão plantar, que atua no salto, marcha e flexão de joelho (STANDRING et al., 2010) e, juntamente com o músculo gastrocnêmio, atua no auxílio do retorno de sangue venoso (JOSHI, JOSHI & KISHVE, 2010; KAWANO et al., 2010). Durante o repouso simétrico em pé, o sóleo permanece continuamente ativo, enquanto o recrutamento do gastrocnêmio é intervalado (JOSHI; JOSHI; KISHVE, 2010).

Como músculo acessório do sóleo, o músculo plantar também localiza-se no compartimento posterior superficial da perna com pequeno ventre muscular (5 a 10 cm de comprimento) e tendão fino e alongado (KWINTER et al., 2010). É um dos flexores plantares juntamente com os músculos gastrocnêmio e sóleo. Possui fixação proximal no côndilo lateral do fêmur, na linha supracondilar lateral e no ligamento oblíquo poplíteo do fêmur, onde seu ventre muscular é encontrado profundamente ao ventre lateral do músculo gastrocnêmio (NAYAK et al., 2009). Seu tendão normalmente se inclina medialmente e descendente entre os músculos gastrocnêmio e sóleo, onde por sua vez, fixa-se ao longo da extensão da borda medial do tendão calcâneo (SZARO et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1 – Músculos da perna esquerda, face posterior. Gastrocnêmio parcialmente removido



Fonte: SOBOTTA. Atlas de Anatomia Humana: volume 3, 2006.

Estudos apontam que o músculo plantar possivelmente é vestígio de um músculo que uma vez teve fixação à aponeurose plantar como é visto em alguns primatas quadrúpedes (KEITH, 1929) para auxiliar na apreensão semelhante ao músculo palmar longo (DASELER; ANSON, 1943), uma vez que pode ser ausente (em aproximadamente 10%) ou aparecer duplicado na população (KWINTER et al., 2010; SIMPSON; HERTZOG; BARJA, 1991; SUGAVASI et al., 2013).

Em ratos, o músculo sóleo é localizado profundamente ao músculo gastrocnêmio, com fixação proximal na cabeça da fíbula e fixação distal no tubérculo calcâneo (CHIASSON, 1958; KARDONG, 2016). Enquanto o músculo plantar apresenta fixação proximal no epicôndilo lateral do fêmur, e fixação distal no tendão do músculo flexor curto dos dedos (CHIASSON, 1958). Nestes mamíferos, tanto o músculo sóleo quanto o plantar auxiliam na extensão dos membros posteriores (CHIASSON, 1958).

Em geral, o sinal de ativação muscular é conduzido à fibra muscular a partir dos neurônios motores, desta forma, o músculo esquelético é capaz de converter energia química em energia mecânica à fim de gerar força e potência muscular, movimentação e produção de calor para a manutenção da temperatura central (FRONTERA; OCHALA, 2015). No entanto, as propriedades funcionais musculares podem ser alteradas de acordo com seu padrão de atividade em relação às condições de carga, sinais hormonais e neurais (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013).

O tamanho da fibra muscular também sofre adaptações de acordo com o padrão de atividade realizada pelo indivíduo, podendo sofrer hipertrofia ou atrofia, representando uma parte considerável da plasticidade muscular (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013). Neste trabalho, buscamos compreender a complexidade deste tecido de acordo com suas características histoquímicas, frente a prática de alongamento estático e a diferentes modalidades de exercício físico, isolados ou não, executados à longo prazo.

2.2 Junção Neuromuscular

A junção neuromuscular (JNM) é uma sinapse química do sistema nervoso periférico (BARBEAU et al., 2020) constituída pelo terminal de um neurônio motor (localizado na região pré-sináptica) contendo o neurotransmissor acetilcolina; pela fibra muscular esquelética na região pós-sináptica; e pelas células Schwann perisinápticas (ALVAREZ-SUAREZ; GAWOR; PRÓSZYŃSKI, 2020), que contribuem na eficiência da transmissão sináptica, na manutenção e regeneração estrutural da JNM (BARIK et al., 2016; KANG et al., 2014).

As sinapses químicas e mecânicas especializadas no sistema nervoso periférico permitem a transmissão de impulsos neuronais aos músculos esqueléticos para sua contração (DESCHENES, 2019).

A transmissão do impulso nervoso ocorre de forma unidirecional. A despolarização da membrana da célula nervosa pré-sináptica induz a abertura dos canais de íons cálcio no terminal, facilitando a liberação do neurotransmissor por exocitose, onde por sua vez é armazenado nas vesículas dos terminais pré-sinápticos e, após elevações no cálcio citosólico, é liberada na fenda sináptica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) (Figura 2A).

Na região pós-sináptica, a membrana plasmática da fibra muscular se invagina para formar as dobras juncionais, que se estendem da membrana pós-sináptica perpendicularmente

ao citosol muscular (NISHIMINE; SHIGEMOTO, 2018). Essas dobras juncionais contribuem no aumento da área para incluir mais aglomerados (*clusters*) de receptores de acetilcolina (AChR) (SANES; LICHTMAN, 2001; EGUCHI et al., 2020).

Por sua vez, o neurotransmissor liga-se aos seus respectivos receptores na membrana pós-sináptica e, desta forma, promove a despolarização, desencadeando um potencial de ação que percorre todo o comprimento da fibra muscular, estimula a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático e, finalmente, ocorre a contração muscular (WOOD; SLATER, 2001) (Figura 2B).

A morfologia da JNM apresenta grande remodelamento que proporciona adaptações de acordo com seu padrão de uso, principalmente devido à prática de exercício físico, ao tipo miofibrilar, envelhecimento, patologias, ou lesões nervosas e musculares (DESCHENES et al., 2013; PRATT et al., 2015; DESCHENES, 2019).

Com o seu desenvolvimento, há aumento no número de AChR na região pós-sináptica formando uma estrutura complexa, semelhante a um *pretzel* (i.e. massa de pão em forma de nó), com principal papel na eficiência da transmissão elétrica pós-sináptica (MARQUES; CONCHELLO; LICHTMAN, 2000; GUARINO; CANCIANI; FORNERIS, 2020).

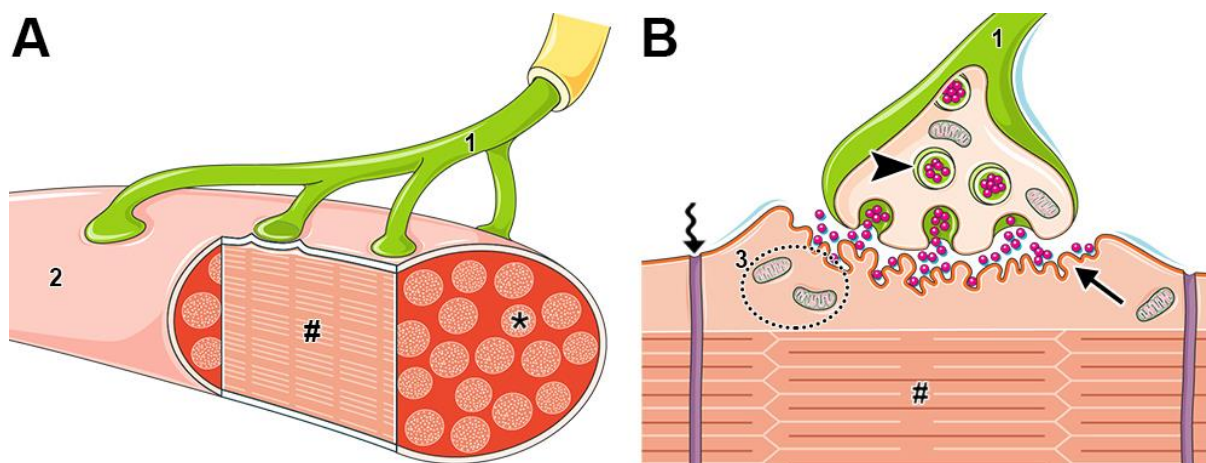
Os detalhes do processo pelo qual os AChR imaturos são remodelados durante o desenvolvimento da JNM, para dar origem a sua morfologia, ainda não são elucidados (SLATER, 2020). Misgeld *et al.* (2005) sugerem que a ACh liberada nos terminais nervosos tende a dispersar os AChRs, e que essa tendência é contrabalançada pela presença de agrina na lâmina basal após ser liberada pelo nervo. Ao mesmo tempo, os locais de depleção dos AChRs durante a maturação da JNM contêm estruturas multiproteicas (i.e. podossomos) que estão envolvidas no processo de remodelação da matriz extracelular (BERNADZKI et al., 2014).

O treinamento aeróbio, ou de *endurance*, em ratos adultos durante algumas semanas gera adaptações em toda arquitetura da região pós-sináptica da JNM, como a expansão da área ocupada pelos receptores de acetilcolina, aumento da dispersão das vesículas pré e pós-sinápticas, e do perímetro das terminações nervosas após 10 semanas de treinamento (DESCHENES et al., 1993; FAHIM, 1997). Diante disso, a comunicação pré- e pós-sináptica seria eficiente, garantindo também, que a fadiga muscular seja prorrogada (BAEHR et al., 2016).

A JNM é um dos principais componentes do sistema neuromuscular, que responde aos estímulos de maneira funcional e anatômica, vinculando o neurônio motor à fibra musculoesquelética (DESCHENES et al., 2015). Baseado em modelo animal, o treinamento

resistido é capaz de adaptar com eficiência os componentes pós-sinápticos da JNM, considerando a idade, volume de treinamento, e até estímulos externos como esteroides anabolizantes (KRAUSE NETO et al., 2017; DESCHENES et al., 2016).

Figura 2 – Representação da sinapse química do sistema nervoso periférico.



Fonte: Ilustrações digitais originais da plataforma online SMART™ Servier Medical Art (Free medical images). Identificações realizadas pela autora com auxílio do Photoshop CS6™. Legenda: A: Terminal axonal do neurônio motor (1) localizado na região pré-sináptica encontra-se com a fibra muscular (*) na região pós-sináptica por meio do sarcolema (2). B: Detalhes da sinapse química, em que, o terminal axonal do neurônio motor (1) contendo o neurotransmissor acetilcolina (cabeça de seta) liga-se nos receptores de acetilcolina na fenda sináptica (seta) desencadeando um potencial de ação que percorre o comprimento da fibra muscular por via dos túbulos T (seta ondulada). #sarcômeros; (3) grupamentos mitocondriais.

2.3 Alongamento

Exercícios de alongamento são altamente difundidos entre indivíduos de todos os níveis de atividade física, comumente prescritos durante o aquecimento de protocolos de treinamentos de força, de condicionamento e de reabilitação física (BOUVIER et al., 2017; KAMONSEKI et al., 2014).

Sua prática regular aprimora uma das propriedades intrínsecas dos tecidos do nosso corpo: a flexibilidade, utilizada a fim de aumentar a amplitude de movimento, aprimorar a extensibilidade muscular e atenuar a incidência de lesões músculo-tendíneas e articulares (KNUDSON et al., 2000; LEMPKE et al., 2018). Além disso, a prática é responsável por efeitos agudos na redução da rigidez do tecido muscular e na unidade músculo-tendão sem causar lesões (NAKAMURA et al., 2011).

Existem algumas técnicas de alongamento nas quais estes objetivos podem ser alcançados, como o alongamento balístico, alongamento dinâmico, facilitação neuromuscular

proprioceptiva (FNP) e alongamento estático (JAGGERS et al., 2008; MANOEL et al., 2008). A escolha da técnica dependerá das características individuais e dos objetivos a serem alcançados (POPP et al., 2017).

O alongamento estático possui baixo risco de lesões, não exige muito tempo ou esforço e tem mostrado resultados benéficos na melhora da flexibilidade tanto em indivíduos sedentários quanto em treinados (AQUINO et al., 2010; AYALA et al., 2013). Essa técnica envolve o alongamento passivo de um determinado músculo, colocando-o em uma posição máxima de alongamento ao ponto de alcançar um desconforto (BEHM et al., 2004), mantendo-o por um período recomendado pela *American College of Sports Medicine* (ACSM) (2011) de 10 a 30 segundos entre 2 a 4 repetições, com frequência semanal de 2 a 3 vezes para adultos saudáveis.

Apesar do alongamento estático ser comumente executado em ambientes esportivos com objetivos específicos de aumentar a amplitude de movimento das articulações e reduzir o risco de lesões (MCHUGH; COSGRAVE, 2010), alguns estudos revelam efeitos contraditórios do alongamento estático no desempenho muscular máximo (NUZZO, 2019).

Durações mais curtas de alongamento prévio, com duração total de até 30 segundos de alongamento por músculo, podem não impactar negativamente o desempenho subsequente, especialmente se a população for altamente treinada (BEHM; CHAOUACHI, 2011). Por outro lado, durações mais longas de alongamento (≥ 60 segundos) provocam deficiências de desempenho (BEHM; CHAOUACHI, 2011; KAY; BLAZEVLICH, 2012). Dessa forma, é necessário cautela ao implementar exercícios de alongamento prévios, de qualquer duração ou para qualquer população, principalmente se for imprescindível manter os níveis de desempenho e performance (BEHM et al., 2015).

Os mecanismos responsáveis pelo aumento do comprimento muscular após o alongamento não são completamente evidenciados, mas o aprimoramento da amplitude de movimento após sessões de alongamento estático podem ser explicadas pela adição de sarcômeros em série, devido à maior exposição às tensões geradas e síntese proteica (PEVIANI et al., 2018; WEPPLER; MAGNUSSON, 2010).

2.4 Exercício Físico

A prática regular de um programa de exercício físico é altamente recomendado por importantes organizações nacionais e internacionais de saúde na prevenção e tratamento de

diversas doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, sarcopenia, obesidade, diabetes mellitus tipo II e, ainda, na prevenção de declínios cognitivos (FLACK et al., 2010; STRASSER; SCHOBERSBERGER, 2011).

O treinamento resistido (TR) refere-se a principal modalidade que proporciona aos indivíduos praticantes evolução na hipertrofia, força, potência e resistência muscular, além das adaptações positivas nas capacidades físicas desempenho motor por meio da contração muscular induzida pela resistência (KRAEMER; RATAMESS, 2004; American College of Sports Medicine, 2009). Além disso, o TR apresenta maior eficiência na melhora de processos metabólicos relevantes para a saúde (e.g. metabolismo da glicose), em parâmetros hemodinâmicos (e.g. pressão arterial, frequência cardíaca, estresse oxidativo), na composição corporal e na atividade muscular do que outras intervenções (VELDEMA; JANSEN, 2020).

As sessões de TR são caracterizadas pelo uso de equipamentos como sobrecarga externa, por exemplo pesos livres e máquinas, à fim de executar contrações excêntricas e concêntricas de uma única ou múltiplas articulações (STRICKLAND; SMITH, 2016).

De acordo com ACSM (2011), recomenda-se o treinamento de cada grupo muscular de 2 a 3 vezes por semana, que resulta em significativo aumento da força muscular, associado ao aperfeiçoamento do desempenho motor e economia de movimento, que retarda a fadiga muscular. Além do ganho de resistência física, diminuição do risco de lesões musculoesqueléticas provenientes do sedentarismo (KRAEMER; RATAMESS, 2004).

Os modelos de TR em animais geralmente envolvem manipulação de estímulos elétricos aplicados diretamente no tecido muscular de interesse (*in situ*) ou modelos que envolvem o comportamento mais semelhante aos procedimentos de treinamento humano, como a escada vertical (KRAUSE NETO et al., 2016).

Hornberger e Farrar (2004) foram pioneiros na publicação de trabalhos relacionados a resposta biológica do TR em roedores com o uso da escada vertical, em que a carga de treinamento é manipulada pela sobrecarga extra fixada na cauda do animal. É importante ressaltar que os modelos experimentais fornecem maior controle sobre os parâmetros do exercício, como a frequência, intensidade, duração e dieta (STRICKLAND; SMITH, 2016).

A manipulação das variáveis presentes no TR (e.g. séries, repetições, sobrecarga e intervalo de descanso) são diretamente proporcionais com o progresso das respostas biológicas adaptativas (QAISAR; BHASKARAN; VAN REMMEN, 2016).

No ano de 2020, devido ao cenário enfrentado e às regras de distanciamento social em razão do COVID-19 (*Corona Virus Disease*), o método de treinamento de força sem a sobrecarga, apenas com o peso corporal (também denominado de calistenia) naturalmente se

popularizou (NYENHUIS et al., 2020), por ser uma alternativa de programa de exercícios físicos eficiente e econômica, que requer o mínimo de equipamentos e espaço (KOTARSKY et al., 2018).

Os resultados de Duruturk *et al.* (2015) após um programa de treinamento calistênico em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, revelaram que esta metodologia pode ser eficaz na melhora do estado geral de saúde do paciente quando comparado ao treinamento em um ciclo ergômetro.

Neste trabalho, buscamos compreender as neuromodulações diante de diferentes modalidades de exercício, e ainda desvendar as possíveis adaptações frente ao alongamento estático prévio a esses treinamentos.

3 JUSTIFICATIVA

A junção neuromuscular (JNM) é um dos principais componentes do sistema neuromuscular, que responde aos estímulos de maneira funcional e anatômica. Sua morfologia se adapta de acordo com as alterações em seu padrão de uso, principalmente em relação à prática de exercício físico e ao tipo miofibrilar (DESCHENES, 2019).

O treinamento com sobrecarga (i.e. treinamento resistido) a longo prazo é capaz de promover a seus praticantes ganho progressivo de força e hipertrofia muscular, e a JNM apresenta elevado nível de plasticidade com alto potencial nas adaptações dos componentes pós-sinápticos, como aumento da área ocupada pelos receptores de acetilcolina e na dispersão das vesículas pré- e pós-sinápticas, garantindo eficiência na comunicação dessa região e fadiga muscular delongada (DESCHENES et al., 1993; FAHIM, 1997; BAEHR et al., 2016), considerando fatores como a idade e volume de treinamento (DESCHENES et al., 2015; KRAUSE NETO et al., 2017b).

Também, tornam-se necessárias as investigações dessas adaptações pós-sinápticas frente ao exercício físico considerado de baixo volume, executado somente com o peso corporal, uma vez que é uma alternativa eficiente nas adaptações do tecido muscular e tendíneo (KOTARSKY et al., 2018; PIMENTEL NETO et al., 2020).

O alongamento muscular é uma estratégia que possui capacidade em desenvolver um efeito bioprotetor no tecido muscular estriado esquelético, e auxiliar na preparação prévia de exercícios físicos (MORTON et al., 2011).

Portanto, este trabalho busca compreender das diversas modulações circunstanciais nos elementos neuromusculares frente ao alongamento muscular e a sua combinação com as diferentes modalidades de treinamento resistido, ao considerarmos a plasticidade dessa região diante de estímulos externos.

4 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo consistiu em investigar as adaptações da região pós-sináptica mediante o alongamento estático prévio combinado ao treinamento em escada vertical com ou sem sobrecarga, considerando as características morfofuncionais dos diferentes tipos miofibrilares do sóleo e plantar de ratos *Wistar* adultos, por meio de análises morfológicas, moleculares e funcionais.

4.1 Objetivos Específicos

- a. Descrever as alterações funcionais de tempo, movimento e trabalho durante o protocolo de treinamento em escada vertical;
- b. Realizar o teste de carga máxima carregada nos grupos EVS e AEVS;
- c. Descrever os aspectos estruturais do ventre muscular com auxílio das colorações de Hematoxilina-Eosina e Picro-Sírius Red na Microscopia de Luz;
- d. Determinar a complexidade de organização mionuclear e de colágeno intersticial do ventre muscular por meio da análise da geometria da Dimensão Fractal;
- e. Identificar os diferentes tipos de fibras musculares e mensurar a área de secção transversa Tipo I, IIa e IIx com auxílio da técnica histoquímica de ATPase Miofibrilar;
- f. Revelar as adaptações na fenda pós-sináptica da JNM do sóleo e plantar por meio da morfometria da área corada e não corada, perímetro corado e não corado, dispersão, diâmetro máximo, número de clusters e fragmentação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos adultos *Wistar* machos com 60 dias de idade e massa corporal de $276,1 \pm 30,9$ g, divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=10) (Figura 3):

Controle (C): animais não submetidos ao treinamento de escada vertical e alongamento;

Alongamento (AL): animais submetidos apenas ao protocolo de alongamento estático;

Escada Vertical (EV): animais submetidos ao treinamento em escada vertical sem sobrecarga;

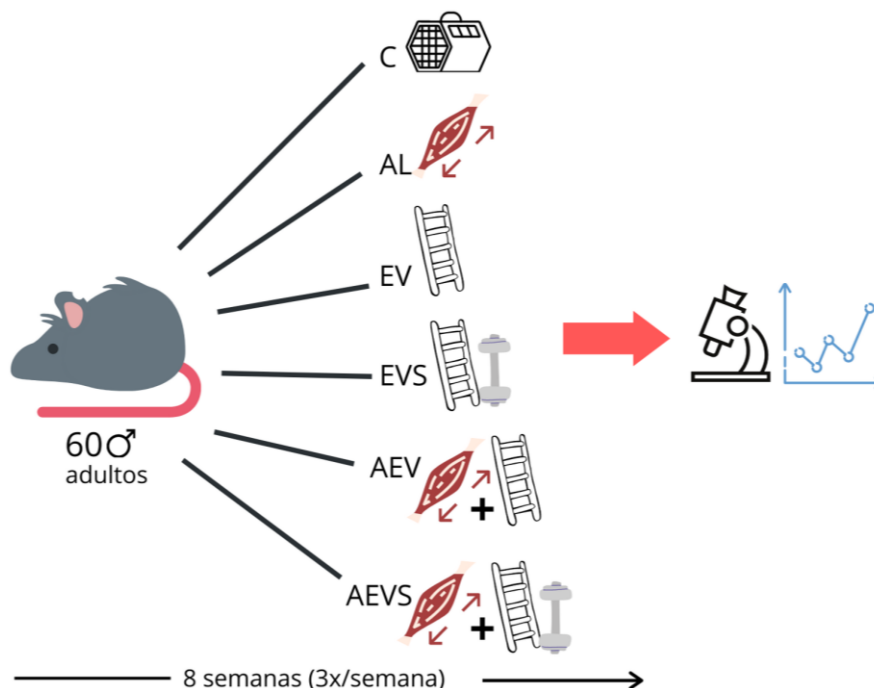
Escada Vertical com Sobrecarga (EVS): animais submetidos ao treinamento em escada vertical com sobrecarga;

Alongamento + Escada Vertical (AEV): animais submetidos ao alongamento estático e posteriormente ao treinamento em escada vertical sem sobrecarga;

Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga (AEVS): animais submetidos ao alongamento estático e posteriormente ao treinamento em escada vertical com sobrecarga.

Todos os animais foram originários do Biotério Central da UNESP – Campus Botucatu/SP e mantidos em gaiolas com 5 ratos em cada no Biotério do Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF) do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Rio Claro/SP. Com a temperatura monitorada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e em períodos de 12 horas claro/escuro, foram alimentados com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Rio Claro/SP (nº09/2019).

Figura 3 – Delineamento Experimental do presente trabalho.

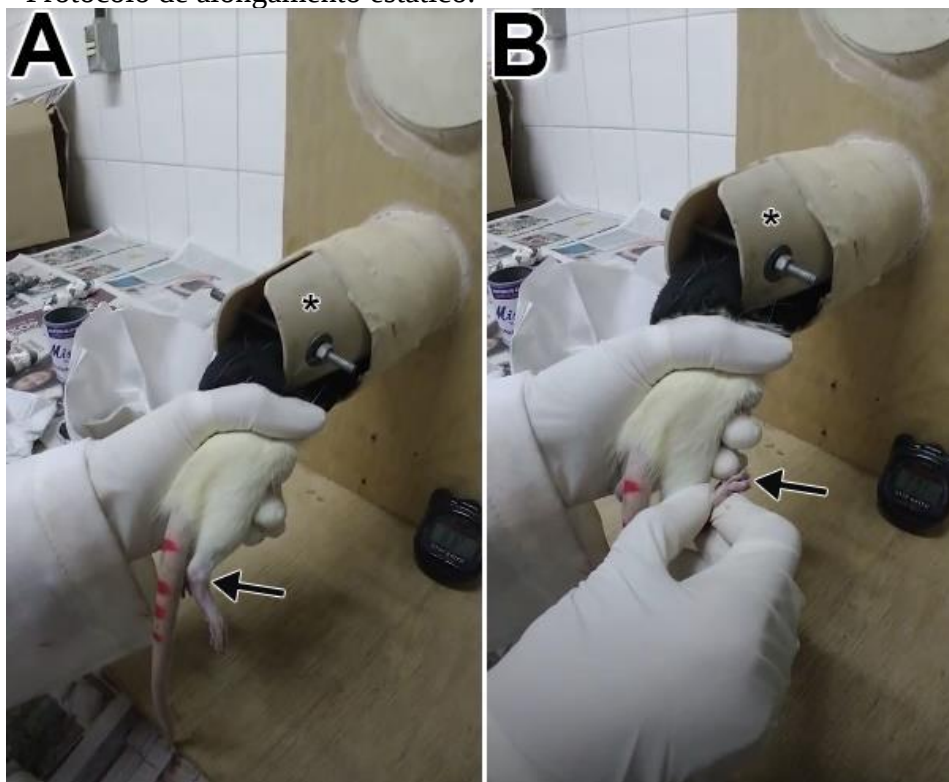


Fonte: Elaborado pela autora via plataforma de design gráfico online Canva®. Legenda: ♂: machos; C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical Resistido; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical Resistido.

5.2 Protocolo de Alongamento Estático

O protocolo de alongamento passivo foi realizado por meio da força manual não quantificada aplicada na porção plantar do membro posterior direito do animal com movimento na direção de dorsiflexão até o limite da amplitude de movimento da articulação talocrural (Figura 4A). O alongamento consistiu em 10 movimentos de 30 segundos de alongamento estático seguidos por 30 segundos de intervalo em repouso na posição articular neutra (Figura 4B). O protocolo foi executado pelo mesmo pesquisador, 3x/semana (Segundas, Quartas e Sextas-feiras) no período de 8 semanas com total de 24 sessões (GIANELO et al., 2016)

Figura 4 – Protocolo de alongamento estático.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: A: Animal durante o intervalo de descanso (30 segundos) em repouso na posição articular neutra. B: Animal submetido ao protocolo de alongamento estático por meio da força manual não quantificada aplicada na porção plantar do membro posterior direito do animal com movimento na direção de dorsiflexão até o limite da amplitude de movimento da articulação talocrural. *Dispositivo confeccionado em material PVC, parafusos e haste de contenção. Seta: posição da articulação talocrural nos dois momentos do protocolo de alongamento estático.

5.3 Protocolo de Escada Vertical

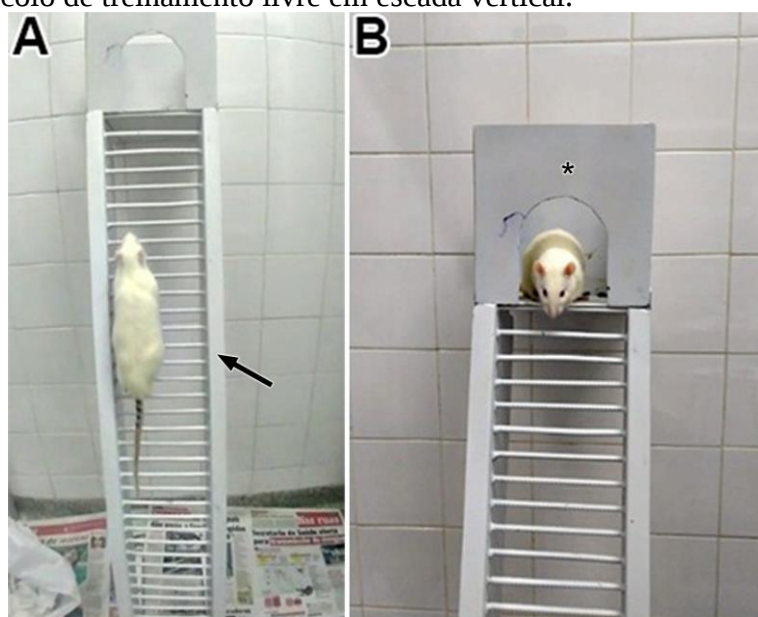
Durante a realização do protocolo de treinamento, foram utilizadas duas escadas verticais com 110 cm de altura, 2 cm de espaçamento entre os degraus, 80° de inclinação vertical em relação ao solo, e uma câmara de alojamento (20 cm³) no topo, onde os animais permaneceram durante o período de descanso entre as escaladas (Figura 5) (KRAUSE NETO et al., 2017).

Uma semana antes do início do protocolo de treinamento, os animais dos Grupos EV, EVS, AEV, AEVS foram submetidos ao período de adaptação, em que: os Grupos EV e AEV realizaram 5 escaladas com ponto de partida definido na região central da escada, com intervalo de 1 minuto entre cada tentativa. Em seguida, os animais iniciaram a escalada a partir da base com objetivo de completar o total de 9 escaladas, com 8 a 12 movimentos dinâmicos por escalada até a câmara de alojamento, onde permaneceram em descanso durante 1 minuto. O protocolo de adaptação dos Grupos EVS e AEVS foi semelhante, porém com

maior período de descanso (2 minutos), além da sobrecarga progressiva de pesos de chumbo, os quais foram aferidos e corrigidos semanalmente, fixados à região proximal caudal.

Após o período de adaptação, os Grupos EV e AEV realizaram 24 sessões de treinamento em escada vertical livre de sobrecarga adicional, 3x/semana (Segundas, Quartas e Sextas-feiras) em um período de 8 semanas. Cada sessão consistiu em 9 escaladas, com intervalos de 1 minuto entre cada uma (3 tentativas para cada escalada). Os Grupos EVS e AEVS realizaram 24 sessões de treinamento em escada vertical resistido (com sobrecarga adicional), 3x/semana (Segundas, Quartas e Sextas-feiras) em um período de 8 semanas. Cada sessão consistiu em 9 escaladas, com sobrecarga progressiva até a 4ª escalada (50%, 75%, 90%, e 100% do peso corporal, respectivamente) e a partir da 5ª escalada foi adicionado 30g de sobrecarga extra até que completasse as 9 escaladas ou até a exaustão (3 tentativas para cada escalada). Os animais dos grupos AEV e AEVS eram submetidos ao protocolo de escada vertical imediatamente após a sessão de alongamento estático. Os animais foram estimulados com auxílio manual (PIMENTEL NETO et al., 2020).

Figura 5 – Protocolo de treinamento livre em escada vertical.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A: Animal em treinamento em escada vertical sem sobrecarga B: Animal na câmara de alojamento da escada vertical durante o intervalo de descanso entre as séries. Seta: Escada vertical com 110 cm de altura, 2 cm de espaçamento entre os degraus, 80° de inclinação vertical em relação ao solo. *Câmara de alojamento (20 cm³) no topo da escada onde os animais permaneceram durante o intervalo de descanso entre as séries.

5.4 Análises Funcionais

A cada sessão durante todo o protocolo de treinamento em escada vertical, foram coletados o tempo de subida e a quantidade de movimentos realizados pela pata anterior direita em cada escalada.

Analizamos também o trabalho realizado por cada grupo (EV, EVS, AEV, AEVS) por meio da carga carregada por cada animal em cada escalada, considerando a massa corporal (g), a sobrecarga carregada (g), a aceleração da gravidade ($9,8\text{m/s}^2$) e altura da escada (1,1m), pelo seguinte cálculo matemático:

$$\text{Trabalho}_{\text{escalada}} = (\text{MC} + \text{sobrecarga}) \times 9,8 \times 1,1$$

Posteriormente, foi realizado a média e desvio padrão do grupo para cada sessão. O volume total de treinamento de cada escalada por sessão foi expresso em joules (J) (DROR et al., 2018).

Os animais do Grupo EVS e AEVS foram submetidos ao Teste de Carga Máxima Carregada (CMC) com objetivo de definir a carga máxima suportada pelo animal durante a escalada. O teste consistiu em uma escalada inicial com sobrecarga de 50% da massa corporal do animal. Após 2 minutos de intervalo de descanso, foi adicionada uma sobrecarga de 30g e o procedimento foi repetido até que o animal não conseguisse concluir a escalada (i.e. exaustão), mesmo após 3 tentativas com estímulo. A maior sobrecarga utilizada durante a última escalada foi considerada a capacidade de CMC do animal. Esse procedimento foi realizado no início e ao final do protocolo de treinamento (KRAUSE NETO et al., 2017).

Após a obtenção dos dados nos testes pré e pós de Carga Máxima Carregada (CMC), foi analisado o trabalho realizado por cada grupo resistido experimental (EVS e AEVS) em cada escalada, considerando a MC dos animais.

5.5 Massa Corporal

A massa corporal de todos os grupos experimentais foi mensurada em balança digital (TOMATE SF400[®]) semanalmente. Após, obteve-se as médias e os desvios padrões em três períodos:

1º período: ao início do experimento definido pelo início dos protocolos de alongamento e treinamento em escada;

2º período: na quinta semana de experimento;

3º período: ao final do experimento definido pelo término dos protocolos de alongamento e treinamento.

5.6 Massa Muscular

Após eutanásia, a massa muscular (MM) do sóleo direito e plantar direito de cada animal foi mensurada com o auxílio de uma balança semianalítica (Marte Científica® AD330). Foram obtidas as médias e desvios padrões, e realizada a relação da massa muscular dividida pela massa corporal final (SOUZA et al., 2014) com auxílio do software Excel®.

5.7 Microscopia de Luz

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, eutanasiados em overdose de anestésico Ketamina (200mg/Kg) e Xilazina (50 mg/Kg) via intraperitoneal. Em seguida, as amostras do ventre muscular do sóleo e do plantar foram dissecadas, estabilizadas com cola biológica (Meio Tissue Tek® O.C.T., Sakura), e talco neutro (Tragacanth, SIGMA®), alocadas em Criomolde (Tissue-Tek® Cryomold, modelo Standart, Sakura), criofixadas em nitrogênio líquido (-196°C), e armazenadas em biofreezer - 80°C.

As amostras do ventre muscular foram seccionadas longitudinalmente (10 µm de espessura – Criostato HM505E, MICROM®) e coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para destaque dos componentes celulares (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014), e com Picro-Sírus Red (PSR) (BHUTDA et al., 2017) para destaque do tecido conjuntivo associado.

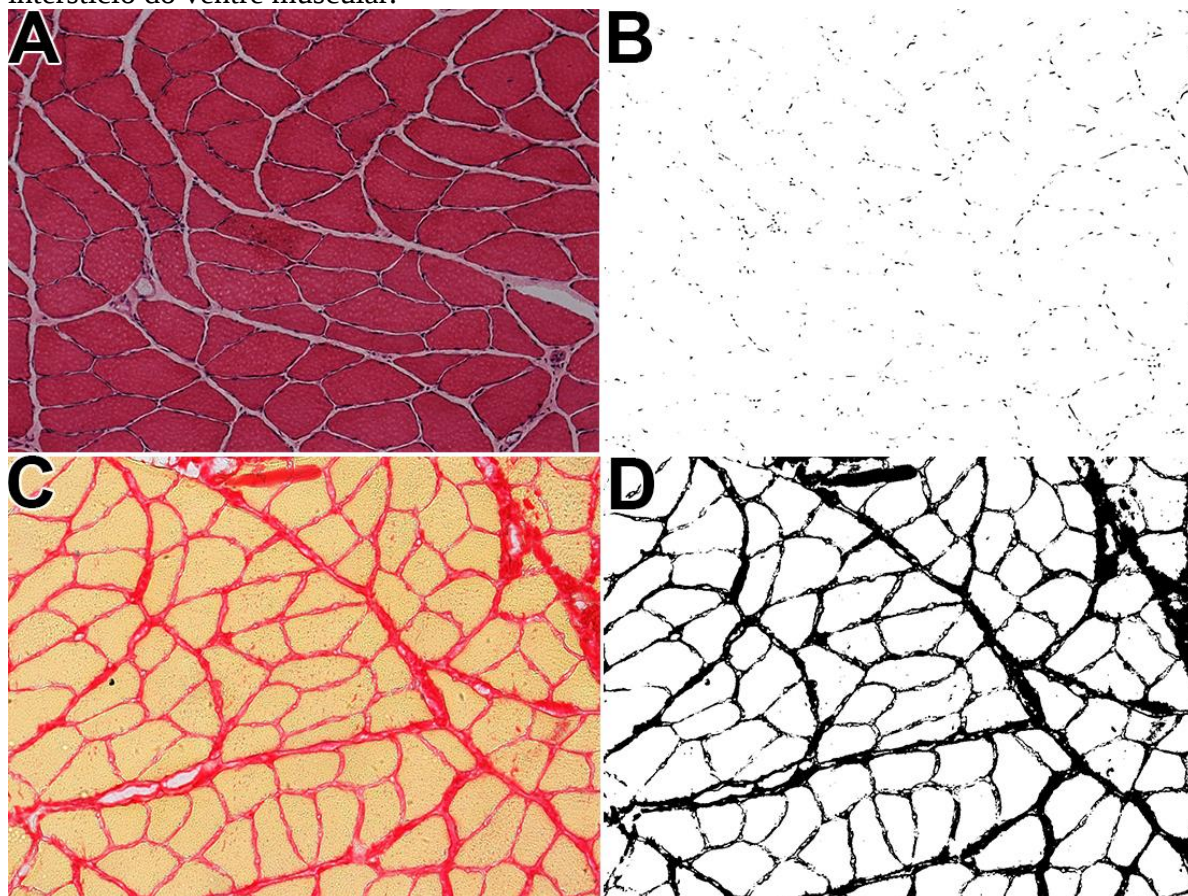
Após a finalização das lâminas, as imagens (n=16 por grupo) foram obtidas com auxílio do fotodocumentador (Zeiss® Axioskop) no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/Esalq) em Piracicaba, SP, Brasil.

Para análise da organização tecidual, foi realizada a análise de geometria da Dimensão Fractal (DF) por meio das imagens de Microscopia de Luz obtidas (Figura 6). A DF é uma ferramenta viável para avaliar a morfologia celular com o mínimo de interferência do avaliador (GARCIA et al., 2018). É uma medida matemática que quantifica a complexidade de uma figura de geometria irregular por meio da distribuição de *pixels* no espaço, sem

considerar sua textura (CURY et al., 2018). As medidas relacionadas a DF são prontamente calculadas por diferentes tipos de software de análise de imagem morfológica (KARPERIEN et al., 2008), como o ImageJ[®] usado neste trabalho. Além disso, uma das vantagens de utilizar este método de análise é sua característica de ser quantitativo por natureza, logo não depende da experiência de examinadores (POPOVIC et al., 2018).

O valor da DF obtido é expresso em uma escala de 0 a 2, onde quanto mais próximo de 2 maior a complexidade de organização tecidual (CURY et al., 2018). Nas colorações de HE, foram analisados a organização miofibrilar e dos mionúcleos, e nas colorações de PSR foram analisados a organização do tecido conjuntivo associado e sua quantificação de área intersticial (%).

Figura 6 – Binarização das imagens para análise da dimensão fractal dos mionúcleos e interstício do ventre muscular.



Legenda: Elaborado pela autora. Legenda: A: Imagem da secção transversal do ventre muscular corada com HE. B: Imagem binarizada pelo software ImageJ[®] para identificação e análise da distribuição dos *pixels*. C: Imagem da secção transversal do ventre muscular corada com PSR. D: Imagem binarizada pelo software ImageJ[®] para identificação e análise da distribuição dos *pixels*.

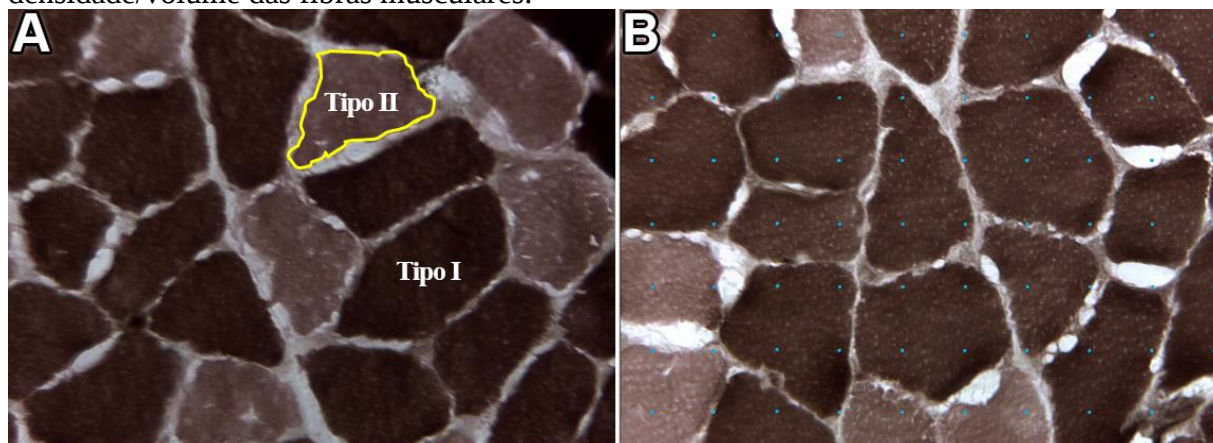
5.8 Histoquímica Miofibrilar - ATPase

As amostras dos ventres musculares do sóleo e plantar direito (n=5) foram devidamente posicionadas e realizadas cortes transversais de 10 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM[®]), os cortes histológicos foram então incubados durante 30 minutos à 37° C em solução contendo 10mg de adenosina trifosfato (ATP) dissolvidos em 2 gotas de água destilada adicionadas em conjunto com 10mL de glicina/tampão NaCl₂, CaCl₂ atingindo o pH 9.4 e, por último, foi adicionado DL-Ditiotreitol (DTT). Os cortes foram lavados em água destilada e incubados por 7 minutos em cloreto de cobalto 2% (ROCHA et al., 2020b). Foi realizada uma nova lavagem das amostras em água destilada, desidratação em séries crescentes de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%), finalização em xilol e fixação com Entellan[®].

Para o método de pH 4.3 e 4.6, as secções foram pré incubadas em solução tampão de acetato de sódio 0,1M com EDTA 10 mM durante 10 minutos à 4°C, posteriormente, as amostras foram lavadas com água destilada e incubadas durante 7 minutos em cloreto de cobalto 2%. Novamente, as amostras foram lavadas em água destilada, desidratadas em séries crescentes de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%), finalizadas com xilol e fixadas com Entellan[®].

Após a finalização das lâminas, as imagens (n=10 por grupo) foram obtidas com auxílio do fotodocumentador (Zeiss[®] Axioskop) no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/Esalq) em Piracicaba, SP, Brasil. A análise morfométrica foi realizada usando o Software ImageJ[®] para a mensuração da área de secção transversa (AST) das fibras musculares dos Tipos I, IIa e IIx (n=100/tipo de fibra/grupo) (Figura 7A). Ainda, para a análise esteriológica de Densidade/Volume (%) as imagens utilizadas (ampliação: 200X) foram definidas com uma grade de 0,15 polegadas por área de imagem, totalizando 2250 pontos identificados manualmente (Figura 7B) como fibras do Tipo I, IIa e IIx e interstício (ROCHA et al., 2020b).

Figura 7 – Morfometria utilizada para a mensuração da área de secção transversa (AST) e densidade/volume das fibras musculares.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: A: Identificação das fibras musculares do Tipo I e II; mensuração (em amarelo) da AST da fibra do Tipo II. B: Análise esteriológica da densidade por volume das fibras do Tipo I, II e do interstício.

5.9 Imunofluorescência (Junção Neuromuscular)

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, submetidos à overdose de anestésico Ketamina (200 mg/kg) e Xilazina (50 mg/kg) intraperitoneal. As amostras do músculo sóleo e plantar direito foram dissecadas e criofixadas em nitrogênio líquido -196°C , através da alocação em criomoldes padrão (Tissue-Tek[®] Cryomold, modelo Standart, Sakura), estabilizadas com cola biológica e talco neutro (Tragacanth, SIGMA[®]), em seguida armazenadas em Freezer -80°C . Foram realizadas secções longitudinais (Criostato HM 505 E, MICROM[®] - Laboratório de Morfologia UNESP Rio Claro/SP) a -25°C com espessura de 100 μm , coletadas em lâminas histológicas silalizadas e armazenadas em biofreezer -80°C para posterior processamento da técnica de Imunofluorescência.

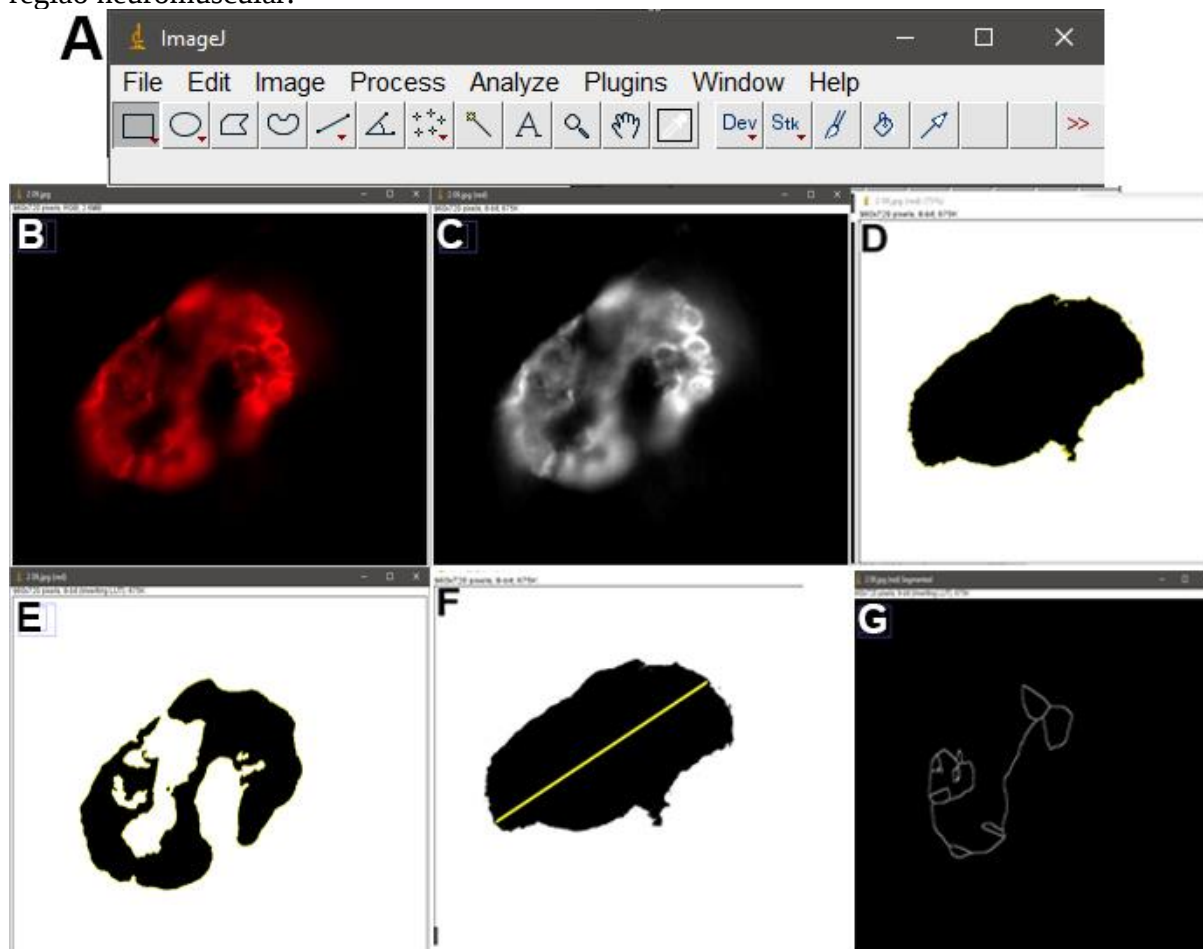
As amostras foram lavadas 3x com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 1% albumina sérica bovina (BSA) e, incubadas *overnight* (16h) em uma câmara umidificada à 4°C em solução contendo α -Bungarotoxin, Tetramethylrhodamine Conjugate (BTX; Molecular Probes, Eugene, OR-T-1175[®]), diluída em PBS (1:600). Posteriormente, as amostras foram lavadas 3x com PBS contendo BSA 1%, em seguida finalizadas com Prolong[®] (Molecular Probes, Eugene, OR-P10144), e armazenadas em -20°C .

As imagens foram obtidas pelo Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) da UNESP Rio Claro/SP. A análise morfométrica da região pós-sináptica foi realizada com auxílio do software ImageJ[®] em

representações binárias (JONES et al., 2016) (Figura 8). Foram mensuradas as seguintes variáveis:

- a. Perímetro total: comprimento que abrange toda placa motora final composta por grupos de receptores corados e não corados (Figura 8D);
- b. Perímetro corado: comprimento do conjunto de receptores de ACh (Figura 8E);
- c. Área total: toda região de receptores corados e não corados (Figura 8D);
- d. Área corada: a região ocupada por grupos de receptores de ACh (Figura 8E);
- e. Dispersão da placa motora final: considerada pela divisão da área corada da placa final pela área total e multiplicado por 100, que indica a quantidade de AChR dentro de uma determinada área (DESCHENES et al., 2013).
- f. Diâmetro máximo da região pós-sináptica (Figura 8F).
- g. Número de clusters (Figura 8G).

Figura 8 – Morfometria utilizada para as principais variáveis da região pós-sináptica da região neuromuscular.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Morfometria utilizada para as principais variáveis da região pós-sináptica da região neuromuscular com auxílio do software ImageJ®. A: Janela inicial do software ImageJ®. B: Imagem da imunomarcagem da região pós-sináptica da JNM com α -bungarotoxina conjugada com rodamina com ampliação de 1000X. C: Imagem da região pós-sináptica (canal vermelho) após a separação dos canais da imagem RGB (vermelho, verde e azul). D: Imagem binarizada da região pós-sináptica com delimitação total de área e perímetro. E: Imagem binarizada da região pós-sináptica com delimitação total de área e perímetro dos AChR. F: Imagem binarizada da região pós-sináptica com delimitação do diâmetro máximo. G: Identificação do número de clusters.

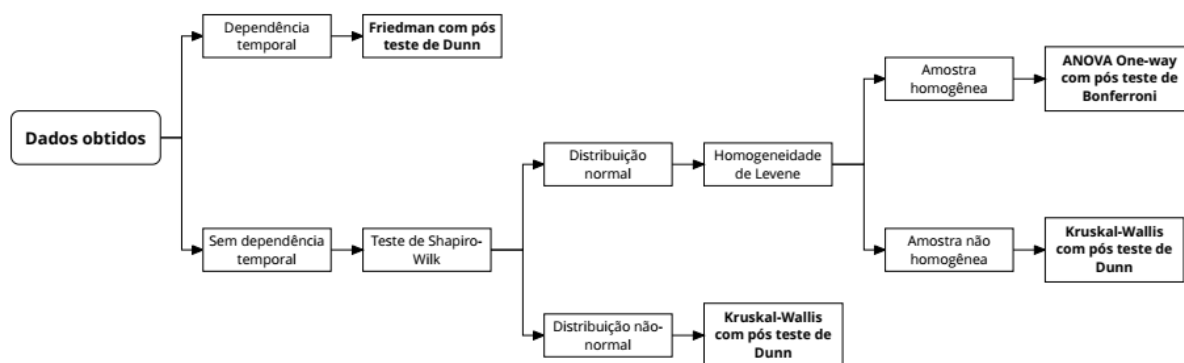
5.10 Análises Estatísticas

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 das variâncias e a dependência temporal (Figura 9). A normalidade de distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha=0,05$), 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, 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, 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 da análise funcional da primeira e da oitava semana de treinamento que verificaram a progressão intragrupo no tempo, movimento e trabalho foram considerados como dados dependentes, 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 via plataforma online GoConqr®. Legenda: As setas unidirecionais indicam a sequência de verificação dos dados.

A Tabela 1 apresenta os tratamentos estatísticos realizados para as variáveis analisadas no presente estudo.

Para os dados de tempo e movimento durante o protocolo de treinamento e no T_{CMC} (pré e pós), foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman com pós teste de Dunn.

Para os dados de MC (1ª, 5ª e 8ª semana), a sua relação com a massa corporal (MM/MC), e no trabalho realizado na 8ª semana de treinamento, foi utilizada a análise de variância ANOVA One-way com pós teste de Bonferroni (dados paramétricos).

Nas análises de AST e Densidade/volume das fibras musculares (sóleo e plantar) foi utilizado o teste ANOVA Two-way com pós teste de Bonferroni (dados paramétricos).

Nas análises de DF da organização miofibrilar e dos mionúcleos, do tencido conjuntivo associado e da área positiva foram realizados os testes ANOVA One-way com pós teste de Bonferroni (dados paramétricos).

Nos dados de MM (sóleo e plantar), trabalho realizado na 1ª semana de treinamento, e as variáveis dos componentes pós-sinápticos (área e perímetro total, área e perímetro corado, diâmetro máximo, dispersão, número de *clusters* e índice de fragmentação) foram realizadas o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Tabela 1 – Tratamentos estatísticos utilizados para as variáveis analisadas.

Dados	Testes Estatísticos			
	Friedman com pós teste de Dunn	Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn	ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni	ANOVA Two Way com pós teste de Bonferroni
Tempo	x			
Movimento	x			
Trabalho na 1ª semana		x		
Trabalho na 8ª semana			x	
Trabalho pré e pós T _{CMC}	x			
MC 1ª semana			x	
MC 5ª semana			x	
MC 8ª semana		x		
MM			x	
MM/MC		x		
AST				x
Densidade/volume				x
DF			x	
Área total		x		
Área corada		x		
Perímetro total		x		
Perímetro corado		x		
Dispersão		x		
Diâmetro máximo		x		
Número de clusters		x		
Índice de fragmentação		x		

Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Tabela de tratamento estatístico utilizado nas variáveis analisadas. MC: massa corporal; MM: massa muscular; MM/MC: relação da massa muscular e massa corporal; AST: área de secção transversa das fibras musculares; DF: Dimensão Fractal; TCMC: teste de carga máxima carregada.

6 RESULTADOS

Os resultados da análise funcional de tempo, movimento e trabalho, massa corporal e muscular estão descritos a seguir. Bem como os resultados morfológicos e morfométricos de ATPase miofibrilar, densidade/volume (%), área corada e não corada, perímetro corado e não corado, dispersão, diâmetro máximo, número de clusters e índice de fragmentação da região pós-sináptica dos grupos C, AL, EV, EVS, AEV e AEVS.

6.1 Análises Funcionais

O tempo durante as semanas de treinamento de escada vertical revelou a sobreposição das médias entre todos os grupos experimentais (Figura 10). A análise da 1ª e 8ª semana revelou que os grupos não apresentaram diferença estatística entre si, na qual a média da última semana permaneceu entre 4s e 5s.

Porém, quando comparamos a 1ª e a 8ª semana de EV observamos redução no tempo de subida de aproximadamente 38%, sem diferença estatística. Em relação ao tempo da 1ª e 8ª semana do grupo EVS, houve redução de 42% ($p < 0,001$).

Quando comparado a 8ª semana de protocolo de treinamento com a 1ª dos animais AEV, revelamos redução no tempo de aproximadamente 36% ($p < 0,0001$). Já o tempo de subida da escada dos animais AEVS apresentaram 65% de redução, sem diferenças estatísticas (Figura 10A).

Os movimentos executados pela pata anterior direta dos animais durante as primeiras semanas de treinamento demonstraram distribuição entre 10 e 6 movimentos, sem diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 10B).

O grupo EV apresentou redução da média de movimentos em aproximadamente 14% ($p < 0,001$) entre a 1ª e 8ª semana. Já o grupo EVS revelou redução de 18%, sem diferença estatística.

Por outro lado, os animais do grupo AEV demonstraram aproximadamente 30% de redução na média de movimentos ($p < 0,0001$). Ainda, o grupo AEVS não apresentou diferença estatística, com redução de 0,85%.

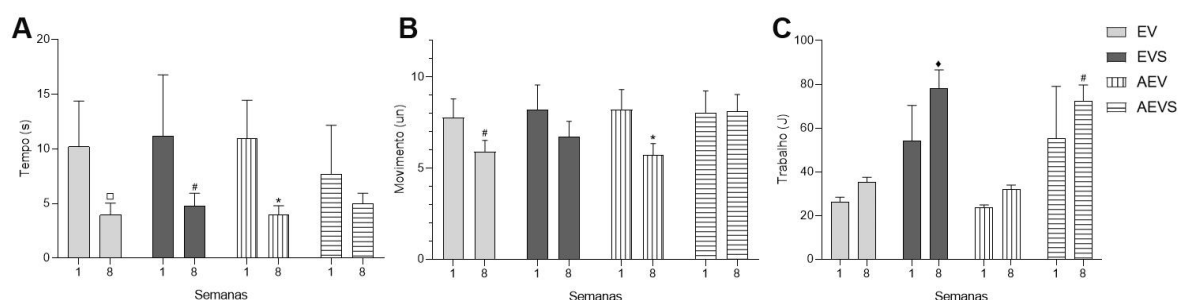
Foi calculada a média dos valores de trabalho (T_{escalada}) realizado por cada animal durante todas as sessões de treinamento, e ao final, obtivemos o valor médio do grupo em cada sessão.

As médias do trabalho realizado pelos grupos demonstraram diferença entre os treinamentos com e sem o uso de sobrecarga. Os grupos EVS e a AEVS apresentaram inclinação crescente das médias que, ao final do protocolo, se mantiveram entre 75J e 79J. Por outro lado, os grupos EV e AEV apresentaram inclinação menos acentuada em comparação aos grupos com sobrecarga, e se mantiveram entre 32J e 36J na 8ª semana de protocolo (Figura 10C).

A 1ª semana de protocolo de treinamento em escada vertical revelou diferença no trabalho de 10,82% maior do grupo EV comparado ao AEV, de 134,84% maior entre o grupo AEVS e AEV, de 103,64% no grupo EVS em relação ao EV, e ainda, de 4,22% no AEVS comparado ao EVS, sem diferenças estatísticas.

Quando comparado a 1ª semana de protocolo de treinamento com a 8ª, o aumento do trabalho foi de 34,92%; 44,62%; 36,78% e 39,39% para os grupos EV, EVS, AEV e AEVS, respectivamente.

Figura 10 – Médias do tempo (s), do movimento da pata anterior direita (un) e do trabalho (J) na primeira e última semana de protocolo de treinamento em escada vertical dos grupos EV, EVS, AEV e AEVS.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: A. Médias $\pm$ desvios padrões de tempo da primeira (1) e oitava semana (8) de treinamento expresso em segundos (s), no qual $\square 1EV \neq 8EV$ ($p=0,0001$); $\# 1EVS \neq 8EVS$ ($p<0,001$); $* 1AEV \neq 8AEV$ ($p>0,0001$). B. Médias $\pm$ desvios padrões de movimento da pata direita anterior da primeira (1) e oitava semana (8) de treinamento expresso em unidade (un), no qual $\# 1EV \neq 8EV$ ($p<0,001$); $\# 1AEV \neq 8AEV$ ($p>0,0001$). C. Médias $\pm$ desvios padrões do trabalho da primeira (1) e oitava semana (8) de treinamento expresso em joules (J), no qual $* 8EV \neq EVS$ ($p<0,05$); $\# 8AEV \neq 8AEVS$ ($p<0,01$). Dados tratados estatisticamente com análise de variância ANOVA One-way, com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p<0,05$. EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

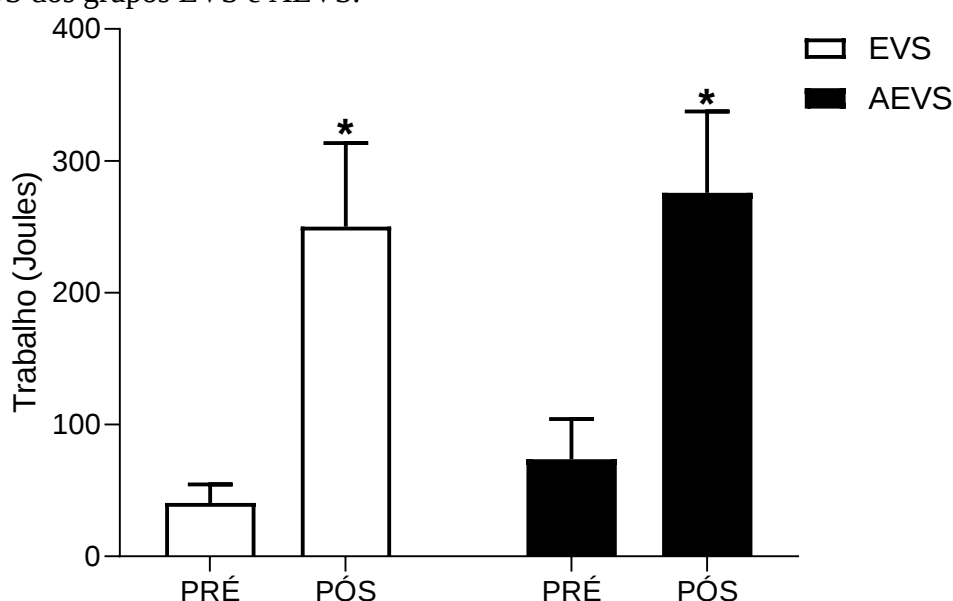
Após a obtenção dos dados nos testes pré e pós de Carga Máxima Carregada (CMC), foi analisado o trabalho realizado por cada grupo resistido experimental (EVS e AEVS) por meio da carga carregada pelo animal em cada escalada (T_{CMC}) (Figura 11).

No teste PRÉ, os animais do grupo AEVS apresentaram valor de trabalho 37,46% maior que os animais do grupo EVS, sem diferenças estatísticas.

Houve aumento de 616,41% ($p>0,0001$) do trabalho do grupo EVS entre os testes PRÉ e PÓS. E no grupo AEVS o aumento do trabalho entre os testes PRÉ e PÓS foi de 283,17% ($p>0,0001$).

No teste PÓS, o grupo AEVS apresentou o trabalho 0,59% maior que o grupo EVS, sem diferenças estatísticas.

Figura 11 – Médias e desvios-padrões do Trabalho (Joules) no teste de CMC nos períodos PRÉ e PÓS dos grupos EVS e AEVS.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Médias e desvio padrões de trabalho realizado no teste PRÉ e PÓS do teste de carga máxima carregada expresso em Joules (J). Dados tratados estatisticamente com análise de variância ANOVA Two-way, com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p<0,05$. *PRÉ EVS≠PÓS EVS ($p>0,0001$); *PRÉ AEVS≠PÓS AEVS ($p>0,0001$). EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga. PRÉ: antes do protocolo de treinamento; PÓS: após o protocolo de treinamento.

6.2 Massa Corporal (MC)

Os dados obtidos a partir da mensuração da massa corporal dos animais dos grupos experimentais estão apresentados na Tabela 2.

A massa corporal da 1ª semana demonstrou que os animais de grupo C apresentaram valores menores em comparação com os demais grupos experimentais, e houve diferença estatística apenas entre EVS ($p<0,05$).

Na 5ª semana de protocolo de treinamento, os grupos AEV e AEVS apresentaram menores valores comparado aos grupos C, AL, EV e EVS.

Na 8ª semana, os valores de MC do grupo C apresentaram maiores ($p < 0,0001$) em relação aos demais grupos experimentais. Ainda, o grupo AEV revelou menor MC em relação aos grupos EV, AL e AEVS, sem diferenças estatísticas.

Tabela 2 – Mediana e variância da massa corporal (g) dos grupos experimentais em quatro períodos.

Semana	Grupos					
	C	AL	EV	EVS	AEV	AEVS
1ª	217,2±14,55	280±21,85	294±8,89	305±32,70*	273±15,17	287,4±20,45
5ª	352±42,36*	364,8±22,38*	356,2±13,99	367,2±31,64	339,6±22,73	348,6±28,29
8ª	471,6±36,62*	399,4±16,12 [□]	405,4±38,95*	395,2±19,40	372,72±15,64 [#]	388±24,27 [#]

Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Mediana ± variância da massa corporal dos animais na primeira, quinta e oitava semana de protocolo expresso em gramas (g). Dados tratados estatisticamente com análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0,05$. *1C≠5C e 8C ($p < 0,0001$); *1AL≠5AL ($p < 0,05$); [□]1AL≠8AL ($p < 0,001$); *1EV≠8EV ($p < 0,0001$); [#]1AEV≠8AEV ($p < 0,01$); [#]5AEVS≠8AEVS ($p < 0,05$); *1C≠1EVS ($p < 0,05$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.3 Massa muscular (MM)

Os dados obtidos de massa muscular (MM) do sóleo e plantar e a correlação com a massa corporal (MC) dos grupos experimentais estão apresentados a seguir.

A Tabela 3 representa os dados obtidos dos grupos experimentais referente à MC final, à MM do sóleo (MM_{sóleo}) e plantar (MM_{plantar}), e à relação entre ambas (MC/MM).

Em relação ao sóleo, a MM_{sóleo} de C revela maior valor comparado a AEV ($p > 0,05$). Enquanto o grupo AEV revela menor valor em relação aos grupos AL ($p > 0,01$), C e EV, sem diferenças estatísticas. Os animais AEVS apresentaram valores de MM_{sóleo} 8,4% e 6,9% menor que AL e EVS, respectivamente, sem diferenças estatísticas. Houve redução de 5,5% no valor de entre MM_{sóleo} em EVS comparado ao grupo EV.

O grupo AEV apresentou menor valor em relação aos grupos AL ($p > 0,0001$), EV ($p > 0,0001$) e AEVS ($p > 0,01$). O grupo AEVS revelou menor valor comparado ao AL ($p > 0,0001$) e EVS ($p > 0,001$). Ainda, AEV apresentou valor 8,8% menor comparado ao AEVS, sem diferenças estatísticas. Não houve diferença estatística entre EV e EVS.

A respeito do plantar, a MM_{plantar} do grupo AEVS revelou maior valor quando comparado com AEV ($p > 0,05$) e menor valor em relação ao grupo C ($p > 0,0001$). O grupo AEV apresentou menor valor comparado a C ($p > 0,0001$), AL ($p > 0,0001$) e EV ($p > 0,0001$). Já

os animais AEVS apresentaram valores de MM_{plantar} 39,25% ($p>0,0001$) menor que AL e 34,29% que EVS, sem diferenças estatísticas. Houve redução de 4,6% em EVS comparado a EV, sem diferenças estatísticas.

O grupo AEV apresentou menor valor em relação aos grupos C ($p>0,001$), AL ($p>0,0001$) e EV ($p>0,0001$). Por outro lado, o grupo AEVS revelou menor valor comparado com grupo EVS ($p>0,01$), AL ($p>0,0001$) e C, sem diferenças estatísticas. Ainda, AEV apresentou redução de 17,7% comparado ao AEVS, sem diferenças estatísticas. Também não houve diferença estatística entre EVS e EV.

Tabela 3 – Mediana, variância e relação de massa corporal final e massa muscular do sóleo e plantar dos grupos experimentais.

	Grupos					
	C	AL	EV	EVS	AEV	AEVS
MC (g)	471,6±36,62	399,4±16,12	405,4±38,95	395,2±16,40	372,72±15,64	388±24,27
MM_{sóleo} (g)	0,213±0,032	0,190±0,026	0,198±0,024	0,187±0,032	0,154±0,035 ^{*,#}	0,174±0,036
MM/MC_{sóleo}	0,045%	0,047%	0,050%	0,046%	0,041% ^{*,#}	0,045%
MM_{plantar} (g)	0,345±0,026	0,337±0,313	0,340±0,022	0,325±0,046	0,191±0,056 [□]	0,242±0,070
MM/MC_{plantar}	0,073%	0,083%	0,085%	0,082%	0,051% ^{*,*}	0,062% ^{*,*}

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Mediana, variância e relação de massa corporal final e massa muscular do sóleo e plantar dos grupos experimentais. Dados tratados estatisticamente com análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p<0,05$. $MM_{\text{sóleo}}$: ^{*}C≠AEV ($p<0,05$) e [#]AL≠AEV ($p<0,01$). MM_{plantar} : [□]C≠AEV ($p<0,001$); AL≠AEV ($p<0,001$); EV≠AEV ($p<0,01$). $MM/MC_{\text{sóleo}}$: ^{*}C≠AEV ($p<0,05$); [#]AL≠AEV ($p<0,01$) e ^{*}EV≠AEV ($p<0,05$). MM/MC_{plantar} : ^{*}C≠AEV ($p<0,0001$); [#]C≠AEVS ($p<0,01$); ^{*}AL≠AEV e AEVS ($p<0,0001$); ^{*}EV≠AEV ($p<0,0001$); [#]EVS≠AEVS ($p<0,001$) e ^{*}AEV≠AEVS ($p<0,05$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga. MC (g): Massa corporal final expresso em gramas (g); MM (g): Massa muscular expresso em gramas (g); MM/MC: Relação de massa muscular e massa corporal final expresso em porcentagem (%).

6.4 Análise de Dimensão Fractal

Revelamos alterações no ventre muscular do sóleo (Figura 12) e do plantar (Figura 13) por meio da análise de Dimensão Fractal após 8 semanas de protocolos de alongamento e treinamento em escada vertical, combinados ou não.

6.4.1 Dimensão Fractal – Sóleo

Os mionúcleos e miofibras do sóleo foram evidenciados pela técnica de coloração de HE (Figura 12A).

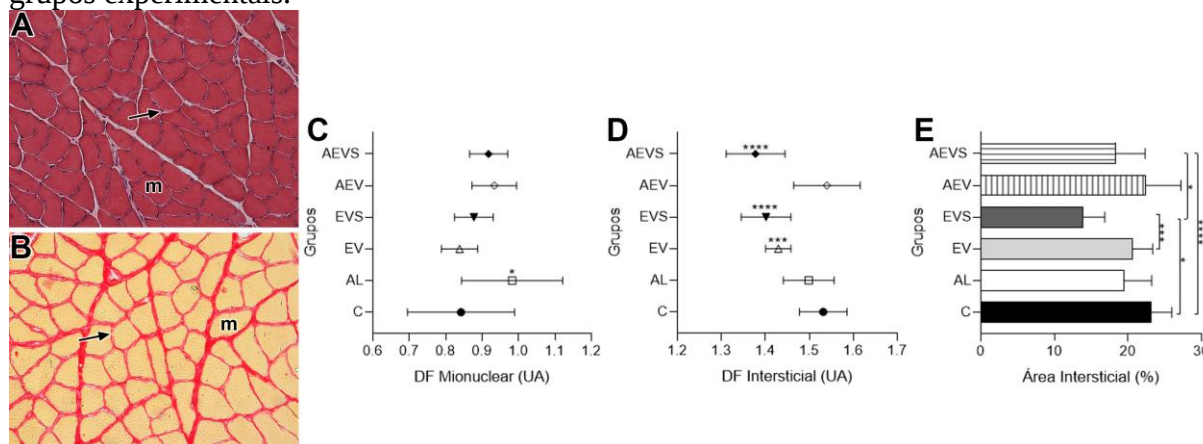
A análise de DF dos mionúcleos revelou que o grupo AL apresentou maiores valores comparado aos grupos C ($p<0,05$), EV, EVR, AEV e AEVS (Figura 12C).

O interstício do ventre muscular do sóleo foi evidenciado pela técnica de coloração de PSR (Figura 12B). Desta forma, foi possível observar a relação do endomísio, epimísio e perimísio com as fibras musculares.

A análise de DF intersticial revelou que o grupo AL apresentou menor valor em relação aos grupos C ($p<0,05$) e AEV. O grupo EV revelou menor valor comparado a C ($p<0,001$) e AEV. O grupo EVS apresentou menor valor em relação aos grupos C e EV ($p<0,001$), e maior valor comparado a AEVS ($p<0,05$). O grupo AEV revelou maior valor que C, AL, EV e AEVS ($p<0,0001$). Por outro lado, o grupo AEVS apresentou menor valor que C ($p<0,0001$), AL ($p<0,0001$), EVS e AEV ($p<0,0001$) (Figura 11D).

Sobre a área intersticial, os grupos AL, EV, EVS ($p<0,05$), AEV ($<0,01$) e AEVS ($p<0,0001$) apresentaram redução comparado ao grupo C. Houve redução no grupo EVS em relação aos grupos EV ($p<0,001$) e AEVS. O grupo AEV apresentou aumento comparado aos grupos AL e EV, e redução em relação a AEVS, sem diferenças estatísticas. Ainda, O grupo AEVS revelou redução comparado com AL, sem diferenças estatísticas (Figura 12E).

Figura 12 – Microscopia de Luz do ventre muscular do sóleo e análise de DF mionuclear dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: A: Secção transversal do músculo sóleo corado com a técnica de HE, com destaque aos mionúcleos (seta) dispostos adjacentes às miofibras (m). Ampliação: 40X. B: Secção transversal do músculo sóleo corado com a técnica de PSR, com destaque ao tecido conjuntivo associado - endomísio (seta) e as miofibras (m). Ampliação: 40X. C: Box-plot da dimensão fractal mionuclear, valor expresso em unidade arbitrária (UA). Dados tratados estatisticamente com a

análise de variância One-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$: *AL $\neq$ C ($p < 0,05$). D: Box-plot da dimensão fractal intersticial, valor expresso em unidade arbitrária (UA). Dados tratados estatisticamente com a análise de variância One-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$: *AL $\neq$ C ($p < 0,05$). ***EV $\neq$ C ($p < 0,001$); ****EVS $\neq$ C ($p < 0,0001$); ****AEVS $\neq$ C, AL, AEV ($p < 0,0001$). E: Médias e desvios-padrões da área positiva do tecido conjuntivo associado, valor expresso em porcentagem (%). Dados tratados estatisticamente com a análise de variância One-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$: *EVS $\neq$ C ($p < 0,05$); ***EVS $\neq$ EV ($p < 0,001$); ****AEVS $\neq$ C ($p < 0,0001$); *AEVS $\neq$ EVS ($p < 0,05$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.4.2 Dimensão Fractal – Plantar

Os mionúcleos e miofibras do plantar foram evidenciados pela técnica de coloração de HE (Figura 13A).

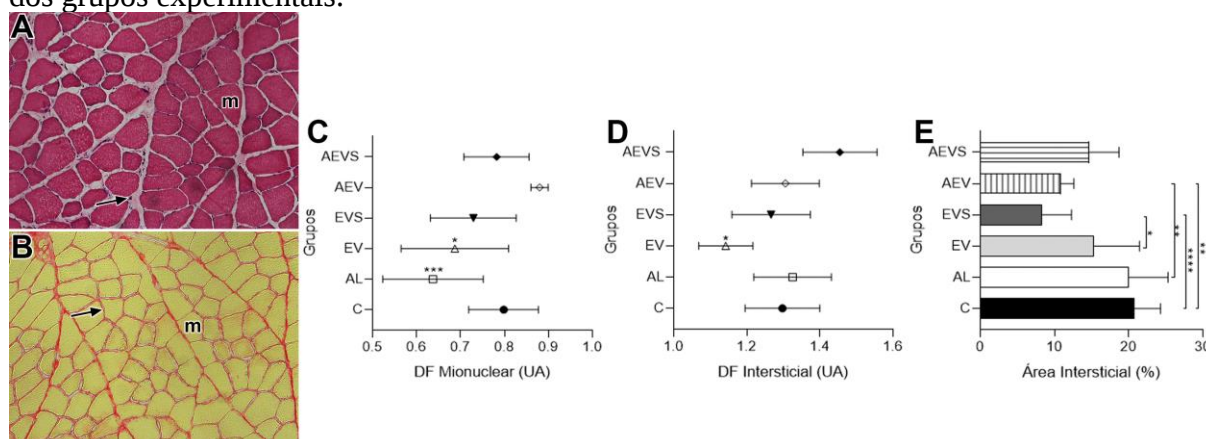
A análise de DF dos mionúcleos revelou que o grupo AL apresentou menor valor comparado aos grupos C, AEV ($p < 0,001$) e AEVS. O grupo EV revelou menor valor em relação aos grupos C, EVR e AEV. Além disso, o grupo EVS revelou menor valor que C e AEVS. O grupo AEV apresentou maior valor que C e AEVS. Já o grupo AEVS apresentou menor valor que o grupo C. Os dados que não foram indicados, não apresentaram diferenças estatísticas.

O interstício do ventre muscular do plantar foi evidenciado pela técnica de coloração de PSR (Figura 13B). Desta forma, foi possível observar a relação do endomísio, epimísio e perimísio com as fibras musculares.

A análise de DF intersticial revelou que o grupo AL apresentou maior valor que C e AEV, sem diferenças estatísticas. O grupo EV apresentou menor valor comparado aos grupos C ($p < 0,05$) e EVS ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo EVS revelou menor valor que AEVS, sem diferenças estatísticas. O grupo AEV apresentou menor valor em relação ao grupo AEVS e, ainda, o grupo AEVS demonstrou maior valor que C e AL, sem diferenças estatísticas (Figura 12D).

Sobre a área intersticial, os grupos AL, EV, EVS ($p < 0,0001$), AEV ($< 0,01$) e AEVS apresentaram redução comparado ao grupo C. Ainda, houve redução no grupo EVS em relação aos grupos EV ($p < 0,05$) e AEVS. O grupo AEV apresentou redução comparado aos grupos AL ($p < 0,01$) e AEVS, e aumento em relação a EV. O grupo AEVS revelou redução comparado com AL, sem diferenças estatísticas (Figura 13E).

Figura 13 – Microscopia de Luz do ventre muscular do plantar e análise de DF mionuclear dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: A: Secção transversal do músculo plantar corado com a técnica de HE, com destaque aos mionúcleos (seta) dispostos adjacentes às miofibras (m). Ampliação: 40X. B: Secção transversal do músculo plantar corado com a técnica de PSR, com destaque ao tecido conjuntivo associado - endomísio (seta) e as miofibras (m). Ampliação: 40X. C: Box-plot da dimensão fractal mionuclear, valor expresso em unidade arbitrária (UA). Dados tratados estatisticamente com a análise de variância One-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$: ***AL $\neq$ AEV ($p < 0,001$); *EV $\neq$ AEV ($p < 0,05$). D: Box-plot da dimensão fractal intersticial, valor expresso em unidade arbitrária (UA). Dados tratados estatisticamente com a análise de variância One-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$: *EV $\neq$ C, AEV ($p < 0,05$). E: Médias e desvios-padrões da área positiva do tecido conjuntivo associado, valor expresso em porcentagem (%). Dados tratados estatisticamente com a análise de variância One-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$: ****C $\neq$ EVS ($p < 0,0001$); **C $\neq$ AEV ($p < 0,01$); **AL $\neq$ AEV ($p < 0,01$); *EV $\neq$ EVS ($p < 0,05$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.5 ATPase Miofibrilar

Com a análise histoquímica de ATPase miofibrilar foi possível identificar os diferentes tipos miofibrilares e mensurar a área de secção transversa das fibras do músculo sóleo (Tipos I e IIx) e do plantar (Tipo I, IIa e IIx) nos grupos experimentais.

6.5.1 Área de Secção Transversa – Sóleo

Com auxílio da morfometria da área de secção transversa (AST) das fibras musculares dos Tipos I e II do sóleo, foi possível apresentar as diferenças entre os grupos experimentais (Figura 14).

O grupo AL apresentou redução de 2,21% ($p < 0,001$) e 16,33% ($p < 0,001$) na AST das fibras Tipo I e II, respectivamente, em relação ao grupo C.

Quando observamos os animais do grupo EV comparado ao C, houve aumento de 6,20% no Tipo I e 1,88% de redução no Tipo II, sem diferenças estatísticas. O grupo EVS revelou aumento nas fibras Tipo I de 20,17% e redução de 12,30% nas fibras Tipo II comparado ao grupo C, sem diferenças estatísticas.

Ainda em relação ao C, o grupo AEV apresentou aumento de 7,77% ($p<0,001$) nas fibras Tipo I e redução de 21,61% ($p<0,0001$) nas Tipo II. Já o grupo AEVS revelou aumento de 7,35% e de 15,81% ($p<0,0001$) nas Tipo I e II, respectivamente.

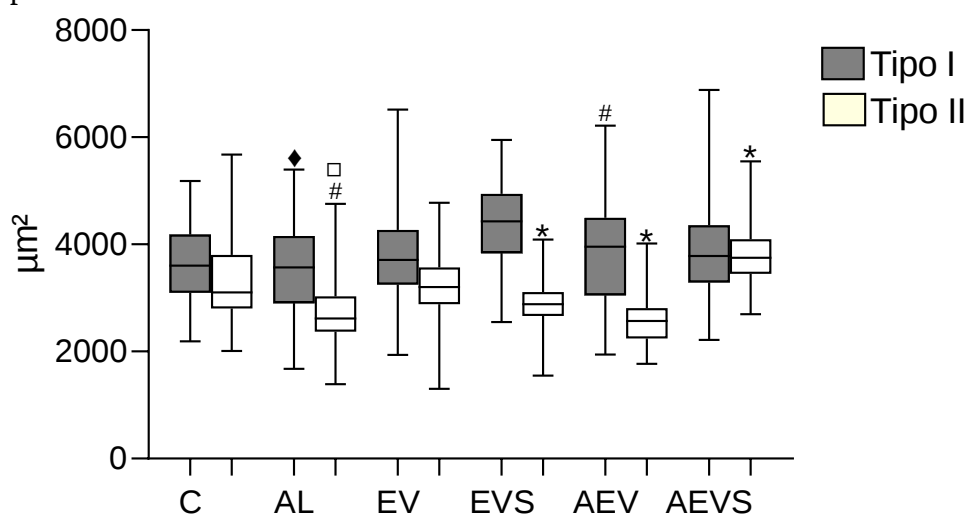
Houve aumento de 13,77% na AST das fibras Tipo I e redução de 10,62% ($p<0,0001$) nas Tipo II em EVS comparado ao EV.

As fibras Tipo I de AEV e AEVS revelaram aumento de 10,21% e de 9,78% na AST, respectivamente, quando comparada ao grupo AL, sem diferenças estatísticas. Por outro lado, as fibras Tipo II de AEV apresentaram redução de 6,31% ($p<0,05$), e 38,43% de aumento em AEVS.

Quando observamos AEV, é possível identificar aumento de 1,48% ($p<0,001$) nas fibras Tipo I e de 20,12% ($p<0,0001$) nas Tipo II em relação ao grupo EV. Além disso, AEVS revelou redução de 11,47% nas Tipo I e aumento de 24,27% ($p<0,0001$) nas Tipo II comparado aos animais do grupo EVS.

O grupo AEV revelou aumento de 9,78% na AST das fibras Tipo I, sem diferença estatística, e de 32,32% nas Tipo II ($p<0,0001$) em relação ao grupo AEVS.

Figura 14 – Box-plot da Área de Secção Transversa das fibras dos Tipos I e II do sóleo dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Área de secção transversa (μm^2) das fibras do músculo sóleo (dados tratados estatisticamente com a análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p<0,05$): Tipo I: *C $\neq$ AL ($p<0,01$); #AEV $\neq$ C, EV ($p<0,001$). Tipo II: #AL $\neq$ C $\square$ AL $\neq$ ATL ($p<0,05$); *EVS $\neq$ EV ($p<0,0001$); *AEV $\neq$ C, EV, EVS e AEVS ($p<0,0001$); *AEVS $\neq$ EVS ($p<0,0001$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com

Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.5.2 Área de Secção Transversa – Plantar

Com auxílio da morfometria da área de secção transversa (AST) das fibras musculares dos Tipos I, IIX e IIA do plantar, foi possível apresentar as diferenças entre os grupos experimentais (Figura 15).

O grupo AL apresentou aumento de 10,8% ($p<0,0001$), 18,2% ($p<0,05$) e 32% na AST das fibras Tipo I, IIX e IIA, respectivamente, em relação ao grupo C.

Quando observamos os animais do grupo EV comparado ao C, houve aumento de 38,9% ($p<0,0001$) no Tipo I e 42,2% no Tipo IIA, enquanto no Tipo IIX houve redução de 7,8% ($p<0,05$). O grupo EVS revelou aumento de 56,3% ($p<0,0001$), 34,5% ($p<0,05$) e 58,9% nas fibras Tipo I, IIX e IIA comparado ao grupo C.

Ainda em relação ao C, o grupo AEV apresentou aumento de 136,6% ($p<0,05$), 30,1% ($p<0,05$) e de 116,2% ($p<0,05$) nas fibras Tipo I, IIX e IIA. Já o grupo AEVS revelou aumento de 59,1% ($p<0,0001$) e 48,4% ($p<0,05$) nas fibras Tipo I e IIA, e redução de 0,8% nas Tipo IIX respectivamente.

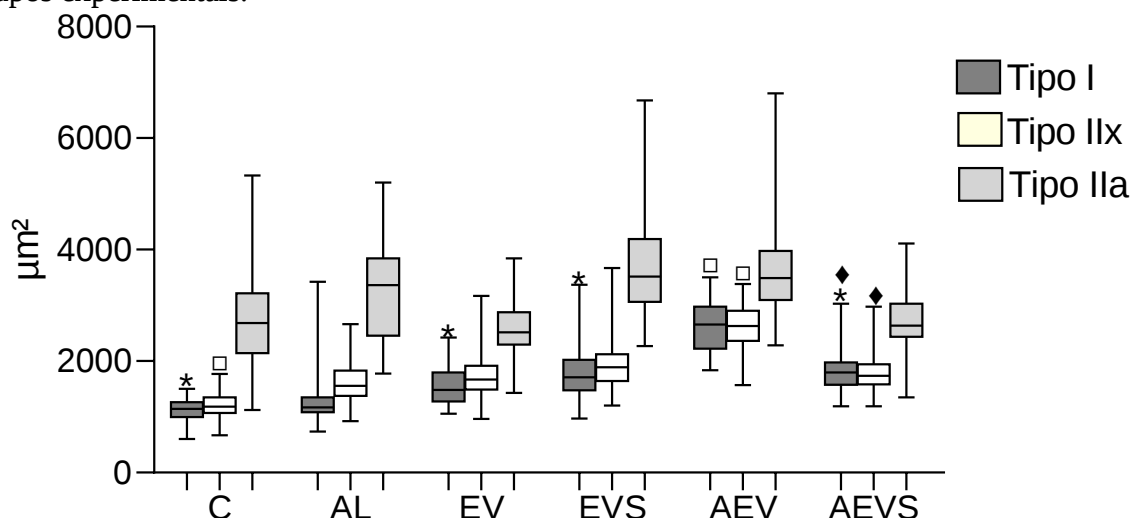
Houve aumento de 12,5% na AST das fibras Tipo I, 46% nas Tipo IIX e redução de 10,5% nas Tipo IIA do grupo EVS comparado ao EV, sem diferenças estatísticas.

As fibras Tipo I de AEV e AEVS revelaram aumento de 111,2% ($p<0,05$) e de 44,4% ($p<0,05$) na AST, respectivamente, quando comparada ao grupo AL. Por outro lado, as fibras Tipo IIX de AEV apresentaram aumento de 10% ($p<0,05$), e redução de 16,1% em AEVS. Ainda, as fibras Tipo IIA de AEV revelaram aumento de 63,7% e em AEVS houve aumento de 12,4%, sem diferenças estatísticas.

Quando observamos AEV, é possível identificar aumento de 67,5% ($p<0,05$) nas fibras Tipo I, de 41% ($p<0,05$) nas Tipo IIX e 52% nas Tipo IIA em relação ao grupo EV. Além disso, AEVS revelou aumento de 1,7% nas Tipo I, 26,3% nas Tipo IIX e 6,6% nas Tipo IIA, comparado aos animais do grupo EVS. Todos os dados não apresentaram diferenças estatísticas.

O alongamento prévio ao treinamento de escada vertical (AEV) demonstrou redução de 31,6% ($p<0,0001$) na AST das fibras Tipo I, e aumento Tipo IIX e IIA de 4% e 31,3% ($p<0,05$), respectivamente em relação ao grupo AEVS.

Figura 15 – Box-plot da Área de Secção Transversa das fibras dos Tipos I e II do sóleo dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Área de secção transversa (μm^2) das fibras do músculo plantar (dados tratados estatisticamente com a análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0,05$): Tipo I: *C $\neq$ AL, EV, EVS e AEVS ($p < 0,0001$); $\square$ AEV $\neq$ C, AL e EV ($p < 0,05$); *AEVS $\neq$ AL ($p < 0,01$); *AEVS $\neq$ AEV ($p < 0,0001$). Tipo II: $\square$ C $\neq$ AL, EV, EVS, AEV, AEVS ($p < 0,05$); $\square$ AEV $\neq$ AL e EV ($p < 0,05$); $\square$ AEVS $\neq$ AL e AEV ($p < 0,05$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.5.3 Densidade/Volume (%) – Sóleo

Com a análise esteriológica da Densidade/Volume (%) das fibras musculares do Tipo I e II do sóleo e do interstício, foi possível apresentar as diferenças entre os grupos experimentais submetidos ao alongamento estático e à diferentes protocolos de treinamento em escada vertical, concomitante ou não. A representação de proporção das fibras Tipo I, II e o interstício do sóleo estão ilustrados na Figura 16.

O músculo sóleo do grupo C apresentou ser composto por aproximadamente 61,4% por fibras Tipo I; 23,8% por fibras Tipo II e por 14,6% de interstício. Os animais do grupo AL apresentaram predominância de fibras Tipo I 10,42% maior que os animais do grupo C, as do Tipo II apresentaram predominância de 74,03% ($p < 0,0001$) menor, e o interstício de 76,08% ($p < 0,01$) maior, também comparado aos animais do grupo C.

Ainda, AL apresentou predominância de 15,58% maior nas fibras de Tipo I, 60,24% menor nas Tipo II e 8,95% maior no interstício em relação ao grupo EV. Entre AL e EVS, a diferença da predominância das fibras Tipo I foi de 6,55% menor, nas Tipo II 82,14% menor e no interstício de 7,6% menor.

Os animais do grupo EV revelaram redução na predominância das fibras Tipo I em 3,33% e em 48,40% ($p<0,01$) nas Tipo II, enquanto no interstício a predominância foi 92% ($p<0,001$) maior em relação aos animais do grupo C.

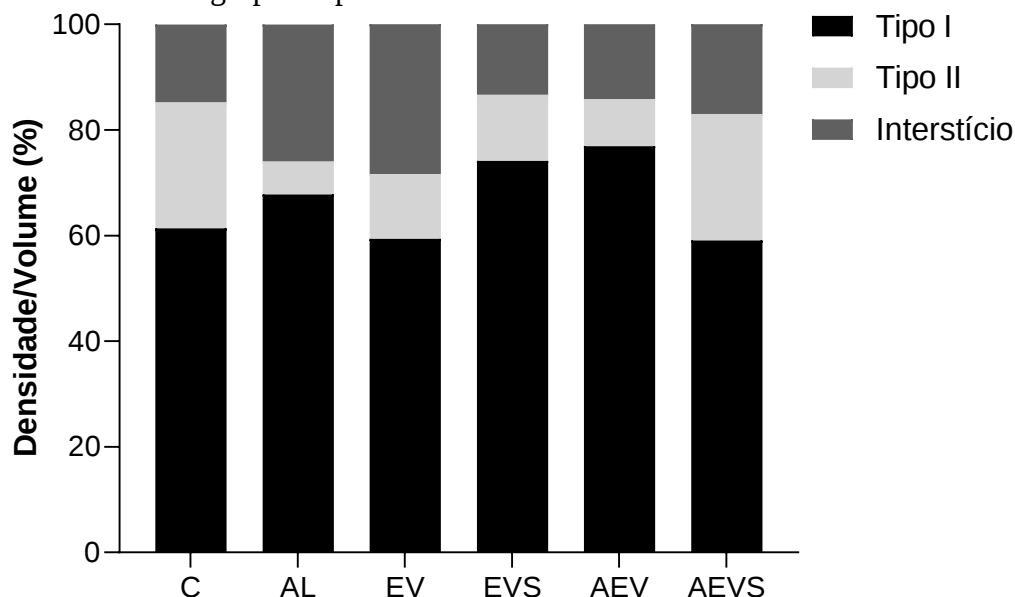
O grupo EVS apresentou predominância de fibras de Tipo I em 20,76% ($p<0,001$) maior que o grupo C, enquanto as fibras Tipo II apresentaram predominância de 47,48% menor ao C, sem diferenças estatísticas. Por outro lado, o interstício revelou predominância de aproximadamente 9,9% menor que C. Quando comparamos o grupo EVS com EV, é possível observar que as fibras Tipo I apresentaram predominância de 24,91% ($p<0,001$) maior, enquanto as Tipo II revelaram valor semelhante. Em relação ao interstício desses grupos, o treinamento resistido com sobrecarga revelou redução de 53,03% ($p<0,001$).

O AEV revelou aumento de 13,45% nas fibras Tipo I e de 43,45% nas fibras Tipo II, enquanto a predominância do interstício foi de 45,40% menor quando comparado ao grupo AL. Todos os valores não apresentaram diferença estatística. Quando analisamos a composição (%) das fibras do grupo AEV com a do grupo EV, podemos observar aumento de 22,84% nas do Tipo I, enquanto, nas Tipo II e no interstício houve redução de 27,8% e de 49,9%, respectivamente, sem nenhuma diferença estatística.

O grupo AEVS apresentou aumento de 12,8% ($p<0,05$), 286,2% ($p<0,001$) e 34,6% ($p>0,9999$) na predominância das fibras Tipo I, Tipo II e no interstício, respectivamente, quando comparado ao grupo AL. E, comparado ao grupo EVS, houve redução de 20,7% ($p<0,0001$) nas fibras Tipo I, aumento de 47,2% nas fibras Tipo II ($p<0,001$) e aumento de 27,6% no interstício.

Quando o AEVS é comparado ao AEV, é possível verificar que a predominância das fibras Tipo I apresentaram redução de 23,1% ($p<0,0001$), houve 169,2% ($p<0,001$) de aumento na predominância das fibras Tipo II e de 19,7% no interstício, sem diferença estatística.

Figura 16 – Médias da análise de Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, II e interstício do sóleo dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Composição (%) dos tipos miofibrilares e interstício do músculo sóleo (dados tratados estatisticamente com análise de variância ANOVA Two-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$): Tipo I: C $\neq$ EVS ($p < 0,001$); C $\neq$ AEV ($p < 0,0001$); AL $\neq$ AEVS ($p < 0,05$); EV $\neq$ EVS ($p < 0,001$); EV $\neq$ AEV ($p < 0,0001$); EVS $\neq$ AEVS ($p < 0,0001$); AEV $\neq$ AEVS ($p < 0,0001$). Tipo II: C $\neq$ AL ($p < 0,0001$); C $\neq$ EV ($p < 0,01$); C $\neq$ EVS ($p < 0,01$); C $\neq$ AEV ($p < 0,0001$); AL $\neq$ AEVS ($p < 0,0001$); EVS $\neq$ AEVS ($p < 0,05$); AEV $\neq$ AEVS ($p < 0,001$). Interstício: C $\neq$ AL ($p < 0,01$); C $\neq$ EV ($p < 0,001$); AL $\neq$ AEV ($p < 0,05$); EV $\neq$ EVS ($p < 0,05$); EV $\neq$ AEV ($p < 0,01$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.5.3 Densidade/Volume (%) – Plantar

Com a análise esteriológica da Densidade/Volume (%) das fibras musculares do Tipo I, IIx e IIa do plantar e do interstício, foi possível apresentar as diferenças entre os grupos experimentais submetidos ao alongamento estático e à diferentes protocolos de treinamento em escada vertical, concomitante ou não (Figura 17).

O grupo C apresentou ser composto por aproximadamente 3% por fibras Tipo I; 75% por fibras Tipo IIx; 6% por fibras Tipos IIa e 16% de interstício. Os animais do grupo AL apresentaram predominância de fibras Tipo I 77,3% maior que os animais do grupo C, as do Tipo IIx apresentaram predominância de 9,3% ($p < 0,01$) menor, Tipo IIa de 59,4% maior e o interstício de 7,5% maior, também comparado aos animais do grupo C.

Os animais do grupo EV revelaram aumento na predominância das fibras Tipo I em 166,4%, em 233,3% ($p < 0,0001$) nas Tipo IIa, enquanto nas Tipo IIx a predominância foi de 13,8% ($p < 0,0001$) e no interstício 53,4% ($p < 0,01$) menor em relação aos animais do grupo C.

O grupo EVS apresentou predominância de fibras de Tipo I em 238,8% ($p < 0,05$) maior que C, as fibras Tipo IIx apresentaram predominância de 28,6% ($p < 0,0001$) menor, as fibras Tipo IIa revelaram predominância 327,7% ($p < 0,0001$) maior comparado a C. Por outro lado, o interstício revelou predominância de aproximadamente 31,4% menor que C, sem diferenças estatísticas.

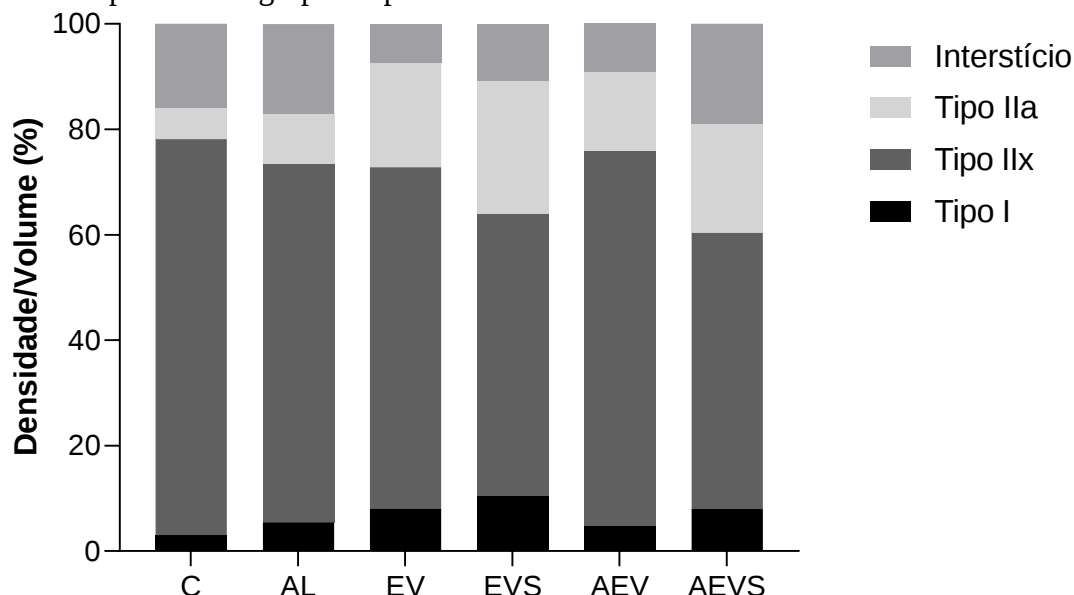
Quando comparamos o grupo EVS com EV, é possível observar que as fibras Tipo I e IIa apresentaram predominância de 27,2% e 27,3% maior, enquanto as Tipo IIx revelaram redução de 17,2% ($p < 0,0001$). Em relação ao interstício desses grupos, o treinamento resistido com sobrecarga revelou aumento de 47,3% ($p < 0,001$), sem diferenças estatísticas.

O grupo AEV revelou redução de 12,2% nas fibras Tipo I e de 46,8% no interstício quando comparado ao grupo AL. Já as fibras Tipo IIx e IIa apresentaram predominância de 4,5% e 58,7% maior. Quando analisamos a composição (%) das fibras do grupo AEV com a do grupo EV, podemos observar redução de 41,6% e de 24% nas do Tipo I e IIa, respectivamente, enquanto, nas Tipo IIx e no interstício houve aumento de 10,1% e de 23% ($p < 0,001$), respectivamente.

O grupo AEVS apresentou aumento de 48% e de 11,1% na predominância das fibras Tipo I e no interstício, respectivamente sem diferenças estatísticas, quando comparado ao grupo AL. Ainda, as fibras do Tipo IIx e IIa revelaram redução de 23% ($p < 0,0001$) e de 15,3% ($p < 0,001$). E, comparado ao grupo EVS, houve redução de 22,5% nas fibras Tipo I, de 2,2% nas Tipo IIx, aumento de 84,3% nas fibras Tipo IIa e de 75% ($p < 0,001$) no interstício.

Quando o AEVS é comparado ao AEV, é possível verificar que a predominância das fibras Tipo I, IIx e IIa apresentaram redução de 68,7%, 27% ($p < 0,001$) e 73,7% na predominância das fibras Tipo I, IIx e IIa, respectivamente, e o interstício apresentou aumento de 109,7% ($p < 0,001$).

Figura 17 – Médias da análise de Densidade/Volume (%) das fibras dos Tipos I, IIx, IIa e interstício do plantar dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Composição (%) dos tipos miofibrilares e interstício do músculo plantar (dados tratados estatisticamente com análise de variância ANOVA Two-way com pós teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$). Tipo I: C≠EVS ($p < 0,05$). Tipo IIx: C≠AL ($p < 0,01$); C≠EV, EVS e AEVS ($p < 0,0001$); AL≠AEVS ($p < 0,0001$); EV≠EVS ($p < 0,0001$); AEV≠AEVS ($p < 0,0001$). Tipo IIa: C≠EV, EVS e AEVS ($p < 0,0001$); C≠AEV ($p < 0,01$); AL≠AEVS ($p < 0,0001$). Interstício: C≠EV ($p < 0,01$); C≠AEV ($p < 0,05$); AL≠AEV ($p < 0,001$); EVS≠AEVS ($p < 0,001$); AEV≠AEVS ($p < 0,001$). C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.6 Junção Neuromuscular

Revelamos alterações nas regiões pós-sinápticas dos músculos sóleo (Figura 18) e plantar (Figura 19) por meio das análises morfométricas após 8 semanas de protocolos de alongamento e treinamento em escada vertical, combinados ou não.

6.6.1 Junção Neuromuscular – Sóleo

A região pós-sináptica do músculo sóleo do grupo AL apresentou redução de 8,74% na área total e de 40,49% na área corada em relação ao grupo C. Quando avaliamos o perímetro total e corado da placa motora final destes grupos, houve redução de 1,98% e 9,48%, respectivamente. A dispersão e o diâmetro máximo revelaram redução de 30,30% e de 9,32%. O número de clusters de AL foi 40% menor que C. Ainda, o índice de fragmentação do grupo C foi de 0,7 e do grupo AL de 0,55.

O grupo EV em relação ao C apresentou redução de 36,78% ($p < 0,05$) da área total e de 68,67% ($p < 0,0001$) da área corada. Houve redução de 20,35% e 32,33% no perímetro total e corado, respectivamente, estatisticamente sem diferença. Além disso, a dispersão da placa final apresentou redução de 51,93% ($p > 0,001$) e o diâmetro redução em 11,52%, sem diferença estatística. Não houve diferença entre número de clusters, e o índice de fragmentação do grupo EV foi de 0,69.

Os animais do grupo EVS revelaram redução de 1,64% na área total e de 13,75% na área corada quando comparado ao C. Em contrapartida, o perímetro total, perímetro corado, dispersão e número de clusters revelaram, respectivamente, redução de 9,15%, 10,62%, 7,10% e 6,8%. Também, houve redução no diâmetro pós-sináptico de 6,44%. O índice de fragmentação de EVS foi de 0,64. Todos os resultados não apresentaram diferenças estatísticas.

Além disso, a área total do grupo AEV em relação ao C apresentou 9,95% menor, enquanto a área corada 16,20% maior. O perímetro total, a dispersão, o diâmetro da placa motora final e o número de clusters também revelaram redução de 4,81%, 27,40%, 0,96% e 3,4%, respectivamente. O perímetro corado revelou aumento de 7,17%. O índice de fragmentação de AEV foi de 5,7. Estes resultados não apresentaram diferenças estatísticas.

O grupo AEVS comparado ao C não apresentaram diferenças estatísticas nas suas variáveis, porém, redução na área total e corada, e no perímetro total e corado de, respectivamente: 22,21%, 19,35%, 20,90% e 9,35%. Já a dispersão da placa motora foi 7,85% maior e o diâmetro 11,55% menor. Quando observamos o número de clusters, houve redução de 33,9%, e o índice de fragmentação de AEVS foi de 3,9%. Todos os resultados não apresentaram diferenças estatísticas.

O grupo EVS revelou aumento de 55,56% ($p > 0,05$); 175,3% ($p > 0,01$); 14,06% e 32,08% na área total e corada, e no perímetro total e corado, respectivamente, em relação ao grupo EV. Ainda entre estes dois grupos, houve aumento de 93,28% na dispersão da placa total e de 5,75% no diâmetro. Houve redução de 6,8% no número de clusters. Não houve diferenças estatísticas.

O grupo AEV comparado ao AL revelou redução de 1,31%, 2,90% e 8,13% na área total, perímetro total e diâmetro, respectivamente, sem apresentar diferenças estatísticas. Enquanto, a área corada, perímetro corado, dispersão da placa final e número de clusters apresentaram aumento de 95,26% ($p < 0,001$), 18,42%, 82,79% ($p < 0,0001$) e 62,8%, respectivamente.

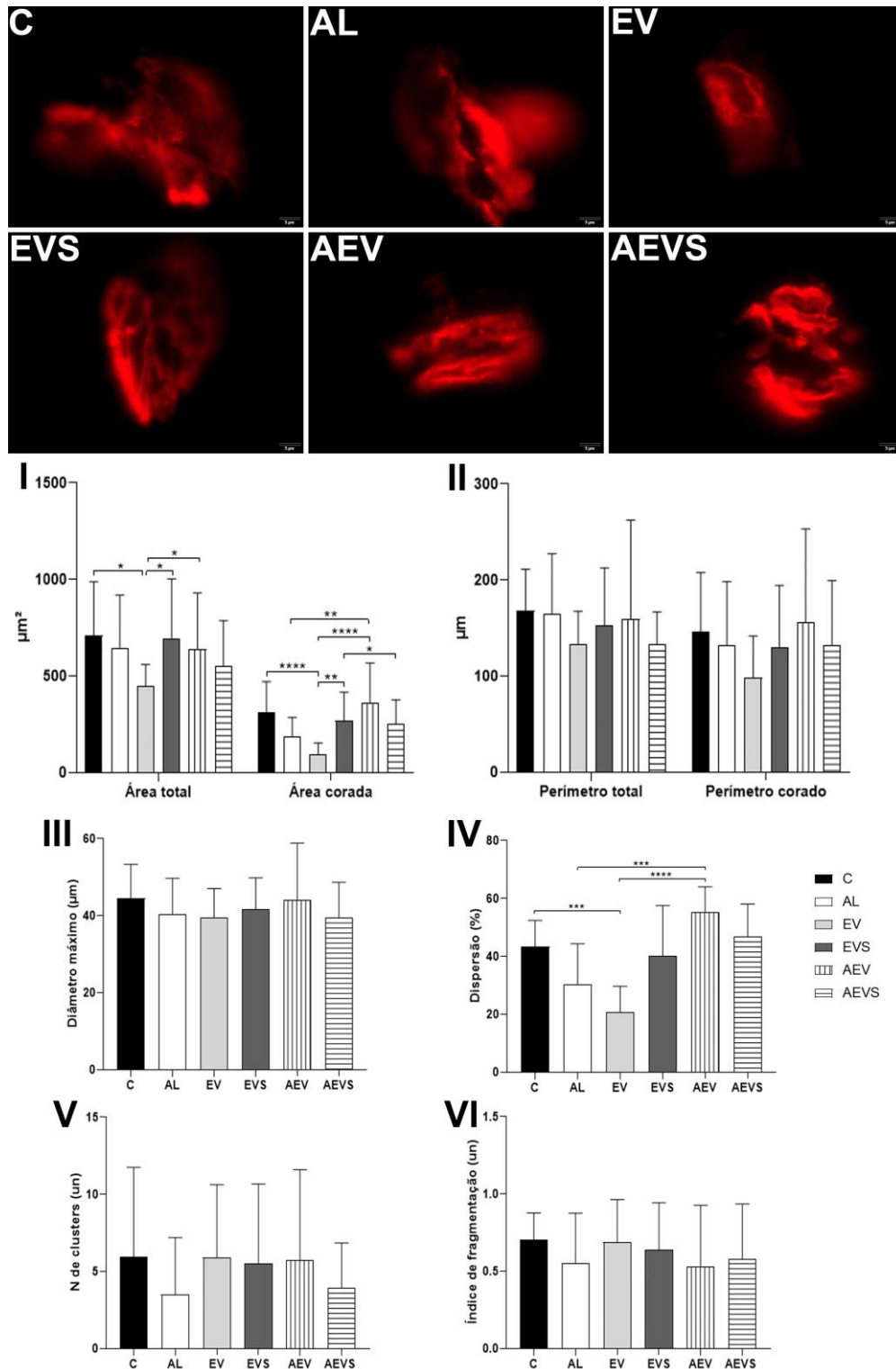
Os animais do grupo AEVS, em relação ao AL, apresentaram diminuição na área total de 14,74% e aumento de 35,52% na área corada. Foi possível observar redução de 19,28% no perímetro total, aumento de 0,151% no perímetro corado e redução de 17,96% no diâmetro. Todos os resultados não são estatisticamente diferentes. Por outro lado, a dispersão e o número de clusters entre esses dois grupos revelou aumento em 54,73% ($p < 0,001$) e em 11,4%, sem diferença estatística.

Quando comparado o grupo AEV ao EV, é possível observar a área corada e total com aumento de 270,93% ($p > 0,0001$) e 42,43%, sem diferença estatística, respectivamente. O perímetro total e corado revelou aumento de 19,5% e 58,4%, respectivamente, também sem diferenças estatísticas. E ainda, a dispersão da placa final revelou aumento de 165,07% ($p > 0,0001$) e o diâmetro aumento de 11,94%, sem diferença estatística. Houve redução de 3,4% no número de clusters, sem diferença estatística.

A área total e corada, o perímetro total, bem como o diâmetro da placa final e o número de clusters do grupo AEVS apresentaram redução de 20,93%; 6,49%; 12,92%, 5,46% e 29,1%, respectivamente, quando comparado com o grupo EVS. Além disso, o perímetro corado e a dispersão revelaram aumento de 1,42% e 16%, respectivamente, sem diferenças estatísticas.

Quando o grupo AEVS é comparado com o AEV, é possível observar redução na área total e corada, perímetro total e corado, na dispersão da placa final, no diâmetro e no número de clusters, respectivamente de: 13,61%; 30,59%, 16,89%, 15,42%, 15,35%, 10,70% e 31,6%, sem nenhuma diferença estatística entre as variáveis.

Figura 18 – Médias e desvios-padrões dos componentes da fenda pós-sináptica do músculo sóleo.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: I: Média e desvio padrão da área total e corada da região pós-sináptica do sóleo de todos os grupos experimentais expresso em micrômetro quadrado (μm^2), área total: *C $\neq$ EV ($p<0,05$); *EV $\neq$ EVS e AEV ($p<0,05$); área corada: ****C $\neq$ EV ($p<0,0001$); **EV $\neq$ EVS ($p<0,01$); AL $\neq$ AEV ($p<0,01$) e ****EV $\neq$ AEV ($p<0,0001$). II: Média e desvio padrão do perímetro total e corado da região pós-sináptica do sóleo de todos os grupos experimentais expresso em micrômetro (μm). III: Média e desvio padrão da dispersão da região pós-sináptica do sóleo de todos os grupos experimentais expresso em porcentagem (%) ***C $\neq$ EV ($p<0,001$); ****EV $\neq$ AEV ($p<0,0001$) e ***AL $\neq$ AEV ($p<0,001$). IV: Média e desvio padrão do diâmetro máximo da região pós-sináptica do

sóleo de todos os grupos experimentais expresso em micrômetro (μm). V: Média e desvio padrão do número de clusters da região pós-sináptica do sóleo de todos os grupos experimentais expresso em unidade (un). VI: Média e desvio padrão do índice de fragmentação da região pós-sináptica do sóleo de todos os grupos experimentais expresso em unidade (un) Dados tratados estatisticamente com análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0,05$. C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

6.6.2 Junção Neuromuscular – Plantar

O perímetro total, perímetro corado e o número de clusters demonstraram aumento de 41,70% ($p < 0,05$), 23,67% e 121% estatisticamente sem diferenças. Ainda, houve redução de 5,50% na dispersão da placa final e aumento de 0,54% no diâmetro, também sem diferenças estatísticas. O grupo C apresentou índice de fragmentação de 0,66, enquanto AL de 0,73.

O grupo EV em relação ao C apresentou aumento de 16,79% da área total e de 29,24% na área corada, sem diferenças estatísticas. Houve aumento de 21,40% no perímetro total e redução de 30,51% no perímetro corado, sem nenhuma diferença estatística entre as variáveis. A dispersão e o diâmetro da placa final apresentaram aumento de 7,69% e 5,49%, respectivamente. Além disso, houve redução de 26,3% no número de clusters. O índice de fragmentação de EV foi de 0,35.

Em contrapartida, os animais do grupo EVS revelaram aumento de 29,12% na área total, de 48,10% ($p < 0,05$) na área corada e de 65,8% no número de clusters em relação aos animais do grupo C. Revelaram ainda, aumento de 30,38% e 23,40%, respectivamente, no perímetro total e corado, sem diferença estatística. A dispersão da placa motora final apresentou aumento de 15,80% sem diferença estatística, ainda comparado entre os dois grupos. Ainda, o diâmetro, por sua vez, revelou aumento de 9,11%. EVS apresentou índice de fragmentação de 0,7.

A área total do grupo AEV em relação ao C apresentou 15,78% menor, enquanto a área corada 3,22%. O perímetro total e corado da placa motora final, inclusive o diâmetro e o número de clusters também revelaram redução: 10,98%, 24,89%, 16,34% e 39,5%, respectivamente. Por outro lado, a dispersão apresentou-se 16,21% maior. Todos os resultados não apresentaram diferenças estatísticas. O índice de fragmentação de AEV foi de 0,3.

O grupo AEVS apresentou a área total 16,36% menor comparado ao grupo C, enquanto a área corada apresentou aumento de 9,96%. O perímetro total e corado revelou 9% e 1,31% maior, com nenhuma diferença estatística. A dispersão da placa total revelou 27,07%

($p < 0,05$) maior, enquanto o diâmetro e o número de clusters apresentaram redução em 8,89% e 2,6%, respectivamente. Todos os resultados, exceto a dispersão, não apresentaram diferenças estatísticas. O índice de fragmentação de AEVS foi de 0,5.

Os animais do grupo EVS revelaram aumento na área corada e total de, respectivamente, 10,55% e 14,60% em relação a EV. Ainda entre estes dois grupos, houve aumento de 7,40% e 43,55% no perímetro total e corado, respectivamente. A dispersão da placa total apresentou aumento de 7,54%, o diâmetro de 3,44% e o número de clusters de 125%, sem diferenças estatísticas em todas as variáveis.

Os animais do grupo AEV, em relação ao AL, apresentaram redução na área total e corada, no perímetro total e corado de, respectivamente, 18,40% 6,01% 37,17% ($p > 0,01$) e 39,28% ($p > 0,01$). Além disso, a dispersão foi 18,69% maior e o diâmetro da placa final foi 16,80% menor, sem diferenças estatísticas.

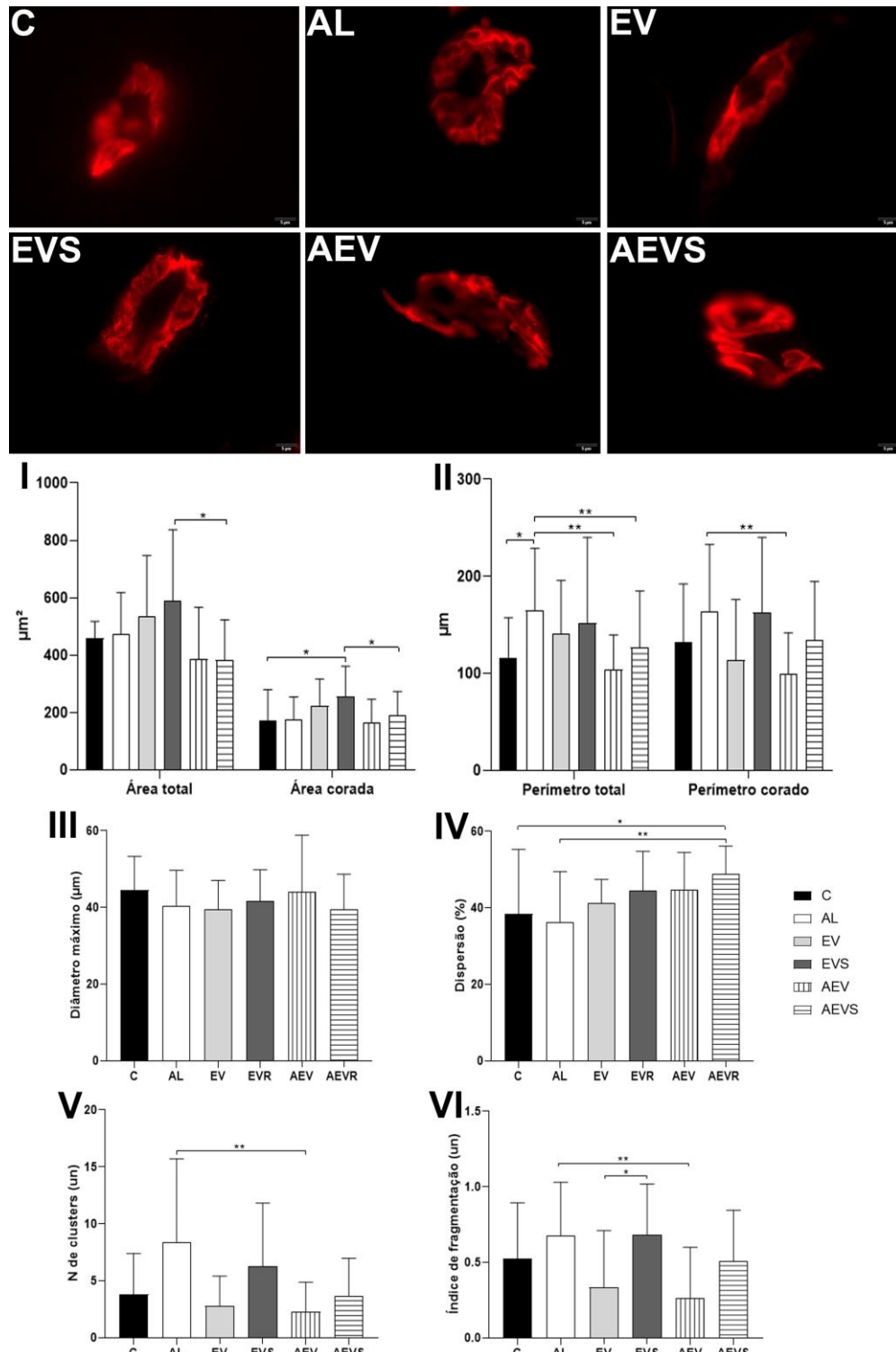
O grupo AEVS comparado ao AL revelou redução de 18,94%, 23,07% ($p < 0,01$), 18,11%, 9,39% e 72,6% ($p < 0,01$) da área total, do perímetro total e corado, do diâmetro da placa total e do número de clusters, respectivamente. Além disso, a área corada e a dispersão revelaram aumento de 6,88% e 25,01% ($p < 0,05$), respectivamente.

No entanto, quando comparado o grupo AEV ao EV, a área corada e total apresentou respectivamente aumento de 270,93% ($p < 0,0001$) e de 42,43%, sem diferenças estatísticas. O perímetro total e corado demonstrou redução de 16,32% e 38,05%, respectivamente. A dispersão da placa final revelou aumento de 7,93% e não demonstrou diferença estatística. E ainda, o diâmetro da placa motora final e o número de clusters apresentaram redução de 20,70% ($p < 0,05$) e de 17,9% em sua morfometria, respectivamente.

A área total e corada do grupo AEVS apresentou redução de 35,22% ($p < 0,001$) e 25,75% em relação ao EVS, respectivamente. O perímetro corado, o diâmetro e o número de clusters revelaram redução de 17,90%, 16,43% e 41,3%, respectivamente, enquanto a dispersão da placa final apresentou aumento de 9,73%, sem diferenças estatísticas.

Quando o grupo AEVS é comparado com o AEV, é possível observar redução de apenas 0,68% na área total e aumento de 13,62% na corada. O perímetro total e corado apresentou redução, respectivamente de: 16,40% e 34,86%, sem nenhuma diferença estatística. Enquanto a dispersão, o diâmetro e o número de clusters revelaram aumento de 9,34%, 8,92% e 60,9%, respectivamente, sem diferenças estatísticas.

Figura 19 – Médias e desvios-padrões dos componentes da fenda pós-sináptica do músculo plantar.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: I: Média e desvio padrão da área total e corada da região pós-sináptica do plantar de todos os grupos experimentais expresso em micrômetro quadrado (μm²), área total: ***EVS≠AEVS (p<0,001); área corada: *C≠EVS (p<0,05) e EVS≠AEVS (p<0,05). II: Média e desvio padrão do perímetro total e corado da região pós-sináptica do plantar de todos os grupos experimentais expresso em micrômetro (μm), perímetro total: *C≠AL (p>0,05); **AL≠AEV e AEVS (p<0,01); perímetro corado: **AL≠AEVS (p<0,01). III: Média e desvio padrão da dispersão da região pós-sináptica do plantar de todos os grupos experimentais expresso em porcentagem (%) *C≠AEVS (p<0,05) e **AL≠AEVS (p<0,01). IV: Média e desvio padrão do diâmetro máximo da região pós-

sináptica do plantar de todos os grupos experimentais expresso em micrômetro (μm). V: Média e desvio padrão do número de clusters da região pós-sináptica do plantar de todos os grupos experimentais expresso em unidade (un) $**\text{AL} \neq \text{AEV}$ ($p < 0,01$). VI: Média e desvio padrão do índice de fragmentação da região pós-sináptica do plantar de todos os grupos experimentais expresso em unidade (un) $*\text{EV} \neq \text{EVR}$ ($p < 0,05$) e $**\text{AL} \neq \text{AEV}$ ($p < 0,01$). Dados tratados estatisticamente com análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0,05$. C: Controle; AL: Alongamento; EV: Escada Vertical; EVS: Escada Vertical com Sobrecarga; AEV: Alongamento + Escada Vertical; AEVS: Alongamento + Escada Vertical com Sobrecarga.

7 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelam os efeitos de duas modalidades de exercício físico em modelo experimental, e avaliamos as respostas resultantes do alongamento estático isolado e prévio aos treinamentos nas análises de massa corporal e muscular, análises funcionais, morfológicas e morfométricas do ventre muscular e da região pós-sináptica da junção neuromuscular.

7.1 Análise Funcional

Apesar do alongamento prévio ao exercício físico promover a redução de lesões no tecido muscular, alguns estudos revelam efeitos contraditórios na performance esportiva (KAY; BLAZEVOICH, 2012). Em parte, esses efeitos contraditórios podem ser explicados de acordo com o tipo de exercício e a população.

O alongamento é sugerido como uma medida para prevenção de lesões em esportes que envolvem habilidades explosivas com movimentos máximos de alongamento-encurtamento muscular, uma vez que requerem uma unidade músculo-tendão que armazene e libere grande quantidade de energia elástica (WITVROUW et al., 2004).

Por outro lado, Fowles, Sale e Macdougall (2000) relataram que, provavelmente, a redução da capacidade de geração e ativação de força muscular após o alongamento passivo, diminua por até 1h a força máxima voluntária dos flexores plantares.

Algumas publicações mais recentes destacaram um efeito de dose-resposta no alongamento estático, onde durações mais longas de alongamento (≥ 60 s) repercute em implicações negativas no desempenho do atleta, principalmente quando o teste de performance é realizado minutos após o alongamento (BEHM; CHAOUACHI, 2011; KAY; BLAZEVOICH, 2012).

Estudos sugerem que a inclusão de exercícios de flexibilidade prévios ao treinamento resistido podem influenciar diretamente na produção de força (KOKKONEN; NELSON; CORNWHEEL, 1998; LEITE et al., 2015), este fenômeno é denominado de déficit de força induzido por alongamento (*stretching-induced force deficit*) (SIMIC et al., 2013).

Nossos resultados mostram que o alongamento estático prévio ao treinamento resistido parece ter impacto negativo na produção de trabalho, visto que o trabalho do grupo AEVR foi 40% menor no T_{CMC} que o treinamento resistido isolado. Em geral, quantificar o trabalho

realizado é uma forma de estimar a dose de estímulo imposta aos músculos-alvo em treinamentos focados na hipertrofia muscular (NUNES et al., 2021).

É importante destacar que o T_{CMC} (pré e pós) foi executado apenas pelos grupos submetidos aos treinamentos com sobrecarga extra, de forma a evitar alterações morfológicas agudas causadas por este teste nos grupos que não estavam acostumados a volumes maiores de treinamento.

Simão *et al.* (2011) avaliaram os ganhos de força após 16 semanas de treinamento resistido e de flexibilidade, isolados e combinados, e houve aumento de força em ambos os grupos, porém o aumento significativo foi no treinamento isolado.

As sessões de alongamento estático antes do treinamento resistido reduzem o número de repetições e o volume total de treinamento e, consequentemente, a hipertrofia muscular é atenuada (BARROSO et al., 2012; MORIGGI JUNIOR et al., 2017). A implicação prática da não execução do alongamento prévio é menor duração das sessões, o que pode melhorar a aderência ao exercício, visto que o tempo é uma barreira percebida para a prática de atividade física (NUZZO, 2019).

Podemos observar que houve redução no tempo de subida da escada vertical durante o período de treinamento, e isto pode estar relacionado com o processo de aprendizagem dos animais (KRAUSE NETO et al., 2016). Além disso, os animais que executaram o treinamento em escada vertical sem sobrecarga apresentaram uma média de 6 movimentos para completar a subida, por outro lado, a média dos animais com sobrecarga foi de 8 movimentos. Segundo Hornberger e Farrar (2004), a média dos movimentos na subida em escada vertical em modelo experimental é de 8 a 12, considerando as mesmas dimensões usadas no presente estudo.

7.2 Massa corporal e muscular

A massa corporal dos animais apresentou diferenças entre os grupos experimentais na primeira semana (C>AL, EV, EVS, AEV e AEVS) e na última semana (C>AL, EV, EVS, AEV e AEVS). As diferenças nos valores das massas corporais iniciais entre os grupos podem acontecer devido a variáveis como ninhadas diferentes mesmo que seja mesma linhagem e idade (KRAUSE NETO et al., 2017). É importante ressaltar que as diferenças anatômicas, fisiológicas, biológicas e de desenvolvimento devem ser levadas em consideração ao realizar um experimento e analisar seus resultados (QUINN, 2005).

A massa corporal dos grupos submetidos às intervenções (concomitante ou não) apresentaram menor valor que grupo Controle. Os protocolos de treinamento reduziram a massa corporal desses animais e, apesar de não avaliado, o apetite provavelmente também foi reduzido, de forma que os animais consumiram menos calorias diárias durante o período de intervenção (DESCHENES et al., 2015). De maneira geral, o exercício físico melhora a saciedade em razão do aumento da sensibilidade pós-prandial aos nutrientes ingeridos consumidos nas refeições (BLUNDELL et al., 2015).

É possível observar no presente estudo, que os dados de massa corporal dos animais submetidos ao alongamento não apresentaram diferenças estatísticas, comparado aos seus respectivos controles. Estudos com o protocolo de alongamento (3x/semana) em modelo experimental também não apresentaram diferenças estatísticas na massa corporal dos animais comparados aos respectivos grupos controles, inclusive em ratas idosas (COUTINHO et al., 2004; ZOTZ et al., 2016).

Por outro lado, o exercício físico é responsável pela diminuição da gordura corporal e manutenção/aumento da massa muscular (LEE et al., 2009). O treinamento resistido executado com frequência de dois a três dias não consecutivos por semana pode promover ganho de 1,4kg de massa muscular e redução de 1,8kg de gordura corporal em humanos, ao longo de 10 semanas de treinamento (HAGERMAN et al., 2000; WESTCOTT et al., 2009; WESTCOTT, 2012).

Além disso, como uma resposta aguda, o dano muscular causado pelo treinamento resistido requer maior energia para o processo de remodelamento tecidual até 72 horas após a sessão (CLARKSON; HUBAL, 2002; WESTCOTT, 2012). Dessa forma, o treinamento resistido é altamente recomendado como intervenção no tratamento da obesidade e doenças metabólicas (STRASSER; SCHOBERSBERGER, 2011).

A MM tem sido amplamente utilizada como parâmetro na avaliação da hipertrofia muscular em modelos experimentais (LOURENÇO et al., 2020). Porém, a MM e AST não estão necessariamente relacionadas diretamente, segundo Damas *et al.* (2016) deve-se considerar o edema induzido pelo inchaço muscular ao avaliar a hipertrofia deste tecido após o treinamento resistido.

É possível observar que o músculo sóleo e plantar não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais submetidos ao treinamento em escada vertical sem o alongamento prévio (entre EV e EVR). Deschenes *et al.* (2015) e Hornberger e Farrar (2004) apresentaram dados sobre a MM do sóleo e do plantar onde não há aumento após 6 e 8 semanas, respectivamente, de treinamento em escada vertical resistido. Por outro lado, em

outros trabalhos a MM do sóleo foi significativamente maior após 12 (GRANS et al., 2014) e 20 semanas de treinamento (LEE; HONG; KIM, 2016).

Ainda, uma meta-análise publicada comparou as alterações na força e hipertrofia muscular entre protocolos de treinamento resistido de baixa e de alta intensidade, e os dados indicam que houve hipertrofia muscular entre as duas condições de intensidade (SCHOENFELD et al., 2017).

O plantar revelou diferença estatística em sua massa entre AEV e AEVS. Neste caso, o músculo treinado sem sobrecarga pesou menos que o músculo treinado com sobrecarga. Segundo Westcott (2012), o aumento da massa muscular é resultado do aumento de proteína muscular estimulado pelo treinamento com sobrecarga.

Segundo uma meta-análise sobre o treinamento de escada vertical em roedores elaborada por Lourenço *et al.* (2020), podemos hipotetizar que os diferentes resultados de massa muscular encontrados no sóleo e plantar são derivados da resposta à carga de treinamento que cada músculo apresenta, onde alguns apresentarão hipertrofia apenas diante de volumes treinamentos maiores.

7.3 Dimensão Fractal

Utilizamos a técnica de análise de DF como um método eficaz em avaliar os mionúcleos e o tecido conjuntivo do músculo esquelético de ratos treinados em diferentes modalidades de escada vertical, combinado ou não com o alongamento estático prévio. No músculo sóleo, esta análise indicou maior valor no grupo AEV, enquanto no plantar o maior valor foi encontrado em AL. Gdynia *et al.* (2009) utilizaram a análise de DF para detectar anormalidades musculares em pacientes com doenças neuromusculares.

Segundo Korolj *et al.* (2019), as geometrias fractais podem ser descritas como estruturas que apresentam padrões auto-semelhantes infinitamente iterativos (i.e. repetitivos) e, sua forma de organização em estruturas complexas, pode ser quantificada com o parâmetro de dimensão fractal. Além disso, outras definições para a DF também foram desenvolvidas, como a dimensão de contagem de caixa e a dimensão de similaridade, porém todas elas compartilham deste princípio subjacente (KARPERIEN et al., 2008; CURY et al., 2018; KOROLJ et al., 2019; METZE et al., 2019).

A DF é utilizada em ciências biológicas para caracterizar estruturas anatômicas e processos fisiológicos (e.g. fluxo sanguíneo pulmonar e miocárdico, estruturas bronquiais,

vascularização da retina, organização dos diferentes tipos de fibras musculares) (ARSOS; DIMITRIU, 1995; KARPERIEN et al., 2008; POPOVIC et al., 2018).

Garcia *et al.* (2018) relacionaram as respostas de diferentes protocolos de tratamento na lesão muscular e não identificaram alterações histológicas, principalmente em relação à localização mionuclear. Contudo, esta análise identificou com êxito a localização mionuclear de camundongos adultos em modelo experimental de distrofia muscular de Duchenne, onde simularam também uma condição de hiperproliferação *in vitro* de células fibrogênicas, na qual o aumento no fibroblasto cultivado induziu o desarranjo dos mioblastos (CURY et al., 2018). Peviani *et al.* (2018) evidenciaram que o alongamento por 10 e 15 dias reduziu a quantidade de colágeno tipo I no músculo sóleo.

Estudos utilizando a escada vertical como protocolo de treinamento resistido demonstraram efeitos positivos nos resultados de hipertrofia muscular em ratos adultos, idosos e, ainda, potencializado por intervenção de esteróides anabólicos (HORNBERGER; FARRAR, 2004; KRAUSE NETO et al., 2017a). Guzzoni *et al.* (2018) observaram redução do tecido intramuscular após 12 semanas de treinamento em escada vertical com sobrecarga em ratos *Wistar* adultos. Resultados em EVR, tanto no sóleo quanto no plantar, revelam menor porcentagem de tecido conjuntivo, ao que indica possível redução da espessura de suas camadas (fáscia, epimísio, perimísio e endomísio) que organizam e estruturam as fibras musculares, em razão de sua hipertrofia e transmissão de força contrátil transversal.

Em contrapartida, houve maior porcentagem de tecido conjuntivo no músculo sóleo após o treinamento sem sobrecarga concomitante ou não com o alongamento estático prévio. E no plantar, a maior porcentagem de tecido conjuntivo foi apresentada no grupo que realizou o alongamento estático e no grupo de treinamento sem sobrecarga. Ozaki *et al.* (2015) evidenciaram aumento da área intersticial de ratos em 2 dias após lesão por estiramento na região de inserção do gastrocnêmio. Assim como nosso estudo, Ozaki *et al.* (2015) não diferenciaram os tipos de colágeno, onde o tecido conjuntivo poderia ter se desenvolvido devido o aumento do colágeno tipo III.

7.4 ATPase Miofibrilar

Neste estudo, investigamos os efeitos do alongamento estático e dos protocolos de treinamento resistido nos diferentes tipos miofibrilares com auxílio da técnica histoquímica de ATPase miofibrilar.

A composição do tipo de fibra de um músculo pode ser determinada de acordo com respostas intrínsecas e extrínsecas como genética, hormônios, envelhecimento, sobrecarga e tipo de exercício (CRISTEA et al., 2010; MAFFEI et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Além disso, os tipos miofibrilares são determinados com base na resposta contrátil e no metabolismo e, ainda, o diâmetro de suas fibras está relacionado com o balanço entre a síntese, degradação proteica e número de mionúcleos (BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013).

O treinamento resistido executado a longo prazo proporciona, entre outras respostas, o aumento da área de secção transversa (AST) das fibras musculares (ZAMPARO; MINETTI; DI PRAMPERO, 2002). As adaptações que ocorrem na arquitetura das fibras musculares apresentam relação direta na produção de força muscular, em que, fibras com maior AST podem desenvolver maior produção de força muscular devido a formação de novos sarcômeros por meio do aumento significativo na interação das principais proteínas contráteis (SUCHOMEL et al., 2018). Em acréscimo, Allen *et al.* (1999) sugeriram que a hipertrofia muscular está associada à adição de novos mionúcleos pela atividade das células satélites.

O protocolo de treinamento em escada vertical também revela efeitos significativos no aumento da AST; porém assim como a massa muscular, a magnitude desse aumento está diretamente relacionada com o tipo miofibrilar e com a tensão mecânica provocada nesse tecido (LOURENÇO et al., 2020). Também, o progresso das respostas biológicas adaptativas são diretamente proporcionais com a intensidade (QAISAR; BHASKARAN; VAN REMMEN, 2016).

Quando avaliamos os dados do grupo EVS, observamos maior AST comparado ao grupo que realizou o mesmo protocolo de treinamento em escada, porém sem sobrecarga (EV). As adaptações neuromusculares, como o aumento de força e hipertrofia muscular, possuem como componente chave as variáveis presentes em um programa de treinamento resistido (e.g. séries, volume e repetições) (SCHOENFELD; OGBORN; KRIEGER, 2017).

Segundo Deus *et al.* (2012) o aumento da expressão de MMP-2 acontece após 24 sessões de treinamento em escada vertical sem sobrecarga, o que pode indicar remodelação ocorrida devido a tensão mecânica, promovendo novas miofibrilas e aumento da atividade de proteólise, fundamental para o crescimento do tecido músculoesquelético.

O volume de treinamento, por sua vez, indica relevância significativa nessas diretrizes, apresentando forte relação com o crescimento muscular (KRIEGER, 2010) e, quando manipulado de forma progressiva resulta em maior hipertrofia muscular (SCHOENFELD; OGBORN; KRIEGER, 2017).

Um estudo recente de Rocha *et al.* (2020a) verificou hipertrofia muscular do sóleo em ambos os tipos de fibras após 24 sessões de treinamento resistido em modelo experimental.

Considerando a resposta do alongamento na AST do sóleo, nós revelamos redução em ambos os tipos miofibrilares em relação aos animais Controle. Peviani *et al.* (2018) revelaram que não houve diferença na AST do sóleo de grupos experimentais após 10 e 15 dias de alongamento estático. Em homens adultos, Simpson *et al.* (2017) observaram aumento da espessura muscular do membro inferior após 6 semanas de alongamento com carga.

Assim como no treinamento resistido, a manipulação das variáveis no treinamento do alongamento estático parece exercer função-chave nas adaptações neuromusculares. Podemos observar o papel dessas variáveis nas diferentes respostas frente à intensidade do treinamento. Nas fibras do Tipo I, quando o alongamento estático é combinado ao treinamento em escada vertical, podemos observar aumento não significativo da AST, sem diferenças se executado com sobrecarga ou não.

Em contrapartida, o maior valor de AST foi assumido nas fibras Tipo II após o alongamento prévio ao treinamento com sobrecarga (grupo AEVS). Possivelmente, a resposta hipertrófica induzida pelo alongamento prévio ao exercício resistido de maior intensidade parece afetar fibras rápidas, provavelmente em razão do estiramento dessas fibras causada pelo alongamento e pela tensão gerada pela da sobrecarga acoplada na cauda do animal.

A literatura atual nos sugere que o alongamento muscular de baixa intensidade parece não responder significativamente na hipertrofia muscular analisada por meio da medida da AST, entretanto, o alongamento de alta intensidade pode provocar possíveis adaptações que ainda são escassas (NUNES *et al.*, 2020).

Yahata *et al.* (2021) hipotetizaram que um programa de alongamento estático sem carga externa de alto volume (60 min/semana durante 5 semanas, totalizando 300 min) seria capaz de induzir algum efeito na arquitetura muscular em homens adultos; no entanto, não foi observado nenhuma adaptação significativa na hipertrofia dos músculos flexores plantares. Mesmo com um volume semanal de 2 a 13 vezes maior comparado ao encontrado na literatura (NUNES *et al.*, 2020a,b), a baixa intensidade oferecida pelo alongamento estático não é suficiente para induzir adaptações no músculo esquelético de homens jovens adultos saudáveis (YAHATA *et al.*, 2021).

No presente estudo, o volume total do protocolo de alongamento estático executado pelos animais foi de 120min (15min/semana durante 8 semanas). Apesar de ser um protocolo de baixa intensidade, a força manual aplicada era definida até o ponto de desconforto do animal e, com base nas respostas adaptativas, este treinamento está bem próximo da

capacidade dos animais. Ainda, por ser um treinamento de longa duração, era visível o aumento progressivo da amplitude de movimento da articulação trabalhada.

7.5 Junção Neuromuscular

Neste estudo, as alterações da região pós-sináptica da JNM perante a prática de exercício físico, isolados ou combinados, forneceram novos dados sobre a plasticidade do sistema nervoso periférico. Considerando também as características morfofuncionais dos tipos miofibrilares, os músculos sóleo e plantar apresentaram diferentes resultados nesta região ao final do experimento.

A formação da junção neuromuscular é dada pelo acúmulo dos receptores de acetilcolina no sarcolema, vindos dos ramos terminais de um neurônio motor (LI; LEE; THOMPSON, 2011). As regiões pós-sinápticas compostas pelos grupamentos dos receptores de acetilcolina são denominadas de *clusters*, comumente evidenciados com auxílio da imunomarcagem de rodamina conjugada com α -bungarotoxina (DESCHENES et al., 2000).

Quando o alongamento muscular acomete gradualmente a unidade contrátil, a tensão mecânica gerada no comprimento da fibra muscular origina o processo de síntese de proteínas, resultando na adição de novos sarcômeros (DEYNE, 2001). Além disso, o alongamento estático promove respostas celulares dependentes do tempo como redução da rigidez da unidade músculo-tendão e até desencadeia remodelamento muscular por meio de mecanismos para hipertrofia como AKT/mTOR, aumento da expressão gênica de proteína myo-D, e regulação negativa de miostatina (MOHAMAD; NOSAKA; CRONIN, 2011; NAKAMURA et al., 2011; PEVIANI et al., 2018; PEVIANI et al., 2007).

A prática regular de alongamento muscular pode ser benéfica em resultados como contração voluntária máxima e possivelmente velocidade de corrida (SHRIER, 2007). Nossos achados revelam que o alongamento estático provoca alteração de toda estrutura neuromuscular pós-sináptica e, possivelmente, sua função.

Embora evidências sugiram que o alongamento imediatamente antes do exercício diminuía os resultados em testes de desempenho que requerem força ou potência (SHRIER, 2004), dados sobre o alongamento em outras perspectivas são escassos, principalmente sua influência nas respostas pós-sinápticas da JNM.

O remodelamento morfológico da área ocupada pelos receptores de acetilcolina (AChR) pode estar associado com a dessensibilização durante a estimulação neural intensa e

repetida (DESCHENES et al., 2000). O aumento desta área tem como consequência funcional a diminuição da fadiga muscular periférica durante contrações musculares de alta intensidade (DESCHENES et al., 2000). No entanto, a redução desta área não implica que a inervação do neurônio motor nas fibras musculares seja restrita, pois o potencial pós-sináptico normalmente possui uma amplitude que excede em grande parte a amplitude necessária para obter um potencial de ação pós-sináptico (FINSTERER, 2012).

A região pós-sináptica do sóleo no grupo EV apresentou valores menores em todas as variáveis analisadas, o que indica alto nível de remodelamento desta região. É importante ressaltar que, exercícios físicos executados em longos períodos e em intensidade submáxima moderada, como corrida em esteira e natação, são eficientes para o aumento da atividade neuromuscular (DESCHENES, 2019), e o treinamento em escada vertical sem sobrecarga pode ser considerado de baixa intensidade (DEUS et al., 2012).

Deschenes (2016) indicou que a função muscular durante o treinamento provavelmente induz o controle da remodelação da JNM. Em seu estudo foi revelado que músculos com a composição miofibrilar semelhantes apresentam adaptações morfológicas diferentes. Apesar da ação músculos sóleo e plantar estarem relacionadas com a flexão plantar e, presumivelmente, serem recrutados durante o protocolo em escada vertical, podemos observar em nossos dados divergentes adaptações morfológicas pós-sinápticas como resultado do treinamento.

Sobre o treinamento em escada vertical com sobrecarga, Deschenes *et al.* (2015) apresentaram dados em animais jovens e idosos, onde houveram adaptações apenas nos componentes pós-sinápticos da JNM, como é evidente nos nossos dados de EVS.

O uso da sobrecarga nas sessões de treinamento em escada vertical resulta no aumento morfológico da JNM do sóleo de ratos adultos (DESCHENES et al., 2000). Em nosso estudo, os valores de remodelamento dos grupos com sessões com sobrecarga são maiores comparados às sessões sem sobrecarga, tanto no sóleo quanto no plantar.

O treinamento resistido provoca aumento da região neuromuscular pós-sináptica do sóleo principalmente na área ocupada pelos AChR, essas adaptações são específicas do tipo miofibrilar e, ainda, fibras de contração rápida são minimamente recrutadas em treinamento de escada (DESCHENES, 2019; DESCENES et al., 2015). Em nossos dados, podemos verificar o remodelamento da JNM do plantar (Tipo II), desta forma, presume-se que o protocolo de treinamento recrutou miofibrilas que normalmente não são ativadas, à fim de concluir a sessão.

O treinamento resistido concomitante (AEVS) ou não (EVS) com o alongamento resultou em maior dispersão dos receptores de ACh em toda extensão pós-sináptica no plantar comparado aos animais que executaram o treinamento sem sobrecarga (EV). Um estudo introdutório de Deschenes *et al.* (1993) verificou que a intensidade do treinamento em esteira em ratos está diretamente relacionada com a dispersão da placa terminal, uma vez que na corrida de baixa intensidade a dispersão pós-sináptica foi reduzida, enquanto que em intensidade alta, a dispersão foi maior. Podemos confirmar que a manipulação da intensidade do treinamento pode induzir a dimensão das alterações na distribuição de receptores da região pós-sináptica da JNM.

Interessantemente, nosso estudo também apresentou as adaptações que a combinação dos dois protocolos de exercício (alongamento prévio + treinamento em escada vertical) induziu na região pós-sináptica da JNM em comparação aos respectivos grupos controles.

Em relação ao músculo sóleo, podemos observar que sessões de treinamento resistido apresentaram valores semelhantes na dispersão pós-sináptica que os animais que realizaram sessões de treinamento em escada sem sobrecarga com alongamento prévio. Em geral, o treinamento de alta intensidade resulta em maior dispersão dos AChR na placa final (WILSON; DESCHENES, 2005), dessa forma, o alongamento prévio a exercícios menos intensos parece resultar em adaptações semelhantes que somente o treinamento com sobrecarga.

Por outro lado, quando consideramos os dados de dispersão do plantar entre as sessões de treinamento resistido sem (EVS) e com alongamento prévio (AEVS), não há diferenças estatísticas. Segundo Wilson e Deschenes (2005) o tipo de exercício e o tipo da composição miofibrilar resultam em diferentes efeitos na atividade morfológica pós-sináptica.

Sobre o índice de fragmentação, Prakash e Sieck (1998) encontraram os efeitos do envelhecimento nas adaptações morfológicas da JNM, como a fragmentação alterada. Embora a fragmentação possa resultar da redistribuição de componentes pré-sinápticos sobre uma área sináptica maior, essas alterações também podem representar aumento na desnervação e reinervação, o que pode aumentar a falha da transmissão neuromuscular (ZAMPARO; MINETTI; DI PRAMPERO, 2002).

De maneira geral, o aumento da fragmentação está diretamente associado a qualquer comprometimento da transmissão neuromuscular, no entanto é importante enfatizar que a fragmentação da JNM não é a única adaptação estrutural que pode influenciar sua função (SLATER, 2020).

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, concluímos que o alongamento estático prévio e os diferentes treinamentos em escada vertical (combinados ou não) promovem divergentes adaptações morfológicas e morfométricas na região pós-sináptica e no ventre muscular dos músculos sóleo e plantar, descritas a seguir:

- a. No músculo sóleo, o alongamento estático provoca menor área de secção transversa das fibras Tipo I e II, menores valores de dispersão e de área corada na região pós-sináptica do sóleo, sugerindo uma sinapse dispersa. Além disso, os mionúcleos apresentaram maior complexidade de organização. No plantar, por sua vez, o alongamento estático promove maior área de secção transversa das fibras Tipo I, IIa e IIx (comparado ao Controle), aumenta os perímetros da região pós-sináptica, porém não há remodelamento das áreas, indicando uma região menos eficiente;
- b. Há uma adaptação músculo-específica de acordo com o treinamento, no qual a modalidade de exercício físico e o tipo miofibrilar predominante resultaram em diferentes efeitos na morfologia da região pós-sináptica do sóleo e do plantar;
- c. O treinamento em escada vertical atua na manutenção da massa corporal e muscular (sóleo e plantar), promove redução do tempo de subida e no padrão dos movimentos observados durante as sessões;
- d. O treinamento em escada vertical com sobrecarga atua na manutenção da massa corporal e muscular (sóleo e plantar), favorece a hipertrofia das fibras Tipo I do sóleo e Tipo IIx do plantar, promove alterações na organização mionuclear e redução da área intersticial. Além disso, promove maiores valores nas áreas, no diâmetro máximo e no índice de fragmentação da região pós-sináptica do plantar;
- e. Os diferentes treinamentos em escada vertical com alongamento estático prévio apresentaram similar hipertrofia das fibras Tipo I no sóleo e Tipo IIx no plantar, que o treinamento em escada sem sobrecarga;
- f. O treinamento com ou sem sobrecarga com alongamento estático prévio determina a resposta hipertrófica das fibras do Tipo II do sóleo, onde o grupo com sobrecarga apresenta maior hipertrofia que o sem sobrecarga;
- g. O alongamento estático prévio ao exercício em escada vertical sem sobrecarga resulta em menores valores de massa muscular tanto no sóleo quanto no plantar, promove adaptações semelhantes na região pós-sináptica do sóleo causadas pelo treinamento

com sobrecarga, e apresenta maior complexidade na organização mionuclear no plantar;

- h. O alongamento estático prévio à escada vertical com sobrecarga reduz a produção de trabalho no teste de CMC, e aumenta o tempo de subida na escada;
- i. Os protocolos de treinamento foram eficazes nas adaptações morfológicas da região pós-sináptica do plantar, porém estas alterações dependem da intensidade do treinamento, na qual o treinamento com sobrecarga apresentou maior remodelamento morfológico, provavelmente isto proporciona diminuição da fadiga muscular. Por outro lado, o alongamento estático prévio parece atenuar este remodelamento.

REFERÊNCIAS

ALLEN, D. L.; ROY, R. R.; REGGIE EDGERTON, V. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. **Muscle and Nerve**, v. 22, n. 10, p. 1350–1360, 1999.

ALVAREZ-SUAREZ, P.; GAWOR, M.; PRÓSZYŃSKI, T. J. Perisynaptic schwann cells - The multitasking cells at the developing neuromuscular junctions. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 104, p. 31-38, 2020.

AQUINO, C. F.; FONSECA, S. T.; GONÇALVES, G. G. P.; SILVA, P. L. P.; OCARINO, J. M.; MANCINI, M. C. Stretching versus strength training in lengthened position in subjects with tight hamstring muscles: A randomized controlled trial. **Manual Therapy**, v. 15, n. 1, p. 26–31, 2010.

ARSOS, G. A.; DIMITRIU, P. P. A fractal characterization of the type II fiber distribution in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. **Muscle & Nerve**, v. 18, n. 9, p. 961–968, 1995.

AYALA, F.; SAINZ DE BARANDA, P.; DE STE CROIX, M.; SANTONJA, F. Comparison of active stretching technique in males with normal and limited hamstring flexibility. **Physical Therapy in Sport**, v. 14, n. 2, p. 98–104, 2013.

BAEHR, L. M.; WEST, D. W. D.; MARCOTTE, G.; MARSHALL, A. G.; DE SOUSA, L. G.; BAAR, K.; BODINE, S. C. Age-related deficits in skeletal muscle recovery following disuse are associated with neuromuscular junction instability and ER stress, not impaired protein synthesis. **Aging**, v. 8, n. 1, p. 127–146, 2016.

BARBEAU, S.; TAHRAOUI-BORIES, J.; LEGAY, C.; MARTINAT, C. Building neuromuscular junctions in vitro. **Development**, v. 147, n. 22, dev193920, 2020.

BARROSO, R.; TRICOLI, V.; GIL, S. S.; UGRINOWITSCH, C.; ROSCHEL, H. Maximal strength, number of repetitions, and total volume are differently affected by static-, ballistic-, and proprioceptive neuromuscular facilitation stretching. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 26, n. 9, p. 2432–2437, 2012.

BEHM, D. G.; CHAOUACHI, A. A review of the acute effects of static and dynamic stretching on performance. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 11, p. 2633–2651, 2011.

BHUTDA, S.; SURVE, M.; ANIL, A.; KAMATH, K.; SINGH, N.; MODI, D.; BANERJEE, A. Histochemical staining of collagen and identification of its subtypes by picosirius red dye in mouse reproductive tissues. **Bio-Protocol**, v. 7, n. 21, p. 1–10, 2017.

BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 4, p. 1645–1687, 2013.

BLUNDELL, J. E.; GIBBONS, C.; CAUDWELL, P.; FINLAYSON, G.; HOPKINS, M. Appetite control and energy balance: Impact of exercise. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 1, p. 67–76, 2015.

- BOUVIER, T.; OPPLERT, J.; COMETTI, C.; BABAULT, N. Acute effects of static stretching on muscle–tendon mechanics of quadriceps and plantar flexor muscles. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 7, p. 1309–1315, 2017.
- CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 6, p. 655–658, 2014.
- CHEN, C. H.; CHEN, T. C.; JAN, M. H.; LIN, J. J. Acute effects of static active or dynamic active stretching on eccentric-exercise-induced hamstring muscle damage. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 10, n. 3, p. 346–352, 2015.
- CHIASSEN, R. B. **Laboratory anatomy of the white rat**. 5. ed. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 1958. 144 p.
- CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-Induced Muscle Damage in Humans : American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 81, n. 11, p. S52–S69, 2002.
- COSTA, P. B.; RTJAS, C. V.; SMITH, C. M. Effects of stretching and fatigue on peak torque, muscle imbalance, and stability. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 58, n. 7–8, p. 957–965, 2017.
- COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1853–1861, 2004.
- CRISTEA, A.; QAISAR, R.; EDLUND, P. K.; LINDBLAD, J.; BENGTSSON, E.; LARSSON, L. Effects of aging and gender on the spatial organization of nuclei in single human skeletal muscle cells. **Aging Cell**, v. 9, n. 5, p. 685–697, 2010.
- 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**, v. 503, n. 1, p. 109–115, 2018.
- DAMAS, F.; PHILLIPS, S. M.; LIXANDRÃO, M. E.; VECHIN, F. C.; LIBARDI, C. A.; ROSCHEL, H.; TRICOLI, V.; UGRINOWITSCH, C. An inability to distinguish edematous swelling from true hypertrophy still prevents a completely accurate interpretation of the time course of muscle hypertrophy. **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 2, p. 445–446, 2016.
- DASELER, E. H.; ANSON, B. J. The plantaris muscle: An anatomical study of 750 specimens. **Journal of bone and joint surgery**, v. 15, n. 4, p. 822–827, 1943.
- DE DEYNE, P. G. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. **Physical Therapy**, v. 81, n. 2, p. 819–827, 2001.
- DESCHENES, M. R. Adaptations of the neuromuscular junction to exercise training. **Current Opinion in Physiology**, v. 10, p. 10–16, 2019.

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**, v. 23, n. 10, p. 1576–1581, 2000.

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. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2016.

DESCHENES, M. R.; SHERMAN, E. G.; ROBY, M. A.; GLASS, E. K.; HARRIS, M. B. Effect of resistance training on neuromuscular junctions of young and aged muscles featuring different recruitment patterns. **Journal of Neuroscience Research**, v. 23, n. 3, p. 504–513, 2015.

DESCHENES, M. R.; LI, S.; ADAN, M. A.; OH, J. J.; RAMSEY, H. C. Muscle fibers and their synapses differentially adapt to aging and endurance training. **Experimental Gerontology**, v. 106, p. 183–191, 2018.

DESCHENES, M. R.; HURST, T. E.; RAMSER, A. E.; SHERMAN, E. G. Presynaptic to postsynaptic relationships of the neuromuscular junction are held constant across age and muscle fiber type. **Developmental Neurobiology**, v. 73, n. 10, p. 744–753, 2013.

DESCHENES, M. R.; MARESH, C. M.; CRIVELLO, J. F.; ARMSTRONG, L. E.; KRAEMER, W. J.; COVAULT, J. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. **Journal of Neurocytology**, v. 22, n. 8, p. 603–615, 1993.

DEUS, A. P. L.; BASSI, D.; SIMÕES, R. P.; OLIVEIRA, C. R.; BALDISSERA, V.; DE CÁSSIA MARQUETI, R.; ARAUJO, H. S. S.; ARENA, R.; BORGHI-SILVA, A. MMP 2 expression in skeletal muscle after strength training. **International Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 137–141, 2012.

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**, v. 39, n. 5, p. 382–389, 2018.

DURUTURK, N.; ARIKAN, H.; ULUBAY, G.; TEKINDAL, M. A. A comparison of calisthenic and cycle exercise training in chronic obstructive pulmonary disease patients: A randomized controlled trial. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 10, n. 1, p. 99–108, 2015.

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**, v. 523, n. 1, p. 214–219, 2020.

FAHIM, M. A. Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6NNia

aging mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 1, p. 59–66, 1997.

FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 13, n. 218, p. 1–13, 2012.

FLACK, K. D.; DAVY, K. P.; HULVER, M. W.; WINETT, R. A.; FRISARD, M. I.; DAVY, B. M. Aging, resistance training, and diabetes prevention. **Journal of Aging Research**, v. 2011, p. 1-12, 2010.

FOWLES, J. R.; SALE, D. G.; MACDOUGALL, J. D. Reduced strength after passive stretch of the human plantarflexors. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 3, p. 1179–1188, 2000.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Behavior Genetics**, v. 45, n. 2, p. 183–195, 2015.

FRONTERA, W. R.; ZAYAS, A. R.; RODRIGUEZ, N. Aging of human muscle: understanding sarcopenia at the single muscle cell level. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 201–207, 2012.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A.; LAMONTE, M. J.; LEE, I. M.; NIEMAN, D. C.; SWAIN, D. P. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.

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

GDYNIA, H. J.; MÜLLER, H. P.; LUDOLPH, A. C.; KÖNINGER, H.; HUBER, R. Quantitative muscle ultrasound in neuromuscular disorders using the parameters intensity, entropy, and fractal dimension. **European Journal of Neurology**, v. 16, n. 10, p. 1151–1158, 2009.

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**, v. 49, n. 2, p. 1–8, 2016.

GRANS, C. F.; FERIANI, D. J.; ABSSAMRA, M. E. V.; ROCHA, L. Y.; CARROZZI, N. M.; MOSTARDA, C.; FIGUEROA, D. M.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; RODRIGUES, B. Resistance training after myocardial infarction in rats: Its role on cardiac and autonomic function. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 103, n. 1, p. 60–68, 2014.

GUARINO, S. R.; CANCIANI, A.; FORNERIS, F. Dissecting the extracellular complexity of neuromuscular junction organizers. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, p. 1-24, 2020.

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**, v.

9, n. APR, p. 1–10, 2018.

HAGERMAN, F. C.; WALSH, S. J.; STARON, R. S.; HIKIDA, R. S.; GILDERS, R. M.; MURRAY, T. F.; TOMA, K.; RAGG, K. E. Effects of high-intensity resistance training on untrained older men. I. Strength, cardiovascular, and metabolic responses. **Journals of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 55, n. 7, p. 336–346, 2000.

HERZOG, W. The multiple roles of titin in muscle contraction and force production. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 4, p. 1187–1199, 2018.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the fhl muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n. 1, p. 16–31, 2004.

JAGGERS, J. R.; SWANK, A. M.; FROST, K. L.; LEE, C. D. The acute effects of dynamic and ballistic stretching on vertical jump height, force, and power. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 22, n. 6, p. 1844–1849, 2008.

JONES, R. A.; REICH, C. D.; DISSANAYAKE, K. N.; KRISTMUNDSDOTTIR, 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**, v. 6, n. 12, p. 1-15, 2016.

JOSHI, S. S.; JOSHI, S. D.; KISHVE, P. S. Feathered fibres of human soleus muscle. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 1, p. 239–242, 2010.

KAMONSEKI, D. H.; GONÇALVES, G. A.; YI, L. C.; LOMBARDI JÚNIOR, I. Effect of stretching with and without muscle strengthening exercises for the foot and hip in patients with plantar fasciitis: A randomized controlled single-blind clinical trial. **Manual Therapy**, v. 23, p. 76–82, 2014.

KARPERIEN, A.; JELINEK, H. F.; LEANDRO, J. J.; SOARES, J. V.; CESAR JÚNIOR, R. M.; LUCKIE, A. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. **Clinical Ophthalmology**, v. 2, n. 1, p. 109–122, 2008.

KAWANO, M. M.; AMBAR, G.; OLIVEIRA, B. I. R.; BOER, M. C.; CARDOSO, A. P. R. G.; CARDOSO, J. R. Influence of the gastrocnemius muscle on the sit-and-reach test assessed by angular kinematic analysis. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, n. 1, p. 10–15, 2010.

KAY, A. D.; BLAZEVOICH, A. J. Effect of acute static stretch on maximal muscle performance: A systematic review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 1, p. 154–164, 2012.

KEITH, A. The history of the human foot and its bearing on orthopaedic practice. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 11, p. 10–32, 1929.

KNUDSON, D. V.; MCHUGH, M.; TRAUMA, A.; HILL, L. Current issues in flexibility fitness. **President's Council on Physical Fitness and Sports Series**, v. 3, n. 10, p. 1–8, 2000.

KOKKONEN, J.; NELSON, A. G.; CORNWHEEL, A. Acute muscle stretching inhibits maximal strength performance. **Research Quarterly for Exercise and Sport**, v. 69, n. 4, p. 411–415, 1998.

KOROLJ, A.; WU, H. T.; RADISIC, M. A healthy dose of chaos: Using fractal frameworks for engineering higher-fidelity biomedical systems. **Biomaterials**, v. 219, p. 119363, 2019.

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**, v. 32, n. 3, p. 651–659, 2018.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 4, p. 674–688, 2004.

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**, v. 6, n. 1A, p. 36–49, 2016.

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**, v. 98, p. 80–90, 2017a.

KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; 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**, v. 11, p. 1–17, 2017b.

KRIEGER, J. W. Single vs. Multiple sets of resistance exercise for muscle hypertrophy: a meta-analysis. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 24, n. 4, p. 1150–1159, 2010.

KWINTER, D. M.; LAGREW, J. P.; KRETZER, J.; LAWRENCE, C.; MALIK, D.; MATER, M.; BRUECKNER, J. K. Unilateral double plantaris muscle: a rare anatomical variation. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 4, p. 1097–1099, 2010.

LEE, M. G.; SEDLOCK, D. A.; FLYNN, M. G.; KAMIMORI, G. H. Resting metabolic rate after endurance exercise training. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 7, p. 1444–1451, 2009.

LEE, S.; HONG, K. S.; KIM, K. Effect of previous strength training episode and retraining on facilitation of skeletal muscle hypertrophy and contractile properties after long-term detraining in rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 12, n. 2, p. 79–82, 2016.

LEITE, T.; TEIXEIRA, A. S.; 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**, v. 29, n. 4, p. 1083–1088, 2015.

LEMPKE, L.; WILKINSON, R.; MURRAY, C.; STANEK, J. The effectiveness of PNF versus static stretching on increasing hip-flexion range of motion. **Journal of Sport Rehabilitation**, v. 27, n. 3, p. 289–294, 2018.

- LI, Y.; LEE, Y. II; 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**, v. 31, n. 42, p. 14910–14919, 2011.
- LOURENÇO, Í.; KRAUSE NETO, W.; AMORIM, L. S. P.; ORTIZ, V. M. M.; GERALDO, 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**, v. 8, n. 17, p. 1–25, 2020.
- MAFFEI, M.; LONGA, E.; QAISAR, R.; AGONI, V.; DESAPHY, J. F.; CAMERINO, D. C.; BOTTINELLI, R.; CANEPARI, M. Actin sliding velocity on pure myosin isoforms from hindlimb unloaded mice. **Acta Physiologica**, v. 212, n. 4, p. 316–329, 2014.
- MANOEL, M. E.; HARRIS-LOVE, M. O.; DANOFF, J. V.; MILLER, T. A. Acute effects of static, dynamic, and proprioceptive neuromuscular facilitation stretching on muscle power in women. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 22, n. 5, p. 1528–1534, 2008.
- 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**, v. 20, n. 10, p. 3663–3675, 2000.
- MEDICINE, A. Co. of S. Progression models in resistance training for healthy adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 3, p. 687–708, 2009.
- METZE, K.; ADAM, R.; FLORINDO, J. B. The fractal dimension of chromatin - a potential molecular marker for carcinogenesis, tumor progression and prognosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 4, p. 299–312, 2019.
- MOHAMAD, N. I.; NOSAKA, K.; CRONIN, J. Maximizing hypertrophy: Possible contribution of stretching in the interset rest period. **Strength and Conditioning Journal**, v. 33, n. 1, p. 81–87, 2011.
- MOORE, K. L., DALLEY, A. F., AGUR, A. M. R. **Anatomia Orientada para a Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 1126 p.
- MORIGGI JUNIOR, R.; BERTON, R.; DE SOUZA, T. M. F.; CHACON-MIKAHIL, M. P. T.; CAVAGLIERI, C. R. Effect of the flexibility training performed immediately before resistance training on muscle hypertrophy, maximum strength and flexibility. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 4, p. 767–774, 2017.
- MORTON, S. K.; WHITEHEAD, J. R.; BRINKERT, R. H.; CAINE, D. J. Resistance training vs. Static stretching: effects on flexibility and strength. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 25, n. 12, p. 3391–3398, 2011.
- NAKAMURA, M.; IKEZOE, T.; TAKENO, Y.; ICHIHASHI, N. Acute and prolonged effect of static stretching on the passive stiffness of the human gastrocnemius muscle tendon unit in vivo. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 11, p. 1759–1763, 2011.

NAYAK, S. R.; KRISHNAMURTHY, A.; PRABHU, L. V.; MADHYASTHA, S. Additional tendinous origin and entrapment of the plantaris muscle. **Clinics**, v. 64, n. 1, p. 67–68, 2009.

NUNES, J. P.; KASSIANO, W.; COSTA, B. D. V.; MAYHEW, J. L.; RIBEIRO, A. S.; CYRINO, E. S. Equating resistance-training volume between programs focused on muscle hypertrophy. **Sports Medicine**, 2021.

NUNES, J. P.; SCHOENFELD, B. J.; NAKAMURA, M.; RIBEIRO, A. S.; CUNHA, P. M.; CYRINO, E. S. Does stretch training induce muscle hypertrophy in humans? A review of the literature. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 40, n. 3, p. 148–156, 2020.

NUZZO, J. L. The case for retiring flexibility as a major component of physical fitness. **Sports Medicine**, v. 50, n. 5, p. 1–13, 2019.

NYENHUIS, S. M.; GREIWE, J.; ZEIGER, J. S.; NANDA, A.; COOKE, A. Exercise and fitness in the age of social distancing during the COVID-19 Pandemic. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 8, n. 7, p. 2152–2155, 2020.

OZAKI, G.; CAMARGO, R. C. T.; KOIKE, T. E.; GARCIA, T. A.; CASTOLDI, R. C.; CAMARGO FILHO, J. C. S. Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury. **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 3, p. 908–913, 2015.

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**, v. 35, n. 3, p. 363–370, 2007.

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**, v. 8, n. 9010, 2018.

PIMENTEL NETO, J.; ROCHA, L. C.; BARBOSA, G. K.; JACOB, C. S.; KRAUSE NETO, W.; WATANABE, I. S.; CIENA, A. P. Myotendinous junction adaptations to ladder - based resistance training : identification of a new telocyte niche. **Scientific Reports**, v. 10, n. 14164, 2020.

POPOVIC, N.; RADUNOVIC, M.; BADNJAR, J.; POPOVIC, T. Fractal dimension and lacunarity analysis of retinal microvascular morphology in hypertension and diabetes. **Microvascular Research**, v. 118, p. 36–43, 2018.

POPP, J. K.; BELLAR, D. M.; HOOVER, D. L.; CRAIG, B. W.; LEITZELAR, B. N.; WANLESS, E. A.; JUDGE, L. W. Pre- and post-activity stretching practices of collegiate athletic trainers in the united states. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 31, n. 9, p. 2347–2354, 2017.

PRAKASH, Y. S.; SIECK, G. C. Age-related remodeling of neuromuscular junctions on type-identified diaphragm fibers. **Muscle and Nerve**, v. 21, n. 7, p. 887–895, 1998.

PRATT, S. J. P.; VALENCIA, A. P.; LE, G. K.; SHAH, S. B.; LOVERING, R. M. Pre- and

postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. 252, p. 1–9, 2015.

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

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

ROCHA, L. C.; JACOB, C. S.; BARBOSA, G. K.; WATANABE, I. S.; 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**, v. 83, p. 1190-1197, 2020a.

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**, v. 154, p. 621-628, 2020b.

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

SCHOENFELD, B. J.; GRGIC, J.; OGBORN, D.; KRIEGER, J. W. Strength and hypertrophy adaptations between low- vs. high-load resistance training: asystematic review and meta-analysis. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 31, n. 12, p. 3508–3523, 2017.

SCHOENFELD, B. J.; OGBORN, D.; KRIEGER, J. W. Dose-response relationship between weekly resistance training volume and increases in muscle mass: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Sports Sciences**, v. 35, n. 11, p. 1073–1082, 2017.

SHRIER, I. Does Stretching Improve Performance? **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 14, n. 5, p. 267–273, 2004.

SHRIER, I. Does Stretching Help Prevent Injuries? **Evidence-based Sports Medicine**, v. 2, p. 36–58, 2007.

SIMÃO, R.; LEMOS, A.; SALLES, B.; LEITE, T.; OLIVEIRA, É.; RHEA, M.; REIS, V. M. The influence of strength, flexibility, and simultaneous training on flexibility and strength gains. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 25, n. 5, p. 1333–1338, 2011.

SIMPSON, C. L.; KIM, B. D. H.; BOURCET, M. R.; JONES, G. R.; JAKOBI, J. M. Stretch training induces unequal adaptation in muscle fascicles and thickness in medial and lateral gastrocnemii. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 27, n. 12, p. 1597–1604, 2017.

SIMPSON, S. L.; HERTZOG, M. S.; BARJA, R. H. The plantaris tendon graft: An ultrasound study. **Journal of Hand Surgery**, v. 16, n. 4, p. 708–711, 1991.

SLATER, C. R. 'Fragmentation' of NMJs: a sign of degeneration or regeneration? A long

journey with many junctions. **Neuroscience**, v. 439, p. 28–40, 2020.

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**, v. 69, n. 4, p. 265–270, 2014.

STANDRING, Susan. **Anatomia de Grays**. 40. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1861 p.

STRASSER, B.; SCHOBERSBERGER, W. Evidence for resistance training as a treatment therapy in obesity. **Journal of Obesity**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

STRICKLAND, J. C.; SMITH, M. A. Animal models of resistance exercise and their application to neuroscience research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 273, p. 191–200, 2016.

SUCHOMEL, T. J.; NIMPHIUS, S.; BELLON, C. R.; STONE, M. H. The importance of muscular strength: training considerations. **Sports Medicine**, v. 48, n. 4, p. 765–785, 2018.

SUGAVASI, R.; LATHA, K.; DEVI, I.; JETTI, R.; SIRASANAGANDLA, S. R.; GORANTLA, V. R. A case report of variant insertion of plantaris muscle and its morphological and clinical implications. **Journal of Morphological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 304–305, 2013.

SWEENEY, H. L.; HAMMERS, D. W. Muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2018.

SZARO, P.; WITKOWSKI, G.; ŚMIGIELSKI, R.; KRAJEWSKI, P.; CISZEK, B. Fascicles of the adult human Achilles tendon - an anatomical study. **Annals of Anatomy**, v. 191, n. 6, p. 586–593, 2009.

TONINO, P.; KISS, B.; STROM, J.; METHAWASIN, M.; SMITH, J. E.; KOLB, J.; LABEIT, S.; GRANZIER, H. The giant protein titin regulates the length of the striated muscle thick filament. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2017.

VELDEMA, J.; JANSEN, P. Resistance training in stroke rehabilitation: systematic review and meta-analysis. **Clinical Rehabilitation**, v. 34, n. 9, p. 1173–1197, 2020.

WEPPLER, C. H.; MAGNUSSON, S. P. Increasing muscle extensibility: A matter of increasing length or modifying sensation? **Physical Therapy**, v. 90, n. 3, p. 438–449, 2010.

WESTCOTT, W. L. Resistance training is medicine: Effects of strength training on health. **Current Sports Medicine Reports**, v. 11, n. 4, p. 209–216, 2012.

WESTCOTT, W. L.; WINETT, R. A.; ANNESI, J. J.; WOJCIK, J. R.; ANDERSON, E. S.; MADDEN, P. J. Prescribing physical activity: Applying the ACSM protocols for exercise type, intensity, and duration across 3 training frequencies. **Physician and Sportsmedicine**, v. 37, n. 2, p. 51–58, 2009.

WILSON, M. H.; DESCHENES, M. R. The neuromuscular junction: Anatomical features and adaptations to various forms of increased, or decreased neuromuscular activity. **International Journal of Neuroscience**, v. 115, n. 6, p. 803–828, 2005.

WITVROUW, E.; MAHIEU, N.; DANNEELS, L.; MCNAIR, P. Stretching and Injury Prevention: An Obscure Relationship. **Sports Medicine**, v. 34, n. 7, p. 443–449, 2004.

WOOD, S. J.; R. SLATER, C. Safety factor at the neuromuscular junction. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 4, p. 393–429, 2001.

ZAMPARO, P.; MINETTI, A. E.; DI PRAMPERO, P. E. Interplay among the changes of muscle strength, cross-sectional area and maximal explosive power: Theory and facts. **European Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 3, p. 193–202, 2002.

ZHANG, D.; WANG, X.; LI, Y.; ZHAO, L.; LU, M.; YAO, X.; XIA, H.; WANG, Y. cheng; LIU, M. F.; JIANG, J.; LI, X.; YING, H. Thyroid hormone regulates muscle fiber type conversion via miR-133a1. **Journal of Cell Biology**, v. 207, n. 6, p. 753–766, 2014.

ZOTZ, T. G.; CAPRIGLIONE, L. G. A.; ZOTZ, R.; NORONHA, L.; AZEVEDO, M. L. V; MARTINS, H. R. F; GOMES, A. R. S. Acute effects of stretching exercise on the soleus muscle of female aged rats. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 1, p. 1–9, 2016.