
EDUCAÇÃO FÍSICA

LUAN RISSATTO SIERRA

**PLASTICIDADE TECIDUAL DA JUNÇÃO
MIOTENDÍNEA DO SÓLEO DE RATAS WISTAR
IDOSAS OVARIETOMIZADAS SUBMETIDAS À
NATAÇÃO**

LUAN RISSATTO SIERRA

PLASTICIDADE TECIDUAL DA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DO SÓLEO
DE RATAS WISTAR IDOSAS OVARIECTOMIZADAS SUBMETIDAS À
NATAÇÃO

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

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

Rio Claro
2016

301.435 Sierra, Luan Rissatto
S572p Plasticidade tecidual da junção miotendínea do sóleo de
ratas Wistar idosas ovariectomizadas submetidas à natação /
Luan Rissatto Sierra. - Rio Claro, 2016
47 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Educação
física.) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Envelhecimento. 2. Junção miotendínea. 3. Menopausa.
4. Exercício físico. I. Título.

Dedico esse trabalho a todos que estão em prol do avanço e a evolução da ciência e da minha vida, trabalhando sempre para o bem e aos aspectos legais deste nosso corrompido ciclo social.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a minha mãe pois sem ela eu não estaria desfrutando das boas experiências que a vida nos proporciona;

Agradeço ao meu pai, irmã, avó e avô sempre pelo carinho e preocupação pela minha permanência durante toda minha graduação;

Agradeço aos meus querido padrinho e madrinha que são como anjos em minha vida, sempre com as mãos estendidas e acolhedoras nas horas certas.

Agradeço ao meu querido amigo e orientador Prof. Dr. Adriano Polican Ciena pela paciência e confiança em meu trabalho, sem ele com certeza não estaria em lugar algum.

Agradeço a Deus também pela oportunidade à vida e a tudo que elas nos concede, intercedo pela ignorância das pessoas e pela evolução de minha alma e sabedoria.

Agradeço a todos os guias espirituais que com muita paciência foi me colocando nos devidos lugares e me iluminando com a luz e sabedoria necessária para a construção da minha vida, temos um longo trabalho pela frente.

Agradeço também a religião da Umbanda e pai de santo por mostrar-me o verdadeiro caminho a seguir e com fé e persistência sempre ao meu lado tentando mostrar os erros e a força para seguir.

E por fim agradeço a grande pessoa que tenho ao meu lado, sem ela, não saberia a força de um verdadeiro amor. Obrigado Lara, por ensinar a ver uma emoção.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas de laboratório por todo apoio e carinho nas horas precisas.

Agradeço aos técnicos do laboratório de Anatomia Humana pelo suporte necessário durante o andamento de todo o projeto.

Agradeço a Unesp pela oportunidade de me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço a todos meus colegas de graduação e de república, cada um com sua particularidade e devido respeito.

RESUMO

O processo fisiológico do envelhecimento acarreta em diversas alterações aos sistemas corporais onde a sarcopenia resultante da atrofia muscular associado à menopausa, desencadeia diversas alterações morfológicas na área de interação músculo-tendão denominada de junção miotendínea. O exercício físico poderá acarretar em benefícios na estrutura da junção miotendínea associadas com um grande aumento em sua área de contato. O objetivo do presente estudo consistiu em analisar a plasticidade tecidual através da análise morfológica da junção miotendínea do sóleo em ratas *Wistar* idosas ovariectomizadas submetidas ao treinamento de natação. Foram utilizadas 40 ratas com 1 ano e 2 meses de idade divididas aleatoriamente em quatro Grupos, (n=10): Grupo Sedentário; Grupo Treinadas; Grupo Sedentário/Ovariectomizadas e Grupo Treinadas/Ovariectomizadas. Os animais foram oriundos do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu-SP. O protocolo de treinamento consistiu em 40 sessões, durante uma hora diária, por um período de oito semanas e sobrecarga de 5% da massa corporal dos animais, com mensuração semanal para realização de ajustes. As imagens histológicas obtidas foram analisadas através da microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, de maneira a evidenciar características morfométricas, aspectos tridimensionais dos elementos estruturais e ultraestruturais dos componentes ao nível celular. Os resultados do presente estudo evidenciaram a plasticidade tecidual da JMT do sóleo de ratas idosas ovariectomizadas. Foram apresentadas as diferenças estatísticas nos valores de massa corporal mediante a realização do protocolo de treinamento e ovariectomia. Além disso foram evidenciadas as amplas projeções sarcoplasmáticas provenientes do tecido tendíneo e responsáveis pela fixação com o tecido muscular. Foram revelados os aspectos tridimensionais na estruturação da JMT e sua interação com o tecido conjuntivo denso associado. Foram reveladas as adaptações ultraestruturais das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas em toda interface miotendínea com suas diferentes disposições, formatos e diâmetros de acordo com o envelhecimento, natação e ovariectomia. Foram demonstradas as características morfométricas dos comprimentos e espessuras das invaginações e evaginações ao evidenciar o aumento da área de contato com o treinamento aquático e a localização difusa da interação miotendínea com a realização da ovariectomia. Concluí-se que a JMT apresentou amplas adaptações na disposição dos sarcômeros em séries, organização dos feixes de fibrilas de colágeno, densidade das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas após a ovariectomia e organização com o treinamento aquático.

Palavras-chave: Junção Miotendínea, Envelhecimento, Menopausa, Exercício Físico.

ABSTRACT

The physiological process of aging results in several changes in the body systems where the resulting sarcopenia of muscle atrophy associated with menopause, several triggers morphological changes in muscle-tendon interaction area denominated myotendinous junction. Physical exercise may be result in benefits in the structure of myotendinous junction associated with a large increase in their contact area. The aim of this study is to analyze the tissue plasticity through the morphological analysis of myotendinous junction of the soleus in ovariectomized old Wistar rats submitted to swimming training. Will be used 40 rats aged with 1 year and 2 months old randomly divided into four groups (n = 10): Sedentary group; Trained group; Sedentary / Ovariectomized group and Trained / Ovariectomized group. The animals will be coming from the Central Animal Facility of UNESP - Botucatu-SP. The training protocol consist of 40 sessions, 1 hour daily, for a period of 8 weeks and loaded with 5% body weight of animals with weekly measurements for making adjustments. The obtained histological results will be analyzed by light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy, in order to demonstrate morphometric characteristics, three-dimensional aspects of structural and ultrastructural elements of the components at the cellular level. The results of this study showed the tissue plasticity of JMT the soleus of ovariectomized rats elderly. The statistical differences were presented in body mass values by making the protocol training and ovariectomy. Also highlighted were the broad sarcoplasmic projections from the tendon tissue and responsible for fixing to the muscle tissue. The three-dimensional aspects in structuring the JMT and its interaction with the dense connective tissue associated were revealed. the ultrastructural adaptations of invaginations and evaginations sarcoplasmic were revealed throughout myotendinous interface with its different dispocisões, shapes and diameters according to aging, swimming and ovariectomy. Morphometric characteristics of lengths and thicknesses of invaginations and evaginations have been demonstrated to show increased contact area with aquatic training and diffuse location myotendinous interaction with the completion of ovariectomy. It was concluded that the JMT presented extensive adjustments in the arrangement of sarcomeres in series, organization of collagen fibrils beams, density of invaginations and evaginations sarcoplasmic after ovariectomy and organization with the water training.

Keywords: Junction Myotendinous, Aged, Menopause, Physical Exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Microscopia de Luz da Junção Miotendínea do Sóleo de ratas idosas ovariectomizadas.	27
Figura 2- Microscopia Eletrônica de Varreruda da Junção Miotendínea do Sóleo de ratas idosas ovariectomizadas.	29
Figura 3- Microscopia Eletrônica de Transmissão da Junção Miotendínea do Sóleo de ratas idosas ovariectomizadas.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Médias e Desvio padrão da massa corporal dos animais dos Grupos S, T, O e OT em períodos distintos.	24
Tabela 2- Médias e Desvio padrão dos comprimentos das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, O e OT.	31
Tabela 3- Médias e Desvio padrão das espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, O e OT.	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Apresenta a disposição linear da média da massa corporal dos Grupos S, T, O, OT em seus três períodos distintos representados nos dados da Tabela 1. . **25**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1.Músculo Estriado Esquelético.....	12
2.2.Tendão.....	14
2.3.Junção Miotendínea.....	15
2.4.Envelhecimento.....	16
2.5.Ovariectomia.....	17
2.6.Exercício Físico.....	17
3. OBJETIVO GERAL.....	18
3.1.Objetivos Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1.Animais	19
4.2.Procedimento Cirúrgico - Ovariectomia	19
4.3.Protocolo de Treinamento	20
4.4.Mensuração da Massa Corporal.....	20
4.5.Microscopia de Luz	21
4.6.Microscopia Eletrônica de Varredura	22
4.7.Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	22
4.8.Análise Morfométrica.....	23
5.RESULTADOS	24
6.DISSCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células de até 30 cm de comprimento denominadas fibras musculares estriadas esqueléticas, com características cilíndricas, multinucleadas, e com a presença de muitos filamentos chamados de miofibrilas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A região da junção miotendínea é caracterizada nas extremidades distais da musculatura esquelética em relação ao seu ventre muscular próximos ao seu ponto móvel de inserção tendínea. Suas adaptações são descritas de acordo com sua sintopia, função, disposição, topografia e composição histoquímica (CIENA et al., 2012). Sua principal função é da transmissão de força gerada através das proteínas contráteis intracelulares do músculo para as proteínas do tecido conjuntivo do tendão que resultará nos movimentos de nossas articulações (KANNUS et al., 1992). O envelhecimento está relacionado com a perda progressiva de massa muscular, força e qualidade, uma condição descrita como sarcopenia, um quadro que se tornou grande preocupação de saúde pública para o envelhecimento da população atual (KO et al., 2014). Modelos experimentais que simulam os sinais e sintomas da menopausa são empregados para analisar os seus efeitos em diversos sistemas do corpo humano. O procedimento de ovariectomia é caracterizado pela remoção bilateral dos ovários, no qual gera mudanças desde hormonais até a redução do tamanho do útero (CHANG et al., 2010). O exercício físico tem sido recomendada para o tratamento e prevenção de muitas doenças crônicas associadas com o envelhecimento (KO et al., 2014). Vários estudos mostraram a melhoria na massa muscular relacionada à idade e declínio funcional com o treinamento físico (KOH; BROOKS, 2001; WATERS et al., 2003).

Diante dos vários fatores adversos relacionados ao envelhecimento, a menopausa é um distúrbio hormonal que acarreta em diversos acometimentos devido a redução na produção de estrógeno e progesterona, hormônios de extrema importância para vitalidade e qualidade de vida da mulher. Além disso, o sistema muscular é um dos principais sistemas que sofre alterações morfológicas no envelhecimento devido a atrofia muscular, no qual desencadeia um quadro que é atualmente preocupação mundial de saúde pública do idoso, denominado de sarcopenia. Com isso, toda a região e a área de interação da junção miotendínea poderão sofrer grande comprometimento nas suas características morfológicas, o

que acarretará na alteração drástica da transmissão e resistência de força entre o músculo e tendão.

A fim de proporcionar uma melhor qualidade de vida e minimizar as alterações morfológicas na junção miotendínea do sóleo agravadas com a sarcopenia e a menopausa, concomitantemente com a melhor estabilização articular devido a sua atividade postural, o exercício físico, é uma das modalidades terapêuticas indicadas para amenizar os efeitos deletérios possivelmente potencializados e associados ao envelhecimento. Além disso, pouco se sabe sobre as alterações nas características morfológicas da junção miotendínea no músculo Sóleo de ratas ovariectomizadas e suas principais consequências em resposta ao exercício físico, onde a natação poderá contribuir com o aumento da área da junção miotendínea extremamente eficaz para uma melhora na funcionalidade muscular e na vida cotidiana de idosas sarcopenicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Músculo Estriado Esquelético

Cerca de 40 a 50 % do peso corporal total é atribuído pelo tecido muscular, sua constituição é de extrema importância pois geram forças necessárias para a contração desse tecido através da energia contida nas moléculas de ATP. Pode ser dividido em três tipos de músculos: músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso, diferenciados de acordo com suas características morfológicas e funcionais (TORTORA; DERRICKSON, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células de até 30 cm de comprimento denominadas fibras musculares estriadas esqueléticas, com características cilíndricas, multinucleadas, e com a presença de muitos filamentos chamados de miofibrilas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Além disso, é responsável pelo movimento do esqueleto axial, apendicular, e pela manutenção e postura do corpo por ter sua fixação nos ossos (ROSS; PAWLINA, 2008).

As fibras musculares são unidas e mantidas pelo tecido conjuntivo essencial para transdução de força. Esse tecido é organizado estruturalmente no interior do

músculo para fortalecer, proteger, e agrupar as fibras musculares em feixes ligados aos músculos. Ele pode ser classificado em três tipos de acordo com sua relação das fibras: o endomísio, tecido localizado mais internamente, o qual envolve com uma bainha fina as fibras individuais do músculo esquelético; o perimísio, o qual faz o papel de interligação entre os fascículos; e o epimísio, tecido localizado mais externamente, o qual reveste toda a superfície muscular (ROSS; PAWLINA, 2008; VAN DE GRAAFF, 2003).

Os músculos estriados esqueléticos são diferenciados em três tipos de fibras que podem sofrer alterações e adaptações quanto ao seu metabolismo e a sua estrutura durante a vida. Fibras Tipo 1, consideradas oxidativas, resistentes à fadiga e de contração lenta; fibras Tipo 2A, consideradas glicolíticas oxidativas, resistentes à fadiga e de contração rápida; e fibras Tipo 2B, consideradas glicolíticas, relativamente resistentes à fadiga e de contração rápida (GREFTE et al., 2007; JÄRVINEN et al., 2005; CIENA et al., 2011).

As miofibrilas são compostas por unidades cilíndricas e longitudinais, denominadas de sarcômeros, com uma arquitetura extremamente consistente e papel importante na transdução de sinal químico em energia mecânica contrátil (RIGOARD et al., 2009).

Os sarcômeros são as menores unidades funcionais da contração muscular, delimitadas em cada extremidade por uma linha escura e estreita conhecida como linha Z, entre as linhas Z, encontra-se uma banda Isotrópica, denominada banda I, composta por uma matriz de filamentos finos denominados de actina. No centro do sarcômero, encontra-se a banda A, com uma coloração escura e composta por uma matriz de filamentos grossos denominados de miosina, dividida por uma zona menos densa devido à ausência de sobreposição de filamentos finos quando há relaxamento do sarcômero, denominada zona H, na qual encontra-se uma estreita faixa denominada linha M (LAING; NOWAK, 2005; CRAIG; PADRÓN, 2004).

O músculo esquelético possui uma capacidade adaptativa de alterar suas propriedades estruturais e funcionais conforme os estímulos recebidos do ambiente externo, denominada plasticidade muscular (SCOTT; STEVENS; BINDER-MACLEOD, 2001; BALDWIN; HADDAD, 2002; OLIVEIRA et al., 2014).

O músculo sóleo, como o próprio nome indica, tem a forma plana em sua espessura (SCHAFER; SYMINGTON; BRYCE, 1923), é um músculo largo, grande e achatado, com origem na região superior da fíbula, septo intermuscular e na linha

solear da tíbia. Apresenta um papel postural devido a elevada constituição por fibras musculares do Tipo I, responsável pela flexão plantar, que atuará no salto, marcha e flexão da perna (STANDRING et al., 2005; MCCRAW; ARNOLD, 1987; MACEDO FILHO et al., 1995).

2.2 Tendão

O tendão é uma estrutura anatômica a qual está localizado entre os músculos e ossos, constituído em sua maior parte por colágeno. Apresentam coloração branca e reluzente e grande resistência a cargas mecânicas devido a sua textura fibro-elástica, tem como principal função, a transmissão da força gerada nos músculos aos ossos, que resulta no movimento das nossas articulações (KANNUS, 2000; BIRCH, 2007). Além disso, atuam por meio de ações biomecânicas e biológicas na homeostasia do organismo, e pode variar em sua forma, disposição, largura e espessura (BUTLER; JUNCOSA; DRESSLER, 2004; KJAER, 2004).

Os tendões são tecidos conjuntivos constituintes de fibras de colágeno paralelas e propagadas através de uma matriz extracelular (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004). Existem diversos tipos de colágeno no tecido tendíneo, entretanto o colágeno Tipo I constitui cerca de 95% dentre os outros presentes, e tem uma relação com o colágeno do Tipo V em regular o diâmetro da fibrila durante a maturação e envelhecimento, em contrapartida, o colágeno do Tipo III diminui conforme a síntese do colágeno do Tipo I (AMIEL et al., 1984; NIYIBIZI et al., 2000).

Ao nível microscópico as células tendíneas, os tenoblastos e tenócitos, representam cerca de 90-95% dos elementos celulares do tendão (DORAL et al., 2010). Os tendões apresentam em recém-nascidos elevada proporção de tenoblastos distribuídos longitudinalmente e paralelamente, em jovens, esta proporção diminui gradualmente de células por matriz, e os tenoblastos antes caracterizados por apresentar tamanhos e formatos variados, assemelham-se, e apresentam apenas o formato fusiforme (IPPOLITO et al., 1980; CHUEN et al., 2004), capaz assim de sustentar o conceito de elevada atividade metabólica dessas células como a intensa síntese dos elementos da matriz extracelular (STANLEY et al., 2007).

Ao longo do processo natural de envelhecimento, ocorre diversas alterações com as células tendíneas, e os tenoblastos, diminui progressivamente e passam a

ser denominados de tenócitos na fase adulta, caracterizados por apresentarem formatos mais alongados capaz de garantir a interação celular e compensar sua diminuição e o aumento da matriz durante o envelhecimento. Os tenócitos em seu aspecto morfológico, assemelham-se com uma aranha e sintetizam diversas proteínas na matriz extracelular como por exemplo o colágeno, organizado e constituído por um arranjo de feixes primários e secundários paralelos diminuídos conforme à área de inserção tendínea (IPPOLITO et al., 1980; MOORE; DE BEAUX, 1987; BUTLER et al., 1990).

2.3 Junção Miotendínea

A área de interação entre o tecido muscular e o tendão é conhecida como uma região altamente especializada e complexa do sistema muscular esquelético denominada de junção miotendínea (TIDBALL, 1991).

A junção miotendínea (JMT) tem como função principal, transmitir a força gerada nas contrações musculares pelas proteínas contráteis para as proteínas do tecido conjuntivo do tendão, age na força motriz, estabilidade e posicionamento das articulações, auxilia o controle dos movimentos, armazena e libera energia elástica (KANNUS et al., 1992; TROTTER, 2002), além de ser caracterizada como a principal região de predisposição à lesões durante esforços excessivos e contrações excêntricas (TIDBALL; SALEM; ZERNICKE, 1993).

A formação da junção miotendínea ocorre de forma gradual e contínua através da tensão gerada nas contrações musculares nos períodos embrionários finais e neonatais iniciais (BENJAMIN; RALPHS, 2000; YAMASHITA et al., 2007; KOSTROMINOVA et al., 2009; CIENA et al., 2012). O seu desenvolvimento se sucede através das ligações entre o músculo esquelético e elementos da matriz extracelular (RODRIGUEZ-GUZMAN et al., 2007; TIDBALL; SALEM; ZERNICKE, 1993).

Morfologicamente, as extremidades das fibras musculares apresentam uma alta quantidade de projeções sarcoplasmáticas direcionadas para a matriz extracelular, incisões estas, responsáveis em aumentar a área de contato de fixação das fibras musculares ao tecido tendíneo (AIJIRI et al., 1978; DECONINCK et al., 1997; HUIJING, 1999).

Recentes estudos constataram características morfológicas adjacentes às

projeções na região da junção miotendínea denominadas de invaginações sarcoplasmáticas ou “interdigitações”, estruturas estas, longas e delgadas oriundas da matriz extracelular (CIENA et al., 2010). Características relatadas recentemente, revelaram uma plasticidade tecidual na região da JMT, no qual toda extensão de sua área sofre diversas alterações morfológicas de acordo com o envelhecimento e ação da gravidade, além da capacidade de adaptações e/ou evoluções presentes nos músculos esqueléticos de acordo com sua sintopia, topografia, funções e alterações morfológicas nas fibras musculares em questão (CIENA et al., 2011; CIENA et al., 2012; ROFFINO et al., 2006).

2.4 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo crescente, natural, contínuo e irreversível, que promove alterações e desgastes em vários sistemas funcionais (FIEDLER; PERES, 2008). A capacidade funcional é um dos principais marcadores do processo natural de envelhecimento e uma melhor qualidade de vida, desta forma, a preservação desta capacidade, é um fator determinante para otimizar a qualidade de vida de idosos e futuras patologias associadas à esse processo (GOBBI, 1997). A atividade física destaca-se como uma alternativa de minimizar os declínios físicos acompanhados do envelhecimento, constatadas melhoras significativas na saúde e aptidão funcional (BOCALINI; SANTOS; SERRA, 2008).

O envelhecimento está relacionado com a perda progressiva de massa muscular, força e qualidade, uma condição descrita como sarcopenia, um quadro que se tornou grande preocupação de saúde pública para o envelhecimento da população atual (KO et al., 2014).

O termo sarcopenia foi descrito por Irwin Rosenberg na década de 80 associados aos termos gregos sarcomalacia ou sarcopenia, para descrever a diminuição da massa magra com a idade (ROSENBERG, 1989).

Em 2009, o Grupo de Trabalho Europeu sobre sarcopenia em idosos (EWGSOP) já tinha definido sarcopenia como uma síndrome caracterizada pela perda progressiva e generalizada da massa muscular esquelética e força com um risco de resultados adversos, tais como deficiência física, má qualidade de vida e morte (CRUZ-JENTOFT et al., 2010).

A redução da massa muscular é causada por múltiplos mecanismos, incluindo preferencial atrofia da fibra muscular-tipo II, como resultado da morte do neurônio motor, a inatividade física, status hormonal alterado, diminuição da ingestão calórica e proteica, mediadores inflamatórios, estresse, e alteração da síntese de várias proteínas (HUNTER; MCCARTHY; BAMMAN, 2004; DOHERTY, 2003; MACALUSO; DE VITO, 2004).

2.5 Ovariectomia

Modelos experimentais que simulam os sinais e sintomas da menopausa são empregados para analisar os seus efeitos em diversos sistemas do corpo humano.

O procedimento de ovariectomia é caracterizado pela remoção bilateral dos ovários, no qual gera mudanças desde hormonais até a redução do tamanho do útero (CHANG et al., 2010). A redução dos hormônios estrógeno e progesterona provenientes da remoção dos ovários, resulta na diminuição da área de secção transversa dos músculos, no qual provoca um quadro conhecido como sarcopenia (YWAZAKI, 2012). O declínio prolongado do hormônio esteroide estrógeno ocasiona um processo de perda de densidade no interior da fibra muscular, o qual diminui seu sarcoplasma, responsável pela perda de espessura, do tônus e da força do músculo esquelético (ZAMMIT; BEAUCHAMP, 2001; KAHLERT et al., 1997; TIIDUS et al., 2001).

Modelos experimentais em ratas foram observado aumento significativo da massa corporal e atrofia uterina em comparação com ratas não submetidas à ovariectomia (HØEGH-ANDERSEN et al., 2004).

2.6 Exercício Físico

O exercício físico tem sido recomendada para o tratamento e prevenção de muitas doenças crônicas associadas com o envelhecimento (KO et al., 2014). Vários estudos mostraram a melhoria na massa muscular relacionada à idade e declínio funcional com o treinamento físico (KOH; BROOKS, 2001; WATERS et al., 2003). O exercício físico estimula o metabolismo muscular, a síntese de proteínas, e a biogênese mitocondrial em idosos (MENSHIKOVA et al., 2006).

Altos níveis de atividade física retardam a diminuição da capacidade oxidativa do músculo esquelético e na sarcopenia (KENT-BRAUN; ALEXANDER, 2000).

O exercício aquático é muito utilizado como modalidade terapêutica na reabilitação de disfunções musculoesqueléticas demonstrados resultados positivos no tratamento e prevenção de diversas patologias, os efeitos desta modalidade, são variados e dependentes de fatores extrínsecos como duração, tipo e intensidade do exercício de acordo com a especificidade do indivíduo. Com isso, possui diversos efeitos fisiológicos capazes de promover um reparo tecidual devido ao aumento da circulação periférica e consequentemente um aumento no suprimento e nutrientes do músculo ativo (DEGANI, 1998; MEDEIROS et al., 2004).

Na natação, a resistência e carga imposta ao movimento se dá em função da viscosidade da água juntamente com as propriedades de flutuação do animal (SKINNER; THOMPSON, 1988). Além disso, a pressão hidrostática e o calor específico da água também fornecem fatores adicionais que podem influenciar as respostas ao exercício (CAMPION, 1990).

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo consistiu em analisar a plasticidade tecidual através da análise morfológica da junção miotendínea do sóleo em ratas *Wistar* idosas ovariectomizadas submetidas ao treinamento de natação.

3.1 Objetivos Específicos

- Analisar as características estruturais da junção miotendínea do Sóleo através do método de microscopia de luz com as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picro-Sírus (PS).
- Realizar a reação enzimática NADH-tr para a diferenciação metabólica das fibras musculares.
- Descrever aspectos tridimensionais da junção miotendínea pelo método de microscopia eletrônica de Varredura.
- Demonstrar através da Microscopia de transmissão as características ultraestruturais da junção miotendínea.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas 40 ratas idosas *Wistar*, com um ano e dois meses de idade, organizadas em 4 grupos distintos:

- **Grupo Sedentário** (n=10): animais não submetidos ao treinamento de natação e à cirurgia de remoção dos ovários-ovariectomia;
- **Grupo Treinadas** (n=10): animais submetidos apenas ao treinamento de natação;
- **Grupo Sedentário/Ovariectomizadas** (n=10): animais submetidos à cirurgia de remoção dos ovários-ovariectomia;
- **Grupo Treinadas/Ovariectomizadas** (n=10): animais submetidos ao treinamento de natação e à cirurgia de remoção dos ovários-ovariectomia.

Todos os animais foram originários do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu e mantidos em gaiolas com 5 ratas em cada no Biotério do Laboratório de Morfologia e Atividade Física do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Rio Claro. A temperatura foi controlada à 23 ± 2 °C em períodos claros/escuro de 12 horas e com água e ração balanceada “*ad libitum*”. Todos os procedimentos apresentados nesse estudo foram submetidos e aprovados ao Comitê de Ética e Pesquisa com Animais (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro-SP, N.9377.

4.2 Processo Cirúrgico - Ovariectomia

Os animais dos grupos O e OT foram anestesiados com Ketamina (50mg/kg) e Xilazina (10mg), via intraperitoneal, posteriormente submetidos a técnica de tricotomia e assepsia da região ventral. Com auxílio de um bisturi, a parede abdominal foi seccionada através de uma incisura desde a parede muscular até o cutâneo com linha de sutura de nylon nº 6.0, e a longitudinal para que os ovários sejam expostos e dissecados. Após este procedimento ocorreu a sutura e posteriormente assepsia no local da incisão cirúrgica 3 vezes ao dia durante 7 dias. Os animais foram medicados durante 4 dias no período pós operatório com

Paracetamol (300mg/kg) via bebedouro e colocados em gaiolas limpas (FERRETTI et al, 2014).

4.3 Protocolo de Treinamento

No 4^o mês pós operatório, os animais dos Grupos Treinadas, Treinadas/Ovariectomizadas foram submetidos ao protocolo de treinamento aquático (natação) em tanques retangulares, individualmente separados por tubos de PVC (cloreto de polivinila), com 24 cm de diâmetro, 50 cm de comprimento, para impedir aglomeração e dispersão, imersos à 40 cm de água aquecida a 31°C (PESTANA et al., 2012). Os animais foram semanalmente pesados em uma balança semi-analítica durante todo o experimento para a mensuração da massa corporal. Para a obtenção das sobrecargas de treinamento foram utilizados pesos de chumbo, fixados ao tórax, equivalentes a 5% da massa corporal, os quais aferidos e corrigidos semanalmente. Foram realizadas 5 sessões semanais com duração de 60 minutos cada, por um período de 8 semanas, em um total de 40 sessões (CIABATTARI; DAL PAI e DAL PAI, 2005).

4.4 Mensuração da Massa Corporal

A massa corporal dos animais foram mensuradas semanalmente em uma balança semi-analítica (Marte LC1). Foram selecionados 3 períodos: 1^o período, antes do procedimento cirúrgico – ovariectomia; 2^o período, fim do 4^o mês pós-operatório e início do protocolo de treinamento; 3^o período, término do protocolo de treinamento. Para a obtenção das médias e desvio padrão dos 3 períodos foi utilizado o programa *Microsoft Office Excel*, e realizado o tratamento estatístico através da análise de variância *ANOVA two way*, pós teste de *Bonferroni* com auxílio do software *Graph Pad 5.0*, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.5 Microscopia de Luz

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, eutanasiados (Overdose de anestésico – Ketamina 100mg/Kg, via intraperitoneal). Em seguida foram dissecadas amostras da junção miotendínea do sóleo, criofixados em nitrogênio líquido, através da alocação das amostras sobre a superfície de cortiça estabilizadas com cola biológica e untadas em talco neutro (Tragacanth, SIGMA) para prevenir artefatos, e em seguida armazenadas no Freezer -80°C. Foram realizados cortes longitudinais de 5 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM), coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina para destaque dos componentes celulares e Picro-sírius para identificação do tecido conjuntivo associado (JUNQUEIRA; BIGNOLAS e BRENTANI, 1979; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As fibras musculares foram diferenciadas em relação ao seu metabolismo, de acordo com os parâmetros metabólicos, através da reação histoquímica de NADH-tr (NADH-tr, Sigman, N8129). Este procedimento utilizou a reação de óxido-redução do ciclo de Krebs. Através de uma ação enzimática, o Nitro Blue Tetrazolium (NTB), que é um sal de coloração amarela, reduz, se torna insolúvel, e precipita, que se torna um composto de cor azul-violeta chamada de formazana. A enzima que tem como função fazer esta reação acontecer que esta localizada nas regiões fibrilares internas, mitocôndrias, e retículo sarcoplasmático das células musculares. Por essa razão, as fibras oxidativas, que contem essas organelas em maior número, destacam-se mais intensamente (CIENA et al., 2011).

As lâminas foram incubadas durante 40 minutos a 37°C, em solução de Tampão Tris (0.2M; pH 7.4), 5mg de NBT (Sigma N6876) e 12,5mg de NADH-tr. Posteriormente as laminae foram incubadas em uma sequencia de acetona (60%, 90%, 60%), álcool (do 70% ao absoluto) e diafanizadas em xilol, e posteriormente montadas com Bálsamo do Canadá sintético. As imagens foram obtidas através do microscópio de luz. (Carl Zeiss Microimaging, Axiokop 40, Göttingen, Germany).

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram utilizados 3 animais de cada grupo experimental, após serem eutanasiados (Overdose de anestésico – Ketamina 100mg/Kg, via intraperitoneal), as amostras da junção miotendínea do sóleo foram imersas em solução de *Karnovsky* modificada (glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 2%, em solução de Cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.4), durante 24 horas, a 4°C, de acordo com o método relatado por Watanabe e Yamada (1983). As amostras da junção miotendínea, após fixação, serão submetidas à técnica de criofratura, mediante ao congelamento em nitrogênio líquido. As amostras criofraturadas foram lavadas de 12 a 24 horas em solução tampão fosfato de sódio, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio, sendo desidratadas em séries crescente de álcoois (60% ao 100%) seguida de imersão em solução de acetato de isoamila 3h, a 4°C, e secas em aparelho ponto crítico Balzers CPD-30, utilizando CO₂ líquido (DURO et al., 2012; BOLINA et al., 2013). As amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas e cobertas com íons de ouro em aparelho Balzers SCD-040, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura TM 3000-Hitachi, do instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP, campus Rio Claro-SP.

4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram utilizados 2 animais de cada grupo experimental, eutanasiados (Overdose de anestésico – Ketamina 100mg/Kg, via intraperitoneal), as amostras da JMT (3mm³) do sóleo foram dissecadas e imersas em solução de Cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.4), durante 48 horas à 4°C.

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

Após a desidratação as amostras permaneceram 1 hora em uma mistura de resina (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit Electron Microscopy Sciences,

USA) e Óxido de Propileno na proporção de 1:1, sob agitação, em temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi novamente trocada para proporção de 3:1 durante 1 hora e 30 minutos, posteriormente em resina pura durante 12 horas em temperatura ambiente com ausência de luminosidade. Após essa etapa as amostras foram aquecidas por 1 hora em estufa a 37°C, com frasco aberto para total evaporação de líquidos das amostras.

Para a inclusão das amostras em moldes retangulares de silicone, que foram preenchidos por resina pura e mantidos por 3 dias em estufa a 60°C para concretizar-se a polimerização do bloco. Os blocos foram trimados para a realização de cortes semifinos de 10µm em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Germany), e corados com o método de azul de toluidina 1%. As imagens foram obtidas por meio do fotomicroscópio Carl Zeiss Microimaging (Axiokop 40, Göttingen, Alemanha). Após selecionada a área de interesse, foram realizados cortes ultrafinos de 60 nanômetros em ultramicrotomo, que foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uralina à 4%, por 3 minutos, lavados em água destilada, contrastados em solução aquosa de citrato de chumbo à 0.4% por 3 minutos e lavados em seguida com água destilada (CIENA et al., 2012). As telas foram examinadas através do microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100, laboratório de microscopia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP, campus de Rio Claro-SP.

4.8 Análise Morfométrica

Para análise morfométrica foram mensurados 30 comprimentos e 60 espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas. Para obtenção dos dados foi utilizado o software ImageJ®. Após definir o tamanho da barra em pixels com a ferramenta “Straight Line” foi determinada a escala da imagem na opção “Analyze” posteriormente “Set Escala” e então substituído o valor na caixa “Know Distance” para o valor na barra, unidade de escala em nm “Unit of Length”. Após coletadas as mensurações, foram realizadas as médias e desvio padrão com o software Excel™ e realizada o tratamento estatístico através do software Graph Pad Prism 5.0 e realizada a análise de variância ANOVA Two- Way com pós teste de BomFerroni.

5. RESULTADOS

Mensuração da massa corpórea

MASSA CORPORAL			
GRUPOS	PERÍODOS		
	1°	2°	3°
Sedentário	350,11 ± 37,15	368,42 ± 30,7 ▲	377 ± 42,44 ∞
Treinadas	343,6 ± 36,03	374 ± 39,18	336,57±40,75 §
Ovariectomizadas	345,3 ± 19,38	408 ± 21,78	404,8 ± 28,33 •
Ovariectomizadas Treinadas	317,3 ± 26,35	370,77± 35,69	322 ± 15,84

Tabela 1. Médias e Desvio padrão da massa corporal dos animais dos Grupos S, T, O e OT em períodos distintos.
($p < 0,05$) ▲ S ≠ O; ∞ S ≠ OT e ($p < 0,001$) § O ≠ T; • O ≠ OT.

A Tabela 1 apresenta os valores de média e desvio padrão da massa corporal dos Grupos S, T, O e OT em três períodos distintos. O primeiro período é denominado de pré-operatório, o segundo pós operatório/pré treinamento, e o terceiro pós-treinamento. A partir da análise estatística realizada pelo *software* Graph Pad 5.0, foi possível estabelecer diferenças entre as massas corporais dos grupos em cada período. No Grupo S houve um equilíbrio nas médias de massa corporal nos três períodos, o que mostra a sua eficácia como grupo controle na relação de futuros parâmetros; No Grupo T observa-se uma disparidade entre o 2° e 3° período nas médias de massa corporal, houve uma redução de 374 ± 39,18 à 336,57±40,75 respectivamente devido a realização do protocolo de treinamento como ferramenta de estudo; No Grupo O, observa-se um acréscimo nos valores de massa corporal entre o 1° e 2° período de 345,3 ± 19,38 à 408 ± 21,78 devido a realização do processo de Ovariectomia resultante de um aumento no tecido adiposo; Já o Grupo OT, observa-se uma grande diferença dos valores entre os períodos, com um acréscimo entre o 1° e 2° período de 317,3 ± 26,35 à 370,77± 35,69 devido a Ovariectomia, e com o decréscimo entre o 2° e 3° período de

370,77 $\pm$ 35,69 à 322 $\pm$ 15,84 em virtude da realização do protocolo de treinamento. No primeiro período (pré-operatório) não houve diferenças significativas devido a homogeneidade da massa corporal entre os Grupos de estudo; No 2º período (pós-operatório/pré-treinamento), houve um desequilíbrio no aumento da massa corporal no Grupo O em relação aos Grupos S e T devido a realização da Ovariectomia; Já no 3º período é nítido os efeitos benéficos do exercício físico com as reduções nos valores de massa corporal nos Grupos T e OT em comparação aos Grupos S e O no período denominado de pós-treinamento.

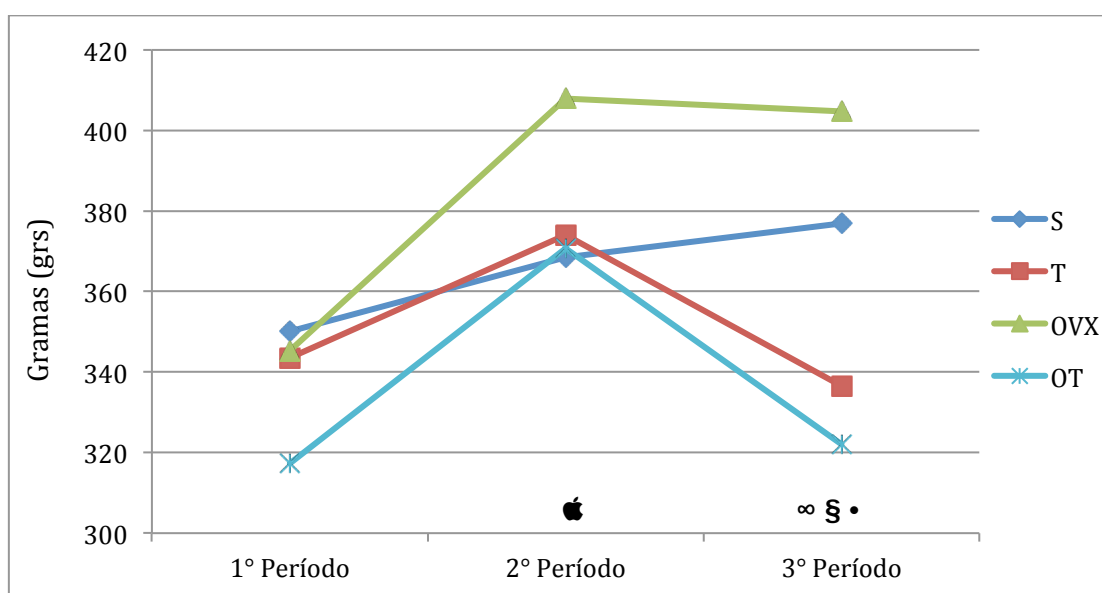


Gráfico 1. Valores das médias da massa corporal dos Grupos S, T, O e OT nos períodos.
($p < 0,05$) 🍏 S $\neq$ O; ∞ S $\neq$ OT e ($p < 0,001$) § O $\neq$ T; • O $\neq$ OT.

O Gráfico 1 apresenta a disposição linear da média da massa corporal dos Grupos S, T, O, OT em seus três períodos distintos representados nos dados da Tabela 1. No Grupo S não houve diferenças estatísticas significativas; No grupo T houve uma redução de 10% na massa corporal entre o 2º e 3º período; No Grupo O, houve um aumento de 18% nos valores de massa corporal entre o 1º e 2º período; No Grupo OT houve uma oscilação na massa corporal com um aumento de 16,85% entre o 1º e 2º período, e uma redução de 13,16% entre o 2º e 3º período. No 2º período, houve uma diferença estatística significativa resultante da Ovariectomia com um aumento de 10,74% no Grupo O em relação ao Grupo S; No 3º período foi o que apresentou as maiores alterações com a aplicação do protocolo de treinamento, com um aumento expressivo de 20,2% na massa corporal do Grupo O em relação

ao Grupo T, e uma redução de 14,58% e 20,45% do Grupo OT em relação aos Grupos S e O respectivamente.

Microscopia de Luz

Foram realizados cortes longitudinais nas amostras da junção miotendínea do sóleo e posteriormente realizadas técnicas histológicas com as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), Picro-sírius (PS) e reação enzimática através do NADH-tr em todos os Grupos: S, T, O e OT a fim de evidenciar as características morfológicas da região de interface da JMT.

No Grupo S foram evidenciados os componentes celulares na região da JMT, foram notadas as comunicações celulares através de projeções entre feixes das fibras tendíneas e musculares com a presença de inúmeros núcleos ovais das células musculares e alongados tenócitos ao longo do eixo longitudinal da junção (Fig. 1A). Foram identificadas na disposição entre as células musculares e tendíneas a interação com o tecido conjuntivo associado (Fig. 1E). Na interface destacam-se a disposição distal dos feixes de fibras longitudinais em destaque seu metabolismo oxidativo (Fig. 1I).

No Grupo T foram evidenciados na JMT as disposições das amplas e longas projeções entre os arranjos das fibras musculares e tendíneas dispostas paralelamente ao eixo longitudinal da fibra muscular. Nesta área apresentaram-se alta densidade dos tenócitos com formatos ovais amplamente distribuídos e organizados (Fig.1B). Foram identificadas na região de interface as projeções alongadas constituídas por tecido colágeno provenientes da matriz extracelular (Fig.1F). Na região de interface notaram-se as amplas projeções provenientes da interação do tecido tendíneo e do metabolismo oxidativo das fibras musculares (Fig.1J).

No Grupo O foram observadas amplas alterações através das reduzidas projeções provenientes da interação do tecido tendíneo da matriz extracelular com menor área de contato com a célula muscular na interface da JMT. Na ampla área de tecido conjuntivo foram observados a distribuição heterogênea dos tenócitos com formatos fusiformes (Fig.1C). Em toda área de disposição entre os feixes de fibras musculares e fibras de colágeno, foram apresentadas atenuação da interação do tecido colágeno do tendão com limitadas projeções provenientes da matriz

extracelular (Fig.1G). Na extremidade das fibras musculares foram destacadas o alto nível de fibras oxidativas em menor área de interação miotendínea (Fig.1K).

No grupo OT foram demonstradas a reorganização do arranjo das células musculares e tendíneas em toda região da JMT, com inúmeros tenócitos e vasta distribuição em toda área de interação (Fig.1D). No tecido tendíneo destacaram-se a ampla área de tecido conjuntivo denso com longas projeções adjacentes às fibras musculares em destaque (Fig.1H). Foram evidenciadas a interação do tecido muscular com o tecido tendíneo e sua ampla densidade de fibras oxidativas (Fig.1L).

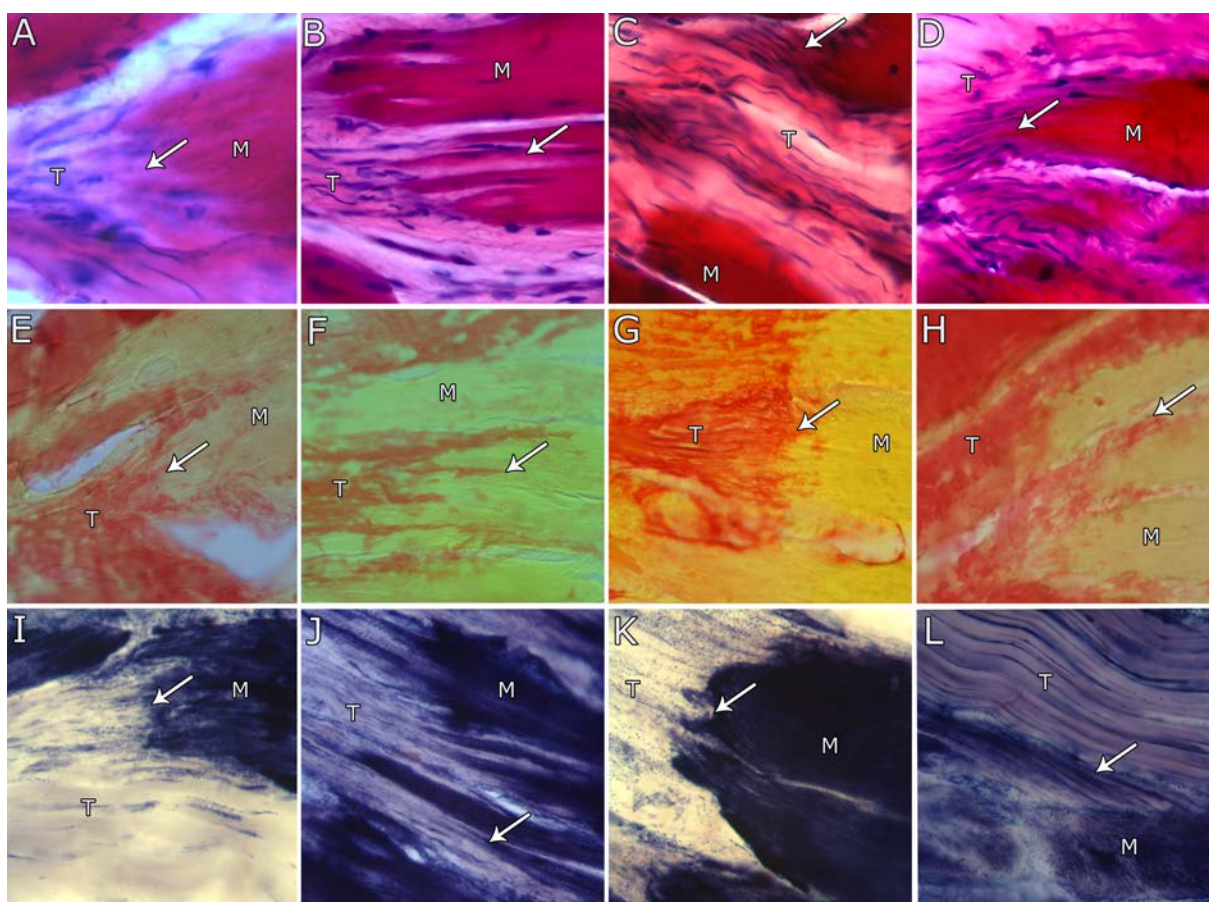


Figura 1. Microscopia de Luz da JMT do Sóleo. Grupo S (A, E, I); Grupo T (B, F, J); Grupo O (C, G, K); Grupo OT (D, H, L). Observam-se o tecido muscular (M); tecido tendíneo (T); interface miotendínea (setas). Colorações : HE (A, B, C, D); PS (E, F, G, H); Reação Histoquímica NADH-tr (I, J, K, L) (40x).

Microscopia Eletrônica de Varredura

Através da técnica convencional e de criofratura da microscopia eletrônica de varredura foram descritos os aspectos tridimensionais da região da junção miotendínea do sóleo.

No Grupo Sedentário foi possível revelar as características morfológicas estruturais na área de interface ao evidenciar a disposição das fibras musculares organizadas em fascículos, estes envolvidos por feixes de fibras colágenos que constituem o perimísio. Notaram-se a presença de projeções do tecido conjuntivo associado na região de interface.

No Grupo Treinadas destacaram-se as características morfológicas tridimensionais ao revelar a disposição longitudinal das fibras musculares ao comunicar-se com a ampla área de feixes de fibras de colágeno, estas propagadas da matriz extracelular com disposições onduladas e paralelas ao eixo da junção miotendínea. Nota-se as estriações da unidade funcional do tecido muscular.

No Grupo Ovariectomizadas foram reveladas os aspectos e a organização da ampla área de tecido conjuntivo denso próximo à região de interface da JMT, com superficiais projeções dispostas obliquamente à fibra muscular provenientes do endomísio, este responsável pela interligação entre as fibras musculares.

No Grupo Ovariectomizadas/Treinadas foi possível evidenciar a organização dos feixes de fibras de colágeno que constituem o tecido tendíneo projetadas ao sarcolema, adjacentes a estas notam-se a disposição do eixo longitudinal das profundas fibras musculares.

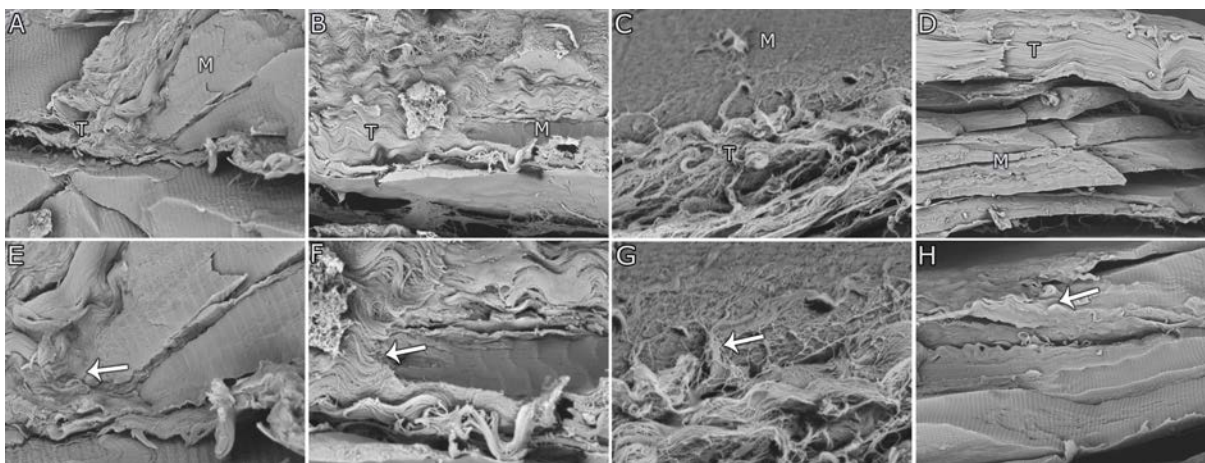


Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura da JMT do Sóleo. Grupo S (A, E); Grupo T (B, F); Grupo O (C, G); Grupo OT (D, H). Nota-se a área da junção miotendínea (setas) com a interação entre o tecido tendíneo (T) e muscular (M). Ampliações: A (1,8K); B (4K); C (5K); D (x600); E (4k); F (10K); G (10K); H (1,5K).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Através da microscopia eletrônica de transmissão foram reveladas as características e adaptações ultraestruturais da junção miotendínea do sóleo.

No Grupo S foram observadas a interação entre os feixes de miofilamentos e fibrilas de colágeno dispostos ao longo da JMT. Nesta interface, destacou-se a extremidade distal da célula muscular com formato cônico, disposição, organização dos sarcômeros em séries e na periferia notaram-se amplo grupamento mitocondrial subsarcolemal. Adjacente a esta extremidade, a interface apresentou-se margeada por elementos da matriz extracelular constituídas por “dobras” na membrana sarcoplasmática (Fig.3A). Em maior aumento, notaram-se as disposições transversais e longitudinais dos feixes de fibrilas do tecido conjuntivo provenientes da matriz extracelular que projetam-se ao longo do eixo da célula muscular que representam as invaginações sarcoplasmáticas, no qual proporcionam e delimitam as projeções de feixes de miofilamentos denominadas de evaginações sarcoplasmáticas (Fig.3E).

No Grupo T foram demonstradas em toda interface miotendínea a organização dos feixes de fibras colágenas no tecido tendíneo, com a presença de amplas e longas invaginações sarcoplasmáticas provenientes da matrix extracelular. Ao longo da JMT notam-se o arranjo longitudinal da organização dos sarcômeros em séries alinhados constituídos pelos feixes miofibrilares (Fig.3B). Em destaque, foram observadas a extremidade distal da célula muscular delimitadas pelas evaginações

sarcoplasmáticas em interação com as interdigitações, estas apresentaram formatos variados, comprimento, e espessura em sua organização tecidual (Fig.3F).

No Grupo O, foram identificadas uma ampla desorganização tecidual da célula muscular com características ultraestruturais de atrofia muscular em toda área de contato da JMT, com a presença reduzida dos feixes de miofilamentos e desalinhamento dos sarcômeros em séries. Notaram-se o aumento e localização difusa do depósito de colágeno em sua distribuição, este, apresenta desorientadas projeções caracterizadas como ramificações sarcoplasmáticas. Foram evidenciadas a presença de reduzido grupamento mitocondrial subsarcolemal e intercomunicações centrais com diferentes níveis de projeções oriundas do tecido tendíneo na extremidade lateral da JMT projetadas na direção medial da célula muscular (Fig.3C). Em maior aumento, observam-se o desarranjo das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas com a presença de diâmetros, disposições e comprimentos variados em toda interface (Fig.3G).

No Grupo OT, evidenciou a remodelação na provável re-estruturação das invaginações sarcoplasmáticas deliniadas por fibras de colágeno demarcadas em toda área de contato da interface miotendínea. Na extremidade distal da célula muscular, notaram-se a organização dos sarcômeros em séries reajustados ao longo do eixo longitudinal da JMT, estes delimitados por dobras no sarcolema caracterizadas como evaginações sarcoplasmáticas (Fig.3D). Em maior aumento, foram evidenciados a reorganização entre os feixes miofibrilares e fibrilas de colágeno do tendão com a presença de fragmentos celulares citoplasmáticos de tenócitos em toda área da JMT (Fig.3H).

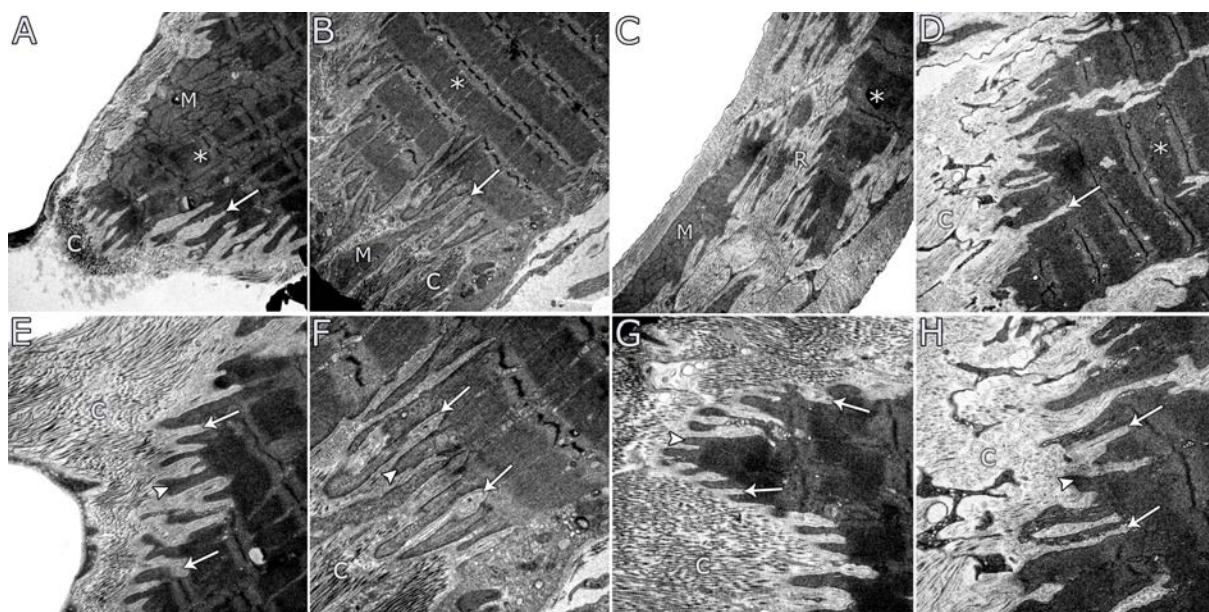


Figura 3. Microscopia Eletrônica de Transmissão da JMT do Sóleo. Grupo S (A, E); Grupo T (B, F); Grupo O (C, G); Grupo OT (D, H). Observam-se a disposição da organização dos sarcômeros em séries (*); feixes de fibras de colágeno (c); Invaginações sarcoplasmáticas (setas); Evaginações sarcoplasmáticas (cabeça de setas); Grupamento mitocôndrial subsarcolemal (M); Ramificações sarcoplasmáticas (R). Ampliações: (A, B, C, D) 7,5K; (E, F, G, H) 12K.

ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Comprimento de Invaginações e Evaginações

Análise Morfométrica	Sedentário	Treinado	Ovariectomizado	Ovariectomizado Treinado
C.Invaginação	0,548 ± 0,213	1,205 ± 0,590••	0,352 ± 0,125	0,660 ± 0,390*
C.Evaginação	0,448 ± 0,150	0,691 ± 0,290•	0,384 ± 0,192	0,561 ± 0,305*

Tabela 2. Médias e Desvio padrão do comprimento das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, O e OT.

($p < 0,05$) *O ≠ OT; ($p < 0,01$) • S ≠ T; ($p < 0,001$) •• S ≠ T

Espessura de Invaginações e Evaginações

Análise Morfométrica	Sedentário	Treinado	Ovariectomizado	Ovariectomizado Treinado
E.Invaginação	0,127 ± 0,047	0,075 ± 0,020•	0,082 ± 0,023🍏	0,111 ± 0,041*
E.Evaginação	0,118 ± 0,033	0,134 ± 0,034	0,082 ± 0,009🍏	0,173 ± 0,067*

Tabela 3. Médias e Desvio padrão das espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas dos Grupos S, T, O e OT.
($p < 0,001$) •S ≠ T; 🍏 S ≠ O; *O ≠ OT

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho evidenciaram a plasticidade tecidual e as adaptações morfológicas estruturais, tridimensionais e ultraestruturais da junção miotendínea do sóleo de ratas idosas submetidas ao modelo experimental de ovariectomia e protocolo de treinamento aquático.

No presente estudo nossos resultados apresentaram alteração nos valores da massa corporal descritos nos grupos S, T, O, OT em seus três períodos distintos, no qual o grupo T houve uma adaptação com a redução de 10% da massa corporal entre o 2º e 3º período, devido a realização do protocolo de treinamento aquático, e redução de 13,16% no grupo OT entre o 2º e 3º período, mediante as adaptações músculo-tendíneas devido ao exercício físico de natação atuar com atividade aeróbica para minimizar os efeitos deletérios provenientes do procedimento cirúrgico-ovariectomia. Além disso, em nossos achados foram observados um aumento expressivo na massa corporal do grupo O de 18% e 16,85% no grupo OT entre o 1º e 2º período, em decorrência do modelo experimental de ovariectomia. No 2º período, houve diferença estatística significativa, ao apresentar redução de 10,9% na massa corporal do grupo T em relação ao grupo S, e um aumento significativo de 10,74% no grupo O em relação ao S. No 3º período foi o que apresentou as maiores

alterações com um aumento de 20,2% do grupo O em relação ao T e uma redução 20,45% do grupo OT em relação ao grupo O, corroborando com os achados de Ferreti et al., (2014) onde foram descritos as adaptações da massa corporal em animais devido ao desequilíbrio metabólico ocorrido em função dos baixos níveis de hormônios sexuais circulantes com o procedimento de ovariectomia. Modelos experimentais em ratas foram observado aumentos significativos da massa corporal e atrofia uterina em comparação com ratas não submetidas à ovariectomia de acordo com Høegh-Andersen et al. (2004).

O exercício físico tem sido recomendado para o tratamento e prevenção de muitas doenças crônicas associadas com o envelhecimento (KO et al., 2014). Vários estudos mostraram melhoras na massa muscular relacionada à idade e declínio funcional com o treinamento físico (KOH; BROOKS, 2001; WATERS et al., 2003), o exercício físico estimula o metabolismo muscular, a síntese de proteínas, e a biogênese mitocondrial em idosos (MENSHIKOVA et al., 2006). O envelhecimento é um processo crescente, natural, contínuo e irreversível, que promove alterações e desgastes em vários sistemas funcionais em nosso tecido biológico humano (FIEDLER; PERES, 2008). De acordo com Ko et al. (2014) o processo fisiológico do envelhecimento esta diretamente relacionado com a perda progressiva de massa muscular, força e qualidade de vida, uma condição esta descrita como sarcopenia, um quadro que se tornou grande preocupação de saúde pública para o envelhecimento da população idosa atual. O termo sarcopenia foi descrito por Irwin Rosenberg na década de 80 associados aos termos gregos sarcomalacia ou sarcopenia para descrever a diminuição da massa magra em decorrência com a idade (ROSENBERG, 1989).

Foram observados e descritos no presente estudo as características morfológicas da região de interface da JMT, no qual foram evidenciados os componentes celulares e suas comunicações através de projeções entre feixes das fibras tendíneas e musculares com a presença de inúmeros núcleos ovais das células musculares e alongados tenócitos ao longo do eixo longitudinal da junção. Além disso, foram descritos os aspectos tridimensionais da região da junçãomiotendínea do sóleo em ratas idosas, onde foi possível revelar as características morfológicas estruturais na área de interface ao evidenciar a disposição das fibras musculares organizadas em fascículos e a presença de projeções do tecido conjuntivo associado na região de interface. Segundo Tidball 1991, a região de

interface miotendínea é uma área anatômica altamente complexa e especializada de interação entre o tecido muscular e tendínea. De acordo com Cien et al., (2012) a região da JMT podem ser evidenciadas nas extremidades distais da musculatura esquelética em relação ao seu ventre muscular próximos ao seu ponto móvel de inserção tendínea no qual suas adaptações são descritas de acordo com sua sintopia, função, disposição, topografia e composição histoquímica. Sua principal função é da transmissão de força gerada através das proteínas contráteis intracelulares do músculo para as proteínas do tecido conjuntivo do tendão que resultará nos movimentos de nossas articulações (KANNUS et al., 1992).

Foram observados adaptações celulares na morfologia da JMT, evidenciadas no Grupo T as disposições das amplas e longas projeções entre os arranjos das fibras musculares e tendíneas dispostas paralelamente ao eixo longitudinal da fibra muscular constituídas por tecido colágeno provenientes da matriz extracelular e as características morfológicas tridimensionais ao revelar a disposição longitudinal das fibras musculares ao comunicar-se com a ampla área de feixes de fibras de colágeno. Nesta área apresentaram-se alta densidade dos tenócitos com formatos ovais amplamente distribuídos e organizados. Kojima et al. (2008) relataram as adaptações ultraestruturais na JMT mediante a realização do protocolo de treinamento realizados em esteiras, no qual avaliaram as possíveis alterações nos ângulo e disposições no processos semelhantes a “dedos”, “finger-likes, dos músculos tibial anterior e gastrocnemius de ratos adultos. Além disso Curzi et al. (2015) avaliaram e descreveram a nível ultraestrutural a capacidade do treinamento aeróbico de induzir e modificar a região da JMT do músculo gastrocnemio em aumentar a área de contato entre os tecidos muscular e tendíneo em correlação com proteínas moduladoras desta área altamente especializada.

No Grupo O foram observadas amplas alterações através das reduzidas projeções provenientes da interação do tecido tendíneo da matriz extracelular com menor área de contato com a célula muscular na interface da JMT, distribuição heterogênea dos tenócitos com formatos fusiformes e organização tridimensional da ampla área de tecido conjuntivo denso próximo à região de interface da JMT, possivelmente devido a diminuição dos níveis dos hormônios estrógeno e progesterona, estes, com atuação direta na morfologia e organização da JMT devido a seu papel com o desenvolvimento e maturação da homeostasia nos tecidos biológicos humano e hipoatividade, atua diretamente na deposição de tecido

adiposo, síntese de proteínas e relação com fatores de crescimento como insulina e hormônios tireóideos, diminui o nível de colesterol no sangue, auxilia no desenvolvimento inicial do embrião e na implantação do ovócito fecundado.

No grupo OT foram demonstradas a reorganização do arranjo das células musculares e tendíneas em toda região da JMT, com inúmeros tenócitos e vasta distribuição em toda área de interação miotendínea, além disso, foram demonstradas as adaptações tridimensionais dos feixes de fibras de colágeno que constituem o tecido tendíneo projetadas ao sarcolema. Essa reorganização das estruturas na morfologia da JMT são possivelmente decorrentes a ampla capacidade de plasticidade tecidual nessa região associada com as adaptações mediante a realização do protocolo de treinamento físico, este extremamente importante e eficaz para manutenção e reabilitação dos possíveis efeitos deletérios da simulação dos sintomas da menopausa capaz de aumentar a capacidade contrátil muscular e sua resistência mediante as ações diárias e qualidade de vida.

Segundo Rodriguez-Gusman et al. (2007), o desenvolvimento da JMT está diretamente relacionada com a influência da interação dos mioblastos e elementos da matriz extracelular, bem como pela interação prática entre os tecidos muscular e tendíneo (Tozer; Duprez, 2005). A capacidade da célula muscular de se contrair e produzir tensão são apresentadas durante as últimas semanas de vida uterina e as primeiras do período neonatal, estas apresentam alta atividade celular na região de interface, fundamental para sua formação estrutural na fase adulta e as possíveis alterações com o envelhecimento (Ciena, doutorado). Segundo Stanley et al., (2007) revelam características morfológicas que sustentam o conceito de elevada atividade metabólica na intensa síntese de elementos da matriz extracelular próximos à JMT. Segundo Chuen et al. (2004), o tecido tendíneo durante o desenvolvimento apresenta elevada quantidade de células progenitoras, estas denominadas de tenoblastos no qual estão localizados entre feixes de fibras colágenas provenientes da matrix extracelular. Moore e De Beaux (1987) descreveram que os tenoblastos transformam-se em tenócitos que se tornam alongados com o tempo, a região do núcleo aumenta em relação ao citoplasma, e suas extensões se tornam longas e delgadas oriundas do corpo celular. Knoblock (2008) descreve que os tenócitos são células tendíneas fusiformes, do tipo celular primária e estão situados no tendão e que são sustentados por uma intrincada rede microvascular que lhes permite manter-se em seu ambiente extracelular. Em secções transversas, o aspecto morfológico

dos tenócitos e suas projeções assemelham-se com uma aranha.

Foram evidenciadas em toda interface, a disposição distal dos feixes de fibras longitudinais com suas amplas e longas projeções provenientes da interação do tecido tendíneo com o alto nível das fibras musculares com metabolismo oxidativo. O sóleo é um músculo largo, grande e achatado, com origem na região proximal e posterior da fíbula, septo intermuscular e na linha solear da tíbia. Responsável pela flexão plantar do tornozelo, apresenta um papel postural antigravitacional devido a elevada constituição por fibras musculares do Tipo I, estas consideradas oxidativas, resistentes à fadiga e de contração lenta (STANDRING et al., 2005; MCCRAW; ARNOLD, 1987; MACEDO FILHO et al., 1995). Além disso, a proporção dos tipos de fibras nos músculos esqueléticos podem sofrer adaptações e alterações ao longo da vida e drasticamente em idades avançadas (JÄRVINEN et al., 2005).

Foram relatados no presente trabalho as características e adaptações ultraestruturais da junçãomiotendínea do sóleo de ratas idosas ovariectomizadas, observadas à interação entre os feixes de miofilamentos e fibrilas de colágeno dispostos ao longo do eixo longitudinal da JMT. A interface apresentou-se margeada por elementos da matriz extracelular constituídas por “dobras” na membrana sarcoplasmática, estas caracterizadas como invaginações sarcoplasmáticas provenientes da matriz extracelular que projetam-se ao longo do eixo longitudinal da célula muscular, no qual proporcionam e delimitam as projeções de feixes de miofilamentos denominadas de evaginações sarcoplasmáticas. Recentes estudos constataram características morfológicas na região da junçãomiotendínea denominadas de invaginações sarcoplasmáticas ou “interdigitações”, estruturas estas, longas e delgadas oriundas da matriz extracelular (CIENA et al., 2010). Na interface da JMT, os feixes miofibrilares em sua extremidade distal apresentam projeções sarcoplasmáticas alongadas em formato de “dedos”, estas envolvidas pelas invaginações sarcoplasmáticas provenientes da matriz extracelular, com aspecto de cisalhamento, no qual caracteriza a complexa estrutura do sistema muscular, denominada de evaginações sarcoplasmáticas (CIENA et al., 2010). Segundo Tidball (1994), as invaginações sarcoplasmáticas proporcionam, funcionalmente, maior relação entre os feixes de miofibrilas com o tecido conjuntivo, aumentando assim a área de contato na interface músculo-tendão e consequentemente a capacidade de resistência muscular e estabilização articular. Durante o envelhecimento o sistema muscular apresenta diversas alterações

morfológicas e funcionais que acarretam em diversas implicações aos cuidados com a saúde e aspectos sociais e culturais para a população idosa denominada de sarcopenia, estes extremamente importantes para vitalidade e qualidade de vida da mulher idosa nos dias atuais. (Cien et al., 2013)

Com a realização do protocolo de treinamento aquático foram demonstrados a organização e alinhamento do arranjo longitudinal dos sarcômeros em séries e feixes de fibrilas de colágeno, apresentados diferentes comprimentos, disposições e diâmetros dos níveis de invaginações e evaginações sarcoplasmáticas no qual irão acarretar em uma maior área de contato da JMT e consequentemente resistência muscular. Na natação, a resistência e carga imposta ao movimento se dá em função da viscosidade da água juntamente com as propriedades de flutuação do animal (SKINNER; THOMPSON, 1988). Além disso, a pressão hidrostática e o calor específico da água também fornecem fatores adicionais que podem influenciar as respostas ao exercício (CAMPION, 1990). Kent-Braun e Alexander (2000) descrevem a diminuição da capacidade oxidativa e retardo da sarcopenia através de altos níveis de atividade física. A capacidade funcional é um dos principais marcadores do processo natural de envelhecimento e uma melhor qualidade de vida, desta forma, a preservação desta capacidade, é um fator determinante para otimizar a qualidade de vida de idosos e futuras patologias associadas à esse processo (GOBBI, 1997). A atividade física destaca-se como uma alternativa de minimizar os declínios físicos acompanhados do envelhecimento, constatadas melhoras significativas na saúde e aptidão funcional (BOCALINI; SANTOS; SERRA, 2008).

Em contrapartida, com a realização do procedimento cirúrgico de ovariectomia, notaram-se características ultraestruturais de atrofia muscular com uma desorganização tecidual dos feixes de miofilamentos e desalinhamento dos sarcômeros em séries e fibrilas de colágeno, aumento do depósito de colágeno e dessarango das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas em toda interface miotendínea, alterações estas semelhantes às encontradas na JMT do músculo pterigóideo medial de ratos Wistar idoso reportadas recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (CIENA et al., 2010) que possivelmente podem contribuir com rigidez e a lesões musculares. Foram identificadas a presença de ramificações sarcoplasmáticas, estas com distribuição desorientadas, no qual formam intercomunicações centrais na célula muscular em encontro com projeções laterais

provenientes do tecido tendíneo. Corroborando com as descrições de Young et al. (2000), nas quais relata que tais terminações presentes na periferia da fibra muscular são caracterizadas por junções laterais, comunicações estas localizadas entre o sarcômero terminal e invaginações sarcoplasmáticas, responsáveis pela transmissão lateral da força, ao transmitir a tensão gerada pela contração dos feixes de miofibrilas até a matriz extracelular de fibras musculares adjacentes. Além disso notou-se a presença de grupamento mitochondrial subsarcolemal, no qual Segundo Huang et al. (2010) relatam que as mitocôndrias exercem funções vitais como respiração celular, metabolismo de substratos e contribuição na homeostasia do íon cálcio nas células musculares. Segundo Ywazaki (2012), o procedimento cirúrgico de ovariectomia é caracterizado pela perda de densidade no interior da célula muscular, capaz de desencadear inúmeros efeitos deletérios a homeostasia do tecido biológico e suas respostas em função dos baixos níveis hormonais sexuais. Estas alterações morfológicas são possivelmente decorrentes do aumento expressivo de tecido conjuntivo e da morte celular de fibras musculares em decorrência da idade e potencializadas com o procedimento de simulação dos sinais e sintomas da menopausa, ao revelar ampla plasticidade tecidual desta região associado com a adaptação a nível ultraestrutural em toda área da JMT (CIENA et al., 2013).

Entretanto, no grupo OT, foi observado uma reorganização e reestruturação da interação das invaginações e evaginações em toda interface miotendínea. Remodelação e reajuste dos feixes miofibrilares e fibrilas de colágeno do tendão com a presença de fragmentos celulares citoplasmáticos de tenócitos em toda área da JMT. De acordo com Waggett, Benjamin e Ralphs (2006) as células tendíneas estabelecem comunicações intercelulares entre si através de junções desmossomiais ou do tipo "gap". O exercício aquático é muito utilizado como modalidade terapêutica na reabilitação de disfunções musculoesqueléticas demonstrados resultados positivos no tratamento e prevenção de diversas patologias, os efeitos desta modalidade, são variados e dependentes de fatores extrínsecos como duração, tipo e intensidade do exercício de acordo com a especificidade do indivíduo. Com isso, possui diversos efeitos fisiológicos capazes de promover um reparo tecidual devido ao aumento da circulação periférica e consequentemente um aumento no suprimento e nutrientes do músculo ativo (DEGANI, 1998; MEDEIROS et al., 2004). Além disso, Goldspink (2004) enfatiza a

capacidade de remodelamento constante do músculo esquelético a diversos fatores. Shah et al., (2001) revelam a plasticidade tecidual através da hipoatividade da ação da gravidade devido a diminuição da área de secção transversa em músculos idosos e no volume total do músculo no qual revelaram características de atrofia e rigidez muscular.

No presente estudo realizamos através da análises morfométricas as mensurações dos comprimentos e espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas apresentaram amplas alterações morfológicas mediante ao procedimento de ovariectomia e ao protocolo de treinamento aquático. Foram evidenciadas a heterogeneidade das alterações nos valores de comprimento e espessura de invaginações e evaginações sarcoplasmáticas. O grupo T em relação ao grupo S um aumento no comprimento de 54% nas invaginações e 35% nas evaginações sarcoplasmáticas, no qual apresentaram concomitantemente uma redução na espessura de 41% nas invaginações e um aumento de 12% nas evaginações. O grupo O em relação ao grupo S apresentaram uma diferença estatística apenas nos valores de espessura com uma redução nas invaginações e evaginações de 35,5% e 30,% respectivamente. No entanto, o grupo OT em relação ao grupo O apresentaram diferenças estatísticas nos valores de comprimento e espessura de invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, com um aumento no comprimento de 47% das invaginações e 31,5% das evaginações e um decréscimo de 12,5% na espessura de invaginação e um acréscimo de 52,6% na espessura de evaginação. Podemos observar que com a realização do treinamento aquático houve um aumento da interação e área de contato da junção miotendínea devido ao acréscimo nos comprimentos de invaginações e evaginações sarcoplasmáticas nos Grupos T e OT. Todavia, as adaptações das reduções das espessuras das invaginações nos grupo T, O e OT apresentaram melhoras significativas na redução da espessura de evaginação sarcoplasmática do Grupo OT mediante ao processo de envelhecimento potencializado com a condição de menopausa e posteriormente tratadas com exercício físico, ao mesmo tempo com um maior aumento na espessura de evaginação sarcoplasmáticas em comparação com os Grupos T e O. Sabe-se da alta atividade celular na área de interface miotendínea, no qual essas alterações morfométricas ilustram a grande capacidade de adaptação da interface, com um provável aumento na síntese de colágeno responsáveis pelos tenócitos e consequentemente em uma maior área de contato e estabilização articular da JMT.

Pode-se observar o grande interesse nos últimos anos pelo estudo da junção miotendínea e suas possíveis relações com seu meio extrínseco e intrínseco. No qual as estruturas que compõem a JMT estudos experimentais demonstram suas características e adaptações associadas ao envelhecimento (CIENA et al., 2010), modelos na fase adulta (ST PIERRE; TIDBALL, 1994), modelos experimentais hipogravidade (ROFFINO et al., 1996 e 2006), bioengenharia “em vitro” (KOSTROMINOVA et al., 2009) e exercícios físicos (KOJIMA et al., 2008; CURZI et al., 2015).

7. CONCLUSÃO

Concluimos que:

1. O treinamento mostrou-se eficaz para manutenção do peso corporal enquanto a Ovariectomia está associada ao aumento da massa corporal;
2. A região da JMT apresentou adaptações através das longas e delgadas projeções sarcoplasmáticas mediante a realização da natação;
3. A interface revelou alta distribuição de tenócitos organizados no eixo longitudinal da JMT;
4. Na JMT do Sóleo houve intensa atividade celular de capacidade oxidativa;
5. No envelhecimento a JMT apresentou alterações nas disposições e organização das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas;
6. O treinamento aquático promoveu alinhamento e organização na JMT, com alterações no comprimento e espessura das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas;
7. Após ovariectomia a JMT revelou uma maior produção de colágeno adjacente, atrofia muscular e desorganização drástica nas invaginações e evaginações sarcoplasmáticas;
8. A intervenção através da natação no grupo ovariectomia promoveu realinhamento e reorganização da invaginação e evaginação sarcoplasmática na JMT, o que possibilitou maior área de contato, conseqüentemente menor predisposição a lesões miotendíneas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIRI, T.; KIMURA, T.; ITO, R.; INOKUCHI, S. Microfibrils in the myotendon junctions. **Acta Anatomica**, v. 102, p. 433-439, 1978.

AMIEL, L.; FRANK, C.; HARWOOD F.; FRONEK J.; AKESON W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 1, p. 257-265, 1984.

BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. **Am J Phys Med Rehabil**. V.81:S40-51, 2002.

BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. **International Review of Cytology**, v. 196, p. 85-130, 2000.

BIRCH, H. L. Tendon matrix composition and turnover in relation to functional requirements. **International Journal of Experimental Pathology**, 88, p. 241–248, 2007.

BOCALINI, D.S.; Santos L dos, Serra AJ. **Physical exercise improves the functional capacity and quality of life in patients with heart failure**. Clinics ;63:437-42, 2008.

BOLINA, C.S; BOLINA-MATOS, R. S.; ALVES, P. H. M.; CURY, D. P.; CIENA, A. P.; WATANABE, I. Three-dimensional aspects of the structural characteristics and kidney angioarchitecture of adult and aged Wistar rats: a scanning electron microscopy study. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 5, p. 538-544, 2013.

BUTLER, D. L.; SHEN, M. Y.; STOUFFER, D. C.; SAMARANAYAKE, V. A.; LEVY, M. S. Surface strain variation in human patellar tendon and knee cruciate ligaments. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 112, n. 1, p. 38-45, 1990.

BUTLER, D.L.; JUNCOSA, N.; DRESSLER, M.R. Function Efficacy of Tendon Repair Processes. **annual review of biomedical engineering**, v. 6, 303-329, 2004.

CAMPION, M. R. **Adult Hydrotherapy: a practical approach**. Oxford: Heinemann medical Books, 1990.

CHANG, TING-KUO; HUANG, CHANG-HUNG; HUANG, CHUN-HSIUNG; CHEN, HSUAN-CHIANG; CHENG, CHENG-KUNG. The Influence of Long-term Treadmill exercise on bone mass and articular cartilage in ovariectomized rats. **BMC Musculoskeletal Disorders**. 11: 185, 2010.

CHUEN, F. S.; CHUK, C. Y.; PING, W. Y.; NAR, W. W.; KIM, H. L.; MING, C. K. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, n. 9, p. 1151-1157, 2004.

CIABATTARI, O.; DAL PAI, A.; DAL PAI, V., Efeito da natação associado a diferentes dietas sobre o músculo tibial anterior do rato: estudo morfológico e histoquímico, *Revista Brasileira da Medicina do Esporte*, v. 11, n. 12, p. - , 2005.

CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; BOLINA, C.S.; BOLINA-MATOS, R. S.; ROSE ELI GRASSI RICE; MARCELO CAVENAGHI PEREIRA DA SILVA; MARIA ANGELICA MIGLINO; WATANABE, I. Ultrastructural Features of the Myotendinous Junction of the Sternomastoid Muscle in Wistar Rats: From Newborn to aging. **Microscopy Research Technique**. v. 75, p. 1292-1296, 2012.

CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.

CIENA, A. P.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; DIAS, F. J.; BOLINA, C. S.; ISSA, J. P.; IYOMASA, M. M.; OGAWA, K. Fine Structure of Myotendinous Junction Between the Anterior Belly of the Digastric Muscle and Intermediate Tendon in Adults Rats. **Micron**. V.43, p. 258-262, 2012.

CIENA, A.P.; ALMEIDA, S. R.Y.; ALVES, P.H.; BOLINA-MATOS, R. S.; DIAS, F. J.; ISSA, J. P.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Histochemical and ultrastructural changes of sternomastoid muscle in aged Wistar rats. **Micron**, v. 42, n. 8, p. 871-876, 2011.

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

CRUZ-JENTOFT, A. J.; BAEYENS, J.P.; BAUER, J.M.; BOIRE, Y.; CEDERHOLM, T.; LANDI, F.; MARTIN, F.C.; MICHEL, J-P.; ROLLAND, Y.; SCHENEIDER, S.M.; TOPINKOVA, E.; VANDERWOUDE, M.; ZAMBONI, M. Sarcopenia European Consensus on Definition and Diagnosis. **Age and Ageing**. V. 39, p. 412-423, 2010.

DECONINCK, A. E.; RAFAEL, J. A.; SKINNER, J. A.; BROWN, S. C.; POTTER, A. C.; METZINGER, L.; WATTA, D. J.; DICKSON, J. G.; TINSLEY, J. M.; DAVIES, K. E. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 717-727, 1997.

DEGANI, A.M. **Hidroterapia: os efeitos físicos, fisiológicos e terapêuticos da água**. *Fisioter Mov.* 11(1):91-106, 1998.

DOHERTY, T. J. Invited review: aging and sarcopenia. **J Appl Physiol** (1985) 2003;95:1717-27.

DORAL, M. N.; ALAM, M.; BOZKURT, M.; TURHAN, E.; ATAY, O. A.; DÖNMEZ, G.; MAFFULLI, N. Functional anatomy of the Achilles tendon. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 18, n. 5, p. 638-643, 2010.

DURO, C. C.; CIENA, A. P.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; RIGHETTI, M. M. S.; GRISOLIA, D. F.; ISSA, J. P.; DA SILVA, M. C. P.; WATANABE, I. Qualitative Study

of Young, Adult, and Aged Wistar Rats Temporomandibular Synovial Membrane Employing Light, Scanning, and Transmission Electron Microscopy. **Microscopy Research and Technique**. V.75, p.1522-1527, 2012.

FERRETTI, M.; CAVANI, F.; MANNI, P.; CARNEVALE, G.; BERTONI, L.; ZAVATTI, M.; PALUMBO, C. Ferutinin dose-dependent effects on uterus and mammary gland in ovariectomized rats. **Histology and Histopathology**. v. 29, p. 1027-1037, 2014.

FIENDLER, M.M.; PERES, K. G. **Capacidade funcional e fatores associados em idosos do Sul do Brasil: um estudo de base populacional**. Cad Saúde Pública ; 24(2):409-415, 2008.

GOBBI S. Atividade física para pessoas idosas e recomendações da Organização Mundial de Saúde de 1996. **Rev Bras Ativ Física Saúde**. V.2, p.41-49, 1997.

GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M.; TORENSMA, R.; VON DEN ROFF, J.W. Skeletal muscle development and regeneration. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 5, p. 857-868, 2007.

HØEGH-ANDERSEN, P.; TANKÓ, L. B.; ANDERSEN, T. L.; LUNDBERG, C. V.; MO, J. A.; HEEGAARD, A.; DELAISSÉ, J.; CHRISTGAU, S. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. **Arthritis Research Therapy. Denmark**, v.6 R169-80, 2004.

HUIJING, P. A. Muscular force transmission: a unified, dual or multiple system? A review and some explorative experimental results. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 292-311, 1999.

HUNTER, G. R.; MCCARTHY, J.P.; BAMMAN, M. M. Effects of resistance training on older adults. **Sports Med** 2004;34:329-48.

IPPOLITO, E.; NATALI, P. G.; POSTACCHINI, F.; ACCINI, L.; DE MARTINO, C. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendo at various ages. **The Journal of none of Joint Surgery**, v. 62, n. 4, p. 583-598, 1980.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto / atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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

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

KAHLERT, S.; GROHÉ, C.; KARAS, R.H.; LÖBERT, K.; NEYSES, L.; VETTER, H. Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. **Bioch Bioph Res Com.** p.232:373-8, 1997.

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

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

KENT-BRAUN, J.A; ALEXANDER, V. NG. Skeletal Muscle Oxidative Capacity in Young and Older Women and Men. **J Appl Physiol.** 89: 1072-1078, 2000.

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

KO, I.G.; JEONG, J.W.; KIM, Y.H.; JEE, Y.S.; KIM, S.E.; KIM, S.H.; JIN, J.J.; KIM, C.J.; CHUNG, K.J. Aerobic Exercise Affects Myostatin Expression in Aged Rat Skeletal Muscles: A Possibility of Antiaging Effects of Aerobic Exercise Related With Pelvic Floor Muscle and Urethral Rhabdosphincter. **Int Neurourol J.** v.18: p.77-85, 2014.

KOH, TJ; BROOKS, SV. Lengthening Contractions Are Not Required to Induce Protection From Contraction-Induce Muscle Injury. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2001; 281: R155-61.

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

LAING, N.G.; NOWAK, K.J. When contractile proteins go bad: the sarcomere and skeletal muscle disease. **BioEssays**, v. 27, p. 809-822, 2005.

LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. Biomechanics of tendon injury and repair, **Journal of Biomechanics**, v. 37, p. 865-877, 2004.

MACALUSO, A.; DE VITO, G. Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people. **Eur J Appl Physiol** 2004;91:450- 72.

MACEDO FILHO, A.; LAVEDONIO J. C.; CASTRO, M.; CARDOSO, M. G. **Tratamento cirúrgico para úlceras pré-tibiais utilizando retalho de músculo sóleo com fluxo invertido.** An Paul Med Cir. 1995;122(1):5-10.

MCCRAW, J. B.; ARNOLD, P. G. **Atlas of muscle and musculocutaneous flaps.** Norfolk:Hampton Press; 1987.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; NEGRÃO, D. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Braz J Med Bio Res.** 2004;37(12):1909-17.

MENSHIKOVA, E.V.; RITOV, V.B.; FAIRFULL, L.; FERRELL, R.E.; KELLEY, D.E.; GOODPASTER, B.H. Effects of Exercise on Mitochondrial Content and Function in Aging Human Skeletal Muscle. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 61:534-40, 2006.

MOORE, N. L.; DE BEAUX, A. A quantitative ultrastructural study of rat tendo from birth to maturity. **Journal of Anatomy**, v. 153, p. 163-169, 1987.

NIYIBIZI, C.; SMITH, P.; SHULER, F.D.; GERGESCU, H. I.; GHIVIZZANI, S. C. JOHNSTONE, B.; ROBBINS, P.D.; EVANS, C.H. Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: Comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. **Arthritis&Rheumatism**, v.43, p. 1156-1164, 2000.

OLIVEIRA, D. P.; ANNA CAROLINA AZAMBUJA PINHO; JAQUELINE DEL NEGRI DELISE; NUNES, M. P.; LUANA BEATRIZ MPV DINIZ; HELIO RIBEIRO NETO; HELIO BATISTA DOS SANTOS; VANESSA NEVES DE OLIVEIRA; ROSY IARA MACIEL DE AZAMBUJA RIBEIRO. Efeito da Natação Associada a Diferentes Tratamentos Sobre o Músculo Sóleo de Ratos: Estudo Histológico e Morfométrico. **Rev Bras Med Esporte.** vol. 20, Nº 1 – Jan/Fev, 2014.

PESTANA, P. R. D.; ALVES, A. N.; FERNANDES, K. P. S.; JUNIOR, J. A. S.; FRANCA, C. M.; MARTINS, M. D.; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA-FERRARI, R. A., Efeito da natação na expressão de fatores regulatórios miogênicos durante o reparo do músculo esquelético de rato, **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, v. 18, n. 6, p. - , 2012.

RIGOARD, P.; BAUCHE, S.; BUFFENOIR, K.; GIOT, J. P.; FAURE, J. P.; SCEPI, M.; RICHER, J. P.; LAPIERRE, F.; WAGER, M. Le Support Anatomique De la Contraction Musculaire. **Neurochirurgie.** v. 55, n. S1, p. S69-S82, 2009.

RODRIGUEZ-GUZMAN M, M. A. J.; SANTESTEBAN, E.; GAÑAN, Y.; MACIAS, D.; HURLE, J. M. **Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic signaling.** *Developmental Biology*, v. 302, n. 1, p. 267-280, 2007.

ROFFINO, S; CARNINO, A; CHOPARD, A; MUTIN, M; MARINI, JEAN-FRANÇOIS. Structural Remodeling of Unweighted Soleus Myotendinous Junction in Monkey. **C. R. Biologies** 329, 172–179, 2006.

ROSENBERG, I. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. **Am J Clin Nutr** 1989; 50: 1231–3, 1989.

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

SCHAFER, E. S.; SYMINGTON, J.; BRYCE, T. H. **Quain's Elements of Anatomy. Part II.** 11th Ed. New York, Longman's Green and Co. pp.67-70, 1923.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Phys Ther.** 81:1810-6, 2001.

SKINNER, A.; THOMPSON, A. **Duffield: exercícios na água.** 3ª ed. Manole: São Paulo, 1988.

STANDRING, S.; ELLIS, H.; HEALY, J. & JOHNSON D, WILLIAMS A. Gray's Anatomy. **The anatomical basis of clinical practice.** 39th Ed. New York, Elsevier, pp:1499-500, 2005.

STANLEY, R. L.; FLECK, R. A.; BECKER, D. L.; GOODSHIP, A. E.; RALPHS, J. R.; PATTERSON-KANE, J. C. Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons. **Journal of Anatomy**, v. 211, n. 3, p. 325-334, 2007.

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

TIDBALL, J. G.; SALEM, G.; ZERNICKE, R. Site and mechanical conditions for failure of skeletal muscle in experimental strain injuries. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 3, p. 1280-1286, 1993.

TIIDUS, P. M.; HOLDEN, D.; BONBARDIER, E.; ZAJCHOWSKI, S.; ENNS, D.; BELCASTRO, A. Estrogen effect on post exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and cal pain activity. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 79(5):400-6, 2001.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.** 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 684p, 2012.

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

VAN DE GRAAFF, KENT M. **Anatomia Humana** 1 ed. Barueri, SP: Manoele, 840p, 2003.

WATANABE, I; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 46, p. 173-182, 1983.

WATERS, D. L.; BROOKS, W. M.; QUALLS, C. R.; BAUMGARTHER, R. N. Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Lean Body Mass in Healthy Exercising Elderly. **Mech Ageing Dev.** 124: 301-9, 2003.

YAMASHITA, S.; MCGRATH, K. F.; YUKI, A.; TAMAKI, H.; KASUGA, N.; TAKEKURA, H. Assembly of transverse tubule architecture in the middle and myotendinous junctional regions in developing rat skeletal muscle fibers. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 28, n. 2-3, p. 141-151, 2007.

YWAZAKI, J.L. *O efeito do exercício resistido e do alongamento no músculo sóleo de ratas osteopênicas*. 2012. 76 F, **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Departamento de Educação Física, Curitiba, 2012.

ZAMMIT, P. S.; BEAUCHAMP, J. R. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68:193-204. Muscle Cell Biology Group, MRC **Clinical Sciences Centre**. **Imperial College School of Medicine**, Hammersmith Hospital. London, UK, 2001.