



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP
Instituto de Biociências – Rio Claro – SP**



**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Biologia Celular e Molecular**

JURANDYR PIMENTEL NETO

**PLASTICIDADE DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NO MÚSCULO BÍCEPS
BRAQUIAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTROFIA MUSCULAR:
ANÁLISES MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E FUNCIONAIS**

RIO CLARO - SP

2021



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP
Instituto de Biociências – Rio Claro – SP**



**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Biologia Celular e Molecular**

JURANDYR PIMENTEL NETO

**PLASTICIDADE DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NO MÚSCULO BÍCEPS BRAQUIAL
EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTROFIA MUSCULAR: ANÁLISES
MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E FUNCIONAIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena.

RIO CLARO - SP

2021

P644p Pimentel Neto, Jurandy
Plasticidade das junções comunicantes no músculo bíceps braquial em modelo experimental de hipertrofia muscular: análises morfológicas, moleculares e funcionais / Jurandy Pimentel Neto. -- Rio Claro, 2021
81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena

1. junção miotendínea. 2. junção neuromuscular. 3. exercício físico. 4. morfometria. 5. telócitos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PLASTICIDADE DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NO MÚSCULO BÍCEPS
BRAQUIAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTROFIA MUSCULAR:
ANÁLISES MORFOLÓGICAS, MOLECULARES E FUNCIONAIS

AUTOR: JURANDYR PIMENTEL NETO

ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA

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

Adriano Polican Ciena:

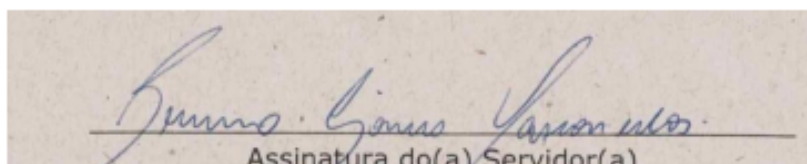
Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA (Participação Virtual)

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

Diego Corin Maldonado

Prof. Dr. DIOGO CORRÊA MALDONADO (Participação Virtual)

Departamento de Morfologia / Universidade Federal de São Paulo



Assinatura do(a) Servidor(a)

Prof. Dr. BRUNO GOMES VASCONCELOS (Participação Virtual)

Instituto de Ciências Agrárias (ICA) / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM),
Campus Unai

Rio Claro, 26 de maio de 2021

Dedicatória

Dedico este trabalho principalmente aos meus pais, José Luiz e Mereli, cujo suporte foi essencial para a realização e conclusão desta etapa.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais José Luiz e Mereli, pelo apoio incondicional que sempre me proporcionaram, não deixaram com que eu desistisse dos meus sonhos, e estiverem sempre presentes nos momentos de alegria e de tristeza por qual eu passei durante este período de grande aprendizado.

Especialmente, gostaria de agradecer a minha mãe, por ser a pessoa mais incrível e especial da minha vida, minha melhor amiga e cuidadora, paciente, sincera e razão da minha existência, esteve e está sempre ao meu lado.

Ao meu pai, por todo apoio, não mediu esforços para compreender e contribuir com minhas decisões, sempre acreditou e confiou em mim, me proporcionou todo suporte financeiro e principalmente esperança de que eu poderia um dia alcançar meus objetivos. Obrigado por tudo pai.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Polican Ciena, que esteve presente em todos os momentos, não só do mestrado, mas em toda minha vida acadêmica, sempre soube disseminar o conhecimento necessário para realização dos projetos e trabalhos, me aconselhou e ainda aconselha diante dos percalços, e foi muito mais do que um orientador, foi um grande amigo, um MESTRE.

Não poderia deixar de lado meus companheiros e amigos do Laboratório, Carolina dos Santos Jacob, Gabriela Klein Barbosa e Lara Caetano Rocha, duas grandes mestrandas e uma incrível e batalhadora doutoranda, que me conhecem bem a tempos, me aguentam, e sempre trabalham em conjunto para contribuir com o que for preciso para nossos trabalhos.

Nosso laboratório tem união, acompanhada de sabedoria e principalmente coragem. Jamais esquecerei de vocês, torço para o sucesso de todos, que continuemos nossa caminhada e não nos esqueçamos de tudo o que aprendemos, sejam nos momentos de discussões e conflitos ou de alegrias com as bolsas e premiações que todos puderam viver intensamente.

Agradecimento especial para meu antigo companheiro de LAMAF, Jossei Soares de Sant'Ana, junto a você entrei nesse laboratório e não poderia deixar isso passar sem relembrar o quanto aprendemos juntos, infelizmente nossos caminhos se separaram, mas a amizade, o respeito e a irmandade que juntos construímos permaneceu.

Aos novos companheiros André Neri Tomiate agradeço as novas contribuições com nossos queridos “telócitós” que essa parceria continue, a Bruna Alécia Christofolletti Grillo, Giovana Zerbo Martinez e Mariana Pasquini, obrigado por todos os momentos de alegria,

espero que eu possa continuar ajudando vocês de alguma forma, peço desculpas por ter sido ríspido em certas situações, vou procurar melhorar sempre, saibam que a intenção sempre foi ajudar.

Em especial, agradeço a participação do Samuel Souza Campos e Isabella Gomes que contribuíram por meio das ICs no ano de 2019, me ajudaram em grande parte do meu protocolo e me ensinaram sobre como orientar, ter paciência, não desistir e sempre ajudar o próximo, obrigado por todas as madrugadas de treinamentos e discussões.

Ao técnico José Roberto “Beto”, pela aprendizagem durante o uso do Laboratório de Morfologia, por toda ajuda durante as dissecações e durante a realização das técnicas de microscopia de luz.

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 Campus Piracicaba (ESALQ/USP), por disponibilizar o Microscópio de Luz e o Microscópio 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.

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

RESUMO

A junção neuromuscular (JNM) e a junção miotendínea (JMT) compreendem um sistema de junções comunicantes que por meio de diferentes estímulos se adaptam, alteram a sua morfologia e consequentemente a estrutura muscular. Um dos principais estímulos que contribuem com tais adaptações é o exercício físico em diferentes modalidades e aplicações para cada grupamento muscular. É comprovado que o exercício físico promove benefícios ao músculo estriado esquelético e particularmente as ultraestruturas da JMT, a morfologia da JNM e consequentemente aos sarcômeros. Desta forma os diferentes protocolos de escada vertical, que representam o modelo experimental de hipertrofia muscular, podem contribuir com as adaptações nas junções comunicantes e quando associados seus efeitos podem ser potencializados. O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as adaptações morfométricas e moleculares das junções comunicantes do músculo bíceps braquial de ratos *Wistar* adultos, em protocolos experimentais de escada vertical. Foram utilizados 60 ratos divididos em 4 grupos: Sedentário (S) - não participou de nenhum protocolo experimental; Escalada (E) - sem sobrecarga adicional; Escalada Sobrecarga (ES) - com sobrecarga adicional progressiva; Escalada/Escalada Sobrecarga (EES) - combinação dos protocolos em dias intercalados. Os protocolos (E, ES, EES) foram realizados em 24 sessões, 3x/semana por um período de 8 semanas. Estes grupos foram submetidos durante o período pré (T1) e pós (T2) protocolo a testes funcionais. A massa corporal foi avaliada em 3 períodos (P1, P2 e P3) e ao término dos protocolos amostras do músculo bíceps braquial foram dissecadas para as técnicas microscópicas e morfométricas. Em relação à massa corporal, os Grupos experimentais apresentaram aumento da massa, porém não significativo. Em relação à massa muscular, houve aumento em E, ES e EES. Os animais dos grupos E, ES e EES apresentaram melhor rendimento no desempenho funcional, no período pós protocolo, diante do aumento do teste de carga máxima carregada e no número de escaladas realizadas e redução do tempo das escaladas. Por meio da microscopia de luz foi possível revelar aumento da área nuclear e da dimensão fractal no Grupo E e ES e redução no Grupo EES. Em relação à área de colágeno observou-se aumento nos Grupos E, ES e EES. A análise de ATPase miofibrilar demonstrou aumento da área de secção transversa (AST) das fibras: Tipo I nos Grupos E, ES e EES; Tipo II em E e ES e redução em EES; Tipo IIx aumento nos Grupos E, ES e EES. Os comprimentos dos sarcômeros do ventre muscular revelaram aumento nos Grupos E e ES e redução em EES. Nos sarcômeros proximais aumentos no Grupo E, com redução nos Grupos ES e EES. Os sarcômeros distais apresentaram aumento nos Grupos E e EES e redução em ES. Em relação ao comprimento das invaginações sarcoplasmáticas observou-se aumento nos Grupos E, ES e EES, assim como sua interface miotendínea já em relação a espessura, observou-se aumento em E e EES com redução em ES. Nos comprimentos das evaginações sarcoplasmáticas houve aumento nos Grupos E, ES e EES e nas espessuras redução em E, ES e EES. A Lâmina Basal (LB) apresentou espessamento nos Grupos E e ES e redução no Grupo EES. A Camada de Suporte de Colágeno (CSC) e as fibras colágenas transversais apresentaram aumento principalmente nos Grupos E e EES. Na região pós-sináptica (JNM) a área corada apresentou redução nos Grupos E, ES e EES, a área total demonstrou redução em ES e aumento em E e EES. O perímetro corado, perímetro total e dispersão reduziram nos Grupos E, ES e EES, com aumento no diâmetro máximo nos Grupos E e EES e redução em ES. Na JMT foram imunomarcados os telócitos (CD34+) em todos os Grupos com sua ampla disposição em suas margens. Concluímos que os diferentes protocolos experimentais contribuíram com aumento da massa muscular e desempenho funcional, além de promoverem adaptações morfológicas nas junções comunicantes, principalmente no grupo sem sobrecarga (E) e no grupo de protocolos associados (EES). As alterações refletiram no sistema unidirecional da JNM até a JMT e em suas estruturas, além da associação com o nicho de telócitos e sua íntima relação com a JMT em todos os grupos.

Palavras-chave: Junção miotendínea; Junção neuromuscular; Exercício físico; Morfometria; Telócitos.

ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) and the myotendinous junction (MTJ) comprise a system of communicating junctions that, through different stimuli, adapt, alter their morphology and consequently the muscle structure. One of the main stimuli that contribute to such adaptations is physical exercise in different modalities and applications for each muscle group; it is proven to bring benefits to the striated skeletal muscle, particularly the ultrastructures of MTJ, the morphology of NMJ, and consequently to sarcomeres. In this way, the different vertical ladder protocols can contribute to the adaptations in the communicating junctions, and when associated, their effects can be potentiated. The present study's objective was to describe the morphometric and molecular adaptations of the communicating biceps brachial muscle junctions of adult *Wistar* rats in experimental vertical ladder protocols. We used 60 rats divided into 4 groups: Sedentary (S) - did not participate in any experimental protocol; Climbing (C) - performed climbs without additional overload; Overload Climbing (OC) - performed climbs with additional progressive overload; Climbing/Overload Climbing (COC) - performed interspersed climbs with and without additional progressive overload. The protocols (C, OC, COC) were performed in 24 sessions, 3x/week, for 8 weeks. These groups were submitted during the pre (T1) and post (T2) functional testing protocols. The body mass was evaluated in 3 periods (P1, P2 and P3), and at the end of the protocols, the biceps brachii muscle samples were dissected for microscopic and morphometric techniques. In relation to the body mass, the Experimental Groups presented an increase, however not significant. About the muscular mass, there was an increase in OC and not significant in C and COC. The animals of the groups C, OC, and COC presented a better performance in the functional performance, in the period after the protocol, in front of the increase of the test of maximum loaded load and the number of climbs accomplished and the reduction of the time of the climbs. It was possible to reveal an increase in the nuclear area and fractal dimension in Group C and OC and decrease Group COC through light microscopy. In relation to the collagen area, there was an increase in Groups C, OC, and COC. The myofibrillar ATPase analysis showed an increase in the cross-sectional area (CSA) of the fibers: Type I in Group C, OC, and COC; Type II in C and OC and reduction in COC; Type IIx increase in Groups C, OC, and COC. The lengths of the belly's sarcomeres revealed an increase in Groups C and OC and a reduction in COC. The proximal sarcomeres increase in Group C, with the reduction in Groups OC and COC. The distal sarcomeres showed an increase in Groups C and OC and a decrease in COC. Regarding the length of the sarcoplasmic invaginations, there was an increase in the groups E, ES, and ES, and in the thickness, there was an increase in C and COC with a reduction in OC. In the lengths of the sarcoplasmic evaginations, there was an increase in the groups C, OC, and COC, and in the thickness, there was a reduction in C, OC, and COC. The Basal Lamina (BL) showed thickening in Groups E and ES and reduction in Group EES. The Collagen Support Layer (CSL) and transverse collagen fibers increased mainly in Groups C and EES. In the post-synaptic region (NMJ), the stained area showed a reduction in Groups C, OC, and COC, the total area showed a reduction in OC and an increase in C and COC. The stained perimeter, total perimeter, and dispersion decreased in Groups C, OC, and COC, with an increase in the maximum diameter in Groups C and COC and reduction in OC. At MTJ, telocytes (CD34 +) were immunostained in all Groups with their expansive disposition on their margins. We concluded that the different experimental protocols contributed to an increase in muscle mass and functional performance and promoted morphological adaptations in the communicating junctions, mainly in the group without overload (C) and in the group of associated protocols (COC). The changes are reflected in the unidirectional system of the NMJ to the MTJ and its structures, in addition the association with the niche of telocytes and its close relationship with the MTJ in all groups.

Keywords: Neuromuscular junction; Myotendinous junction; Physical exercise; Morphometry; Telocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de ação da junção neuromuscular durante as sinapses.....	21
Figura 2. Modelo ilustrativo da junção miotendínea e seus elementos estruturais.	23
Figura 3. Modelo ilustrativo dos telócitos e micrografia de transmissão de um telócito na região da JMT.....	24
Figura 4. Diagrama cronológico dos protocolos experimentais.....	28
Figura 5. Imagens dos grupos experimentais durante a execução dos diferentes protocolos em escada vertical.....	29
Figura 6. Diagrama das mensurações realizadas a partir das técnicas de Hematoxilina e Eosina e Picro-Sirius.....	33
Figura 7. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica Histoquímica de ATPase Miofibrilar.....	34
Figura 8. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	36
Figura 9. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica de Imunofluorescência com α -bungarotoxina na junção neuromuscular.	37
Figura 10. Mensurações realizadas por meio do software ImageJ® após a aquisição das imagens de imunomarcação com α -bungarotoxina.	39
Figura 11. Massa muscular do Bíceps Braquial pós-período de protocolo.	44
Figura 12. Teste de Carga Máxima Carregada, do Número de Escaladas e do Tempo de Escalada do Teste de Carga Máxima.	45
Figura 13. Dimensão fractal dos núcleos celulares e a área composta por estes núcleos.....	46
Figura 14. Dimensão fractal da composição de tecido conjuntivo e a área de tecido conjuntivo.....	47
Figura 15. Área de Secção Transversa e Densidade Numérica dos diferentes tipos de fibra muscular.	48
Figura 16. Microscopia de Luz: cortes longitudinais da Junção Miotendínea.	49
Figura 17. Descrições morfoquantitativas dos sarcômeros do ventre, proximal e distal da junção miotendínea.....	52
Figura 18. Descrições dos elementos ultraestruturais que formam a interface miotendínea.	54
Figura 19. Descrições morfoquantitativas das espessuras da lâmina basal, da camada de suporte de colágeno e do perímetro das fibras colágenas transversais.	55

Figura 20. Descrições morfoquantitativas da fenda pós-sináptica da junção neuromuscular.	57
Figura 21. Imunomarcação da região da junção miotendínea.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa corporal de todos os grupos experimentais.	43
Tabela 2. Resultados quantitativos obtidos em todos os grupos que realizaram os protocolos em escada vertical.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

≠	Diferente
°	Graus
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
µm	Micrômetro
µm ²	Micrômetro quadrado
%	Porcentagem
AChR	Receptores de acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
C	Controle
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cm	Centímetro
CSC	Camada de Suporte de Colágeno
CMC	Teste de Carga Máxima Carregada
DF	Dimensão Fractal
DTT	Ditiotreitol
E	Escalada
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
ES	Escalada Sobrecarga
EES	Escalada/Escalada Sobrecarga
g	Gramas
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
h	Horas
HE	Hematoxilina-Eosina
JMT	Junção Miotendínea
JNM	Junção neuromuscular
Kg	Quilograma
LB	Lâmina Basal
M	Molar
MC	Massa corporal
MEC	Matriz Extracelular
mg g ⁻¹	Miligrama por grama
min	Minutos
mL	Mililitro
MM	Massa muscular
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
nº	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NIH	National Institute of Health
P1	Período 1 – início do protocolo
P2	Período 2 – um mês após início
P3	Período 3 – fim do protocolo
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PS	Picro-Sirius Red
s	Segundos
T1	Pré-protocolo
T2	Pós-protocolo

V
x

Volt
Multiplicação/Vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Exercício Físico	16
2.2. Músculo Estriado Esquelético	17
2.3. Junção Neuromuscular	19
2.4. Junção Miotendínea	21
2.5. Telócitos	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivos Específicos	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1. Animais	27
5.2. Protocolos de Treinamento	28
5.2.1. Escalada	28
5.2.2. Escalada Sobrecarga	29
5.2.3. Escalada/Escalada Sobrecarga	29
5.3. Eutanásia e Dissecção	30
5.4. Análises Funcionais	30
5.4.1. Massa Corporal	30
5.4.2. Massa Muscular	30
5.4.3. Teste de Carga Máxima Carregada	30
5.4.4. Teste de Desempenho Funcional	31
5.5. Microscopia de Luz	31
5.5.1. Hematoxilina e Eosina/ Picro-Sirius	31
5.5.2. Mensurações Dimensão Fractal/Área	32
5.5.3. Análise Histoquímica – ATPase Miofibrilar	33
5.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
5.7. Técnica - Imunofluorescência	36
5.7.1. Junção Neuromuscular (α -bungarotoxina)	36
5.7.2. Análises Morfométricas – Junção Neuromuscular	37
5.7.3. Junção Miotendínea - Telócitos	40
5.8. Análises Estatísticas	40
6. RESULTADOS	42
6.1. Análises Funcionais	42
6.1.1. Massa Corporal	42

6.1.2. Massa Muscular	43
6.1.3. Teste de Carga Máxima Carregada/ Teste de Desempenho Funcional	44
6.2. Microscopia de Luz	45
6.2.1. Dimensão Fractal	45
6.2.2. Análise Histoquímica – ATPase Miofibrilar	47
6.2.3. Junção Miotendínea	49
6.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão	49
6.3.1. Sarcômeros	50
6.3.2. Junção Miotendínea	52
6.3.3. Componentes da Matriz Extracelular	54
6.4. Técnica de Imunofluorescência	55
6.4.1. Junção Neuromuscular	56
6.4.2. Telócitos	57
7. DISCUSSÃO	59
7.1. Análises Funcionais	60
7.1.1. Antropometria	60
7.1.2. Testes Funcionais	61
7.2. Microscopia de Luz	62
7.2.1. Análise Dimensão Fractal	62
7.2.2. ATPase Miofibrilar	62
7.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão	63
7.3.1. Invaginações e Evaginações	63
7.3.2. Componentes da Matriz Extracelular	64
7.4. Junção Neuromuscular	65
7.5. Telócitos	66
8. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

A atividade física, principalmente aeróbica promove benefícios nas funções cardiorrespiratórias, melhora as capacidades funcionais e reduz seu nível de fadiga, além de promover a manutenção fisiológica do músculo estriado esquelético e de seus tecidos associados (WEINSTEIN et al., 2013). O exercício físico resistido resulta em aumento considerável na área de secção transversa do músculo, com eficiência em humanos adultos. Desta forma a força muscular pode ser mantida ou aumentada como consequência de treinamentos de resistência que resultam na hipertrofia muscular (HAYWOOD; GRETCHELL, 2010).

Macroscopicamente, o músculo bíceps braquial está localizado na região anterior do braço, possui duas origens e uma inserção, sendo suas origens divididas em cabeça curta e cabeça longa, a primeira está localizada no ápice do processo coracóide da escápula, a segunda no tubérculo supraglenoidal da escápula (MOORE et al., 2019).

A inserção do bíceps braquial está fixada na tuberosidade do rádio e na aponeurose do bíceps braquial, que faz parte da fáscia bicipital associada ao tendão que atravessa a fossa cubital, esta recobre os músculos flexores na face medial do antebraço e fixa-se indiretamente à margem subcutânea da ulna (KENDALL et al., 2007; MOORE et al., 2019).

Este músculo é responsável pela flexão da articulação do ombro, adução do ombro realizada com auxílio da cabeça curta, a cabeça longa contribui na abdução do ombro caso o úmero seja rotado lateralmente, e principalmente sua principal ação é a flexão da articulação do cotovelo, movendo o antebraço em direção ao úmero e realizando a supinação do antebraço (KENDALL et al., 2007; BRIGIDO et al., 2013).

O bíceps braquial possui variações em seu formato e seus ventres extranumerários, que demonstram sua variabilidade e evolução (BRIGIDO et al., 2013). Comumente, este é ativado em ações diárias e constantemente trabalhado em protocolos de exercício físico (JEONG et al., 2017). Em ratos, este músculo está localizado na região ventral, faz parte dos músculos do membro torácico e contribui com sua locomoção e na habilidade de agarrar em superfícies (KARDONG, 2016) durante o movimento de escalada, por exemplo.

Histologicamente, o músculo estriado esquelético é constituído pelos sarcômeros, que representam a unidade contrátil básica deste tecido, composto por filamentos paralelos finos que contém actina, ligada a banda "I" sobreposta a miosina nos filamentos grossos compostos da banda "A". Os filamentos finos são ancorados na linha "Z" e os filamentos grossos na banda "H" (MOO et al., 2016). Em estudo realizado por Sierra et al. (2018) foi

possível evidenciar em ratas idosas submetidas ao modelo experimental de menopausa associado a natação, alterações morfológicas na JMT e nos sarcômeros desta região. Adaptações que foram demonstradas com características diferentes em modelo experimental de escada vertical recentemente em músculos do membro pélvico (ROCHA et al., 2020b).

A junção neuromuscular (JNM) é a estrutura que recebe estímulos da inervação periférica, refletidos por meio da ligação de neurotransmissores aos seus receptores no músculo estriado esquelético, e por meio de diversos processos fisiológicos e bioquímicos que desencadeiam a contração muscular (DESCHENES et al., 2016).

As terminações nervosas interagem com a membrana sarcoplasmática da célula muscular, local de liberação do neurotransmissor acetilcolina, que desencadeia a contração das miofibrilas e, conseqüentemente, a ativação dos sarcômeros que a compõem (ROCHA et al., 2020a). Estudos recentes têm demonstrado a associação de exercício resistido, esteróides anabólicos, envelhecimento e aumento de brotamentos nervosos na fenda sináptica (KRAUSE et al., 2017; DESCHENES et al., 2020).

A junção miotendínea (JMT) é a região de interação na extremidade distal e proximal das células musculares com os feixes de tecido conjuntivo oriundos da matriz extracelular, sua interface permite a comunicação entre estes tecidos (TIDBALL; QUAN, 1992). Esta estrutura anatômica é altamente complexa e consiste na maior área de transmissão de força muscular, além de apresentar maior susceptibilidade a lesões desportivas (TIDBALL; CHAN, 1989).

As principais características ultraestruturais da JMT são reveladas por dobras no sarcolema denominadas de invaginações sarcoplasmáticas ou “interdigitações” e as evaginações sarcoplasmáticas (*finger-like process*) (CIENA et al., 2010). Além disso, a JMT já apresentou extenso remodelamento diante de modelo experimental de menopausa na musculatura da região cervical (JACOB et al., 2019), e em modelo de treinamento em escada vertical revelaram especificidades nos sarcômeros (ROCHA et al., 2020b).

Recentemente um “nicho” de telócitos, células de origem estromal, foi encontrado na região da JMT, o que demonstra a importância de sua investigação e sua possível relação com diferentes estímulos e adaptações desta região (PIMENTEL NETO et al., 2020). Atualmente vem sendo investigadas, e conclui-se que até o momento possuem função de suporte, associam-se entre si por meio de suas ramificações (telópodos), e assim formam

junções de comunicação célula-célula, associadas à produção de colágeno (POPESCU, 2010; CRETOIU et. al., 2016; MANETTI et al., 2019, PIMENTEL NETO et al., 2020).

Diante dos elementos apresentados, a plasticidade da JNM e seu reflexo nas adaptações em diferentes regiões do músculo bíceps braquial, principalmente na JMT contribuem com o conhecimento ainda limitado deste sistema funcional fisiológico que compreende em diferentes tecidos e que são diretamente associados à prática de exercício físico. Além da associação dos telócitos como suporte para a região da JMT e suas alterações diante dos diferentes protocolos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Exercício Físico

De acordo com o “*American College of Sports Medicine*” (2011) em humanos, é recomendado o treinamento de cada grupamento muscular de 2 a 3 vezes por semana, este determinado protocolo resulta em aumento significativo da força muscular associado ao melhor desempenho motor. A região do ventre muscular é mais desenvolvida diante desta organização de treinamento, além do ganho de resistência física, ocorrem adaptações metabólicas positivas em toda fisiologia do praticante (GARBER et al., 2011).

O exercício físico aeróbico tem como principais benefícios a melhora na função cardiorrespiratória, o aumento na capacidade funcional, e a redução do nível de fadiga do praticante, além da manutenção fisiológica principalmente do tecido muscular (WEINSTEIN et al., 2013).

O treinamento de força resulta em um significativo aumento da área de secção transversa muscular (hipertrofia muscular), com maior eficiência em homens pós-púberes, e como estímulo para este desenvolvimento muscular considera-se relevante a testosterona circulante. A força pode ser mantida ou aumentada como consequência do treinamento resistido (HAYWOOD; GRETCHELL, 2010).

A resposta adaptativa ao treinamento resistido depende de variáveis que configuram este tipo de exercício físico, tais como a magnitude de sobrecarga, número de séries e repetições, modalidade de exercício, tempo de repouso, duração e velocidade dos movimentos. A perda de velocidade e estresse metabólico diferem consideravelmente do número real de repetições realizadas em um conjunto de exercícios (SPIERING et al., 2008; SÁNCHEZ-MEDINA; GONZÁLEZ – BADILLO, 2011).

A fim de maximizar os resultados do treinamento induzido por exercícios de resistência, a prescrição adequada e periodização de sobrecargas de treinamento são necessárias, assim como o monitoramento do treinamento é essencial para avaliar se as sobrecargas destinadas ao protocolo foram efetivas como planejado, independente do público-alvo (população em geral e atletas) (LODO et al., 2012).

De fato, o treinamento de resistência e força provoca danos musculares ultraestruturais e a liberação subsequente de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento como o Fator de Crescimento de Insulina (IGF-1), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento mecânico, estes estimulam a diferenciação e proliferação de células satélites. A incorporação de novos núcleos de células satélites em fibras musculares existentes aumenta o número de "domínios mionucleares" (unidade anatômica funcional composta por um mionúcleo e por certo volume circundante de sarcoplasma) e, por conseguinte, a área em secção transversa da fibra muscular (MARZETTI et al., 2017).

O exercício físico sem sobrecarga promove diversos benefícios para o organismo, desta forma é aplicado em protocolos de treinamento periodizados para humanos de todas as idades. Além disso, pode ser prescrito de forma intercalada com o exercício resistido, para indivíduos que buscam ampla melhora no bem-estar físico e no desempenho funcional. O exercício resistido por si só tem sido um dos métodos mais procurados e eficazes isoladamente para perda de peso e ganho de massa muscular entre indivíduos sedentários e atletas em níveis distintos de competição.

2.2. Músculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é o tecido mais abundante em mamíferos, representa cerca de 45% da massa corporal em humanos, é composto por células alongadas, cilíndricas e multinucleadas denominadas miofibras, estas compostas por miofibrilas integradas por miofilamentos proteicos ativados durante a contração muscular, são elas: actina, miosina, troponina, tropomiosina e tinina (FRONTERA; OCHALA, 2014; LE MOAL et al., 2017).

As fibras musculares esqueléticas em humanos são caracterizadas por sua velocidade de contração ou velocidade metabólica, divididas em três tipos principais: fibras do tipo I (oxidativas lentas), tipo IIa (glicolíticas oxidativas) rápidas e tipo IIb (glicolíticas rápidas), em ratos as fibras IIb são denominadas IIx (TAJSHARGHI, 2008; ROCHA et al., 2020a).

O sarcômero representa a unidade contrátil básica do tecido muscular estriado esquelético e forma as fibras musculares. Estas últimas são compostas por filamentos paralelos finos que contém actina, ligada a banda “I” sobreposta a miosina (filamentos grossos) que compõem a banda “A”. Os filamentos finos são ancorados na linha “Z” e os filamentos grossos na banda “H” (MOO et al., 2016).

Em estudo realizado por Sierra et al. (2018) foi possível evidenciar em ratas idosas submetidas ao modelo experimental de menopausa associado a natação, alterações morfológicas na JMT e nos sarcômeros distal (SD) e proximal (SP) desta região comparado com os sarcômeros do ventre (SV). Diante disso, foram demonstradas características distintas em modelo experimental de escada vertical (hipertrofia muscular) recentemente publicado nos músculos sóleo e plantar (ROCHA et al., 2020b) e em modelo experimental de obesidade (GRILLO et al., 2021). Desta forma, determina-se a variação adaptativa dos sarcômeros desta região, diante de diferentes estímulos, e a necessidade de investigação destes.

Nos humanos, a região anterior superior dos membros superiores possui um conjunto de músculos que atuam na flexão de cotovelo e na supinação do braço e antebraço, são eles os músculos bíceps braquial e braquiorradial. Especificamente o músculo bíceps braquial, possui duas origens (pontos fixos), e desta forma é dividido em dois ventres (cabeça longa e curta) que se bifurcam e uma inserção (ponto móvel). Suas origens se localizam no processo coracóide da escápula (cabeça curta) e no tubérculo supraglenoidal da escápula (cabeça longa) e sua inserção se localiza na tuberosidade do rádio recoberta por uma aponeurose que faz parte da fáscia do antebraço. Além disso, este também atua no auxílio durante os movimentos de pronação e supinação do antebraço (KENDALL et al., 2007; KLEIBER et al., 2015; LANDIN et al., 2017; MOORE et al., 2019).

O músculo bíceps braquial possui variações principalmente quanto a sua origem que se localiza comumente na região extra capsular do tubérculo supraglenoidal. A sua forma em “Y”, e até mesmo quanto aos ventres extranumerários que são originados principalmente do úmero. Tais variações foram encontradas em estudos feitos em primatas e humanos, e demonstram a variabilidade e a evolução deste importante músculo que atua em ações cotidianas, e é constantemente trabalhado em protocolos de exercício físico de forma isolada ou em grupamentos (BRIGIDO et al., 2013; JEONG et al., 2017).

O bíceps braquial é innervado pelo nervo musculocutâneo (C5 e C6), desta forma certas unidades motoras da cabeça longa do músculo bíceps braquial são ativas durante

flexão do cotovelo, enquanto outras ocorrem durante os movimentos de supinação da mão. A base anatômica desses achados confirma a existência de seis compartimentos musculares paralelos, que individualmente inervam cada cabeça muscular. No geral, existe uma complexa funcionalidade em relação aos ventres deste músculo, desta forma a atual compreensão indica que a postura do braço tem grande impacto sobre a quantidade de ativação diferencial (LENDARO et al., 2018, MOORE et al., 2019).

Em ratos, o músculo bíceps braquial faz parte da musculatura axial e cintura peitoral, especificamente dos membros ventrais, este contribui com a locomoção destes animais, que são caracterizados pelo quadrupedismo. Além disso, contribui nos movimentos finos de pegar, auxiliando na alimentação e ao agarrar superfícies para fuga ou em locais de difícil acesso (KARDONG, 2016).

2.3. Junção Neuromuscular

A junção neuromuscular (JNM) é uma conexão sináptica. Sua estrutura é formada por três componentes principais: um terminal axonal, as fibras musculares e as células perisinápticas terminais (DARABID et al., 2014; LI et al., 2018;). Suas alterações morfológicas são comumente associadas a patologias como esclerose lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinhal (SMA) e distrofia muscular de Duchenne (DMD). Estas são analisadas por meio do processo de desnervação que ocorre e podem ser reconhecidos por imunocoloração, que de forma eficaz representam a função sináptica (MURRAY et al., 2008; SHEN et al., 2013; TU et al., 2020).

O ciclo de contração muscular necessita de energia (ATP) gerada por aerobiose nas mitocôndrias, particularmente abundante em fibras musculares adultas. A contração é estimulada por meio de neurônios motores, conectados às fibras musculares ativadas diante das sinapses. Esta junção entre neurônio motor e músculo é denominada JNM (WU et al., 2010).

A acetilcolina liberada na fenda da JNM interage com receptores específicos (AChR) e gera um potencial de ação na superfície da célula muscular, e se difunde rapidamente dentro do tecido muscular por meio de uma rede de túbulos especializados denominados túbulos T (GONZALEZ-FREIRE et al., 2014).

O potencial de ação ativa a abertura do receptor de dihidropiridina que permite o influxo de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma e estimula os receptores de rianodina a liberar mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} , por sua vez, desencadeia a interação entre as proteínas contráteis e provoca um encurtamento da fibra muscular (contração). Esta

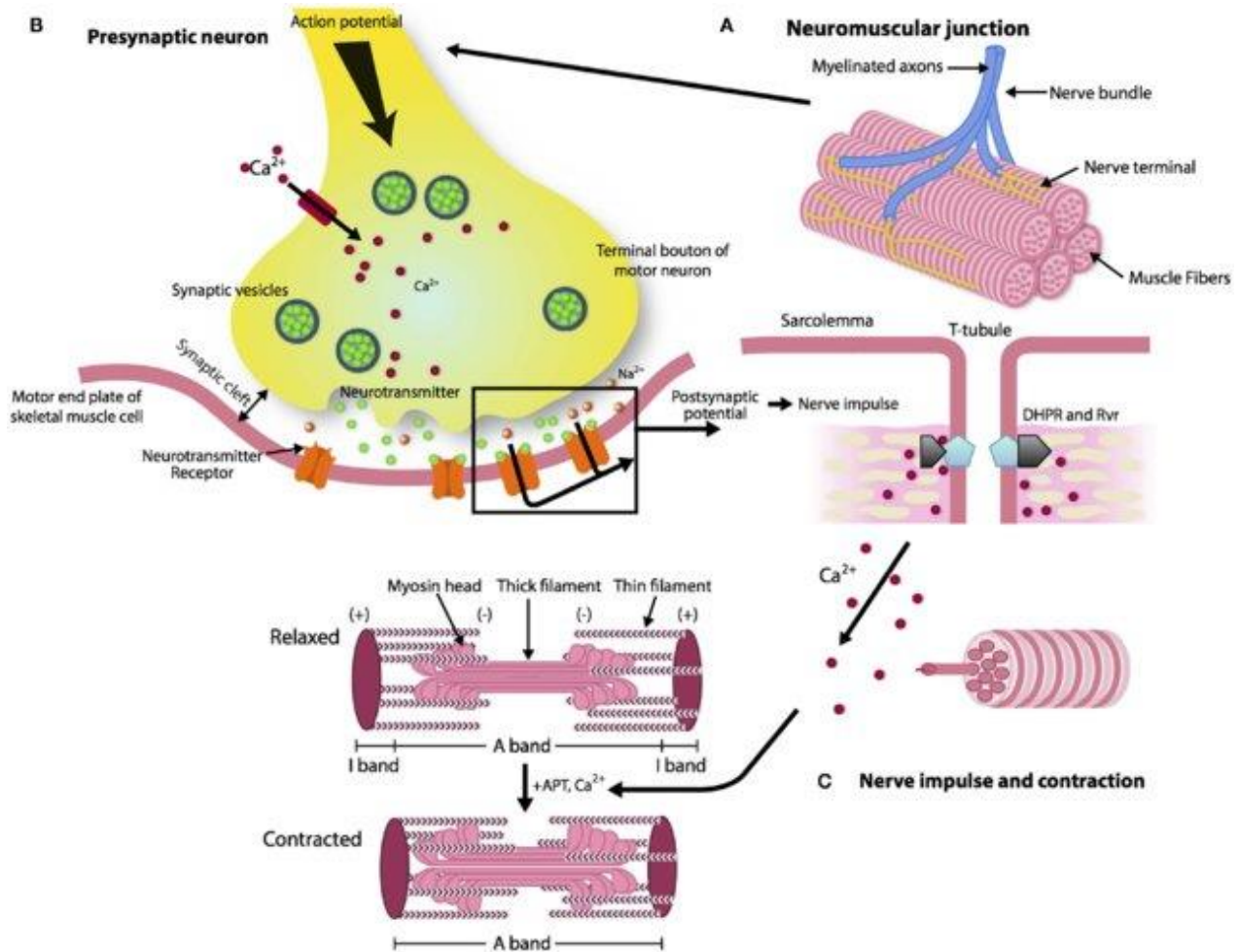
complexidade estrutural e funcional é refletida pelo grande repertório de proteínas encontradas no músculo esquelético (GONZALEZ-FREIRE et al., 2016).

A JNM possui vertentes abrangentes quanto a sua plasticidade diante de estímulos como, o envelhecimento (sarcopenia), uso de fármacos, patologias e frente ao exercício físico, devido a relação direta com o músculo estriado esquelético. Esta correlação com o sistema nervoso periférico demonstra adaptação das fibras musculares diante da atividade pré e pós-sináptica da JNM (DESCHENES et al., 2013; DESCHENES et al., 2015).

Em estudos recentes têm sido comprovadas adaptações quanto a sua área e perímetro diante dos protocolos de exercícios em ratos adultos e idosos, evidenciando sua plasticidade tecidual diante de estímulos específicos (KRAUSE et al., 2017; ROCHA et al., 2020a).

Alguns estudos evidenciaram na JNM adaptações associadas ao treinamento resistido como, o aumento no perímetro e área da ramificação terminal do nervo, área ocupada pelas vesículas e AChR, bem como a dispersão de ambas as vesículas de acetilcolina pré-sinápticas e receptores de acetilcolina pós-sinápticos (DESCHENES et al., 2015).

Figura 1. Diagrama de ação da junção neuromuscular durante as sinapses.



Fonte: Elaborado por GONZALEZ-FREIRE et al., 2014.

2.4. Junção Miotendínea

A JMT consiste em uma área anatômica altamente especializada entre as fibras musculares onde ocorre a conexão entre as membranas sarcoplasmáticas e as fibras colágenas da matriz extracelular (CIENA et al., 2010). Sua principal função é transmitir a força gerada por meio das proteínas contráteis intracelulares do músculo para as proteínas do tecido conjuntivo, que resulta no movimento das articulações. A região da JMT pode ser evidenciada nas extremidades distais da musculatura esquelética, em relação ao seu ventre muscular e próxima 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).

As ultraestruturas da JMT são caracterizadas por projeções longas e delgadas, oriundas da matriz extracelular, conhecidas como invaginações sarcoplasmáticas ou

“interdigitações” que penetram e fixam-se ao ventre muscular, mais especificamente, nas evaginações sarcoplasmáticas (*finger-like process*). Os feixes miofibrilares em sua extremidade distal apresentam-se envolvidos por estas “interdigitações” (CIENA et al., 2010).

Morfológicamente as interdigitações aumentam o contato da superfície da JMT, e permite a transmissão de força contrátil do músculo estriado esquelético para o tecido tendão (TIDBALL; CHAN, 1989; KOJIMA et al., 2008). O desenvolvimento da JMT está diretamente relacionado à influência da interação dos mioblastos e elementos da matriz extracelular, bem como pela interação prática entre os tecidos muscular e tendíneo (RODRIGUEZ-GUZMAN et al., 2007).

As consequências de lesões nesta região acarretam redução funcional das propriedades teciduais além de colaborarem com futuras lesões provenientes de atividades desportivas recorrentes ou do sedentarismo (TANEJA et al., 2013; BALDINO et al., 2016). Esta região anatômica permanece sob extensa investigação, principalmente acerca de suas adaptações e repercussões funcionais. O risco de tensões musculares é provavelmente uma confluência de numerosos fatores ligados a arquitetura ultraestrutural da JMT e de sua superfície de contato entre tecidos (BLANKENBAKER et al., 2004; FIORENTINO, 2012; CHARVET et al., 2013; GUERINI et al., 2015).

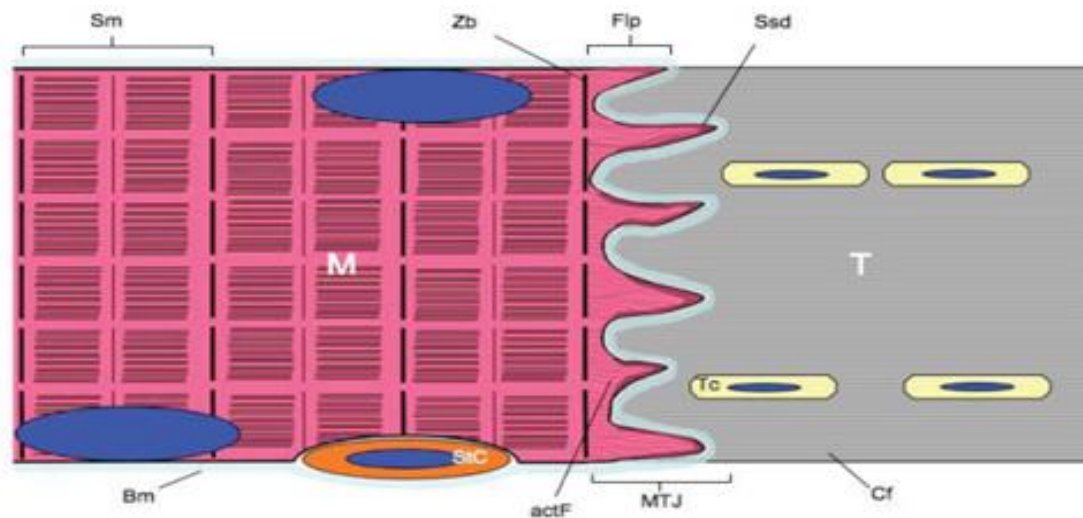
A nível molecular, a matriz extracelular do tendão se liga as actinas sarcoméricas terminais, por meio de uma dupla estrutura de ligação protéica: o complexo distrofina-glicoproteína e o sistema vinculina-talina-integrina (CURZI et al., 2015). A JMT apresenta alta capacidade adaptativa com a realização de exercícios físicos, com aumento da sua área de contato e diferentes níveis de interação das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (KOJIMA et al., 2008; ROCHA et al., 2020 b).

Em pesquisas que correlacionaram o treinamento aeróbio moderado, a JMT evidenciou-se alterações estruturais nesta região, consequência do maior número de bifurcações e de interdigitações provenientes do tendão além da sua relação com os sarcômeros associados desta região, denominados sarcômeros proximais e distais (SIERRA et al., 2018; ROCHA et al., 2020b). Segundo Curzi et al. (2013), a JMT se adapta também pelo exercício progressivo, e o treinamento anaeróbio reduz a perda generalizada desta interface, ou seja, previne a atrofia e aumenta a extensão do processo tendíneo que se insere no músculo.

Diante do exercício com sobrecarga em escada vertical, as alterações da JMT demonstraram aumento considerável do comprimento e espessura de suas invaginações e

evaginações, além da redução de sua lâmina basal e a associação com o primeiro nicho de telócitos reportado nesta região (PIMENTEL NETO et al., 2020).

Figura 2. Modelo ilustrativo da junção miotendínea e seus elementos estruturais.



Fonte: Elaborado por CHARVET et al., 2012.

2.5. Telócitos

Os telócitos foram descritos e nomeados pela primeira vez como células intersticiais de Cajal, nome de origem de seu primeiro pesquisador S. Ramón e Cajal e, em 2010, foram renomeados como telócitos (POPESCU; FAUSSONE-PELEGRINI, 2010). Estas células se localizam no interstício de diferentes tecidos, são de origem estromal, possuem formato oval e um núcleo heterocromático em micrografias de transmissão (GHERGHICEANU et al., 2010; FAUSSONE-PELEGRINI; POPESCU, 2011).

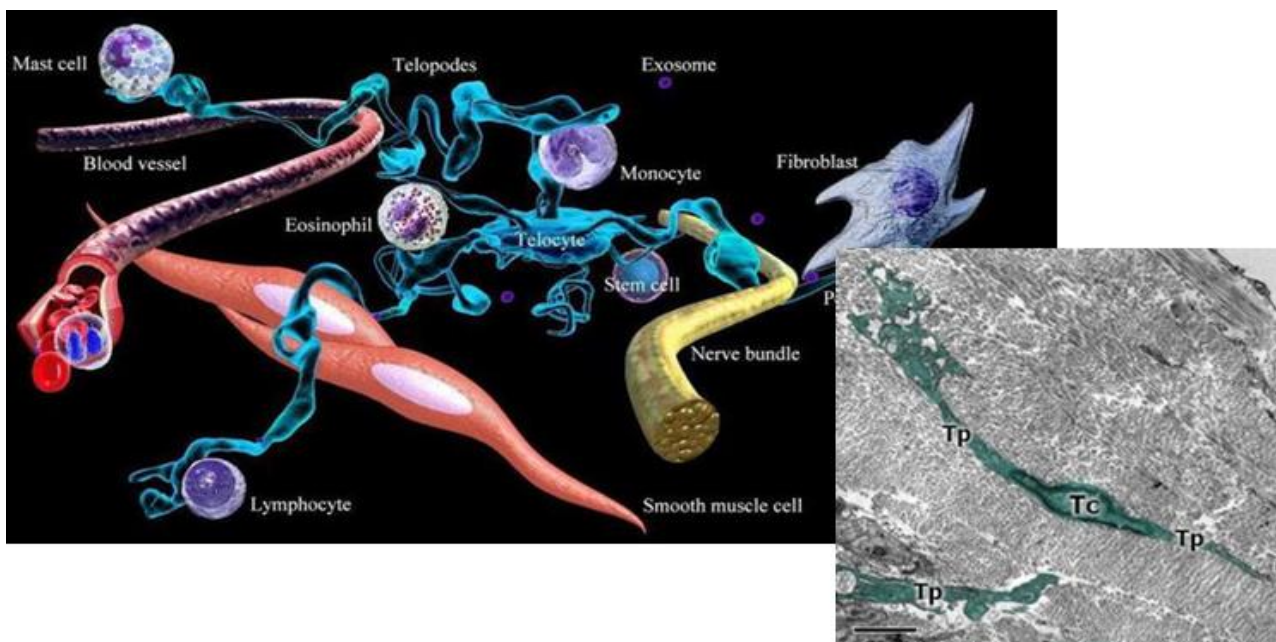
Morfologicamente os telócitos são caracterizados por suas projeções longas e delgadas (de 1 a 5) denominadas telópodos, que formam uma rede intersticial, presumivelmente atuando como guia para definir a organização tecidual e mediar a sinalização célula-célula (POPESCU, 2010; CRETOIU et al., 2016; MANETTI et al., 2019). Para identificação e análise de suas características são utilizadas as técnicas de cultura celular, microscopia eletrônica de transmissão, imunohistoquímica e imunofluorescência com os marcadores CD34 e PDGFR- α principalmente (FAUSSONE-PELEGRINI; POPESCU, 2011; CARMONA; BARTOLOMÉ; ESCRIBANO, 2011).

Seus prolongamentos terminais (podos) são caracterizados por mitocôndrias e podem atuar como estruturas de suporte formando junções com as células adjacentes (CRETOIU et al., 2016). Os podos e os telópodos possuem cavéolas que realizam exocitose por meio de vesículas comunicantes (exossomos), e afetam indiretamente os tecidos associados (SONG; CRETOIU; WANG, 2017; CHAITOW, 2017).

Os telócitos já foram associados aos vasos sanguíneos por suas características morfológicas e por serem encontrados em proximidade com suas células de formação. Estes já foram identificados em tecidos como testículo, músculo liso e cardíaco, língua, pâncreas e fígado. Também estão localizados no interstício dos tecidos próximos ao nervo, vasos sanguíneos e células satélites de diferentes espécies, além disso, estabelecem comunicações entre si por meio de seus telópodos e das vesículas liberadas por sua atividade parácrina com células adjacentes (DÍAZ-FLORES et al., 2014; FAUSSONE-PELLEGRINI; GHERGHICEANU, 2016; ROSA et al., 2019).

Recentemente um nicho de telócitos foi identificado, na camada de suporte de colágeno da junção miotendínea de ratos *Wistar* adultos (PIMENTEL NETO et al., 2020). Sua estreita associação aos elementos ultraestruturais da JMT, reforçam sua ação estrutural e de suporte a serem futuramente investigadas.

Figura 3. Modelo ilustrativo dos telócitos e micrografia de transmissão de um telócito (TC) e de suas projeções (TP) na região da JMT.



Fonte: Elaborado por WANG et al., 2016; PIMENTEL NETO et al., 2020.

3. JUSTIFICATIVA

A atividade física é de suma importância para manutenção da saúde, prevenção de diversas patologias e no desenvolvimento de atletas amadores e profissionais. O exercício físico resistido promove a hipertrofia muscular e o desenvolvimento das estruturas e sistemas associados para melhor funcionalidade do aparelho locomotor, desta forma proporciona adaptações diante da prática periodizada em diferentes modalidades.

As junções comunicantes investigadas neste estudo determinam um sistema unidirecional que possivelmente influencia diretamente as adaptações frente ao exercício físico. A JNM é responsável pela comunicação nervosa com músculo, que por meio das sinapses promove ativação muscular, gerando contração muscular, e consequentemente, promove a transmissão de força na JMT.

A elucidação deste sistema interligado de comunicações celulares permitirá a compreensão das adaptações frente ao exercício físico sem sobrecarga adicional, ao protocolo de hipertrofia muscular periodizado e com sobrecarga adicional progressiva e a associação destes protocolos combinados em dias intercalados.

4. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as adaptações morfológicas, moleculares e funcionais na junção neuromuscular e na junção miotendínea do músculo bíceps braquial em ratos *Wistar*, submetidos a diferentes e associados protocolos experimentais de escada vertical.

4.1. Objetivos Específicos

- Realizar as análises funcionais nos períodos pré e pós-protocolo;
- Determinar a organização mionuclear e do tecido conjuntivo associado por meio da análise de dimensão fractal e da área demarcada;
- Diferenciar os tipos de fibras musculares por meio da técnica de ATPase Miofibrilar e realizar análise morfométrica da área de secção transversa;
- Descrever os aspectos estruturais da JMT, empregando o método de Microscopia de luz: colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e Picro-Sirius (PS);
- Mensurar os comprimentos dos sarcômeros do ventre e da região da JMT;
- Mensurar a espessura da Lâmina Basal e da Camada de Suporte de Colágeno e o perímetro das fibras colágenas transversais da JMT;
- Descrever as características ultraestruturais e mensurar as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas da JMT por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- Revelar as características morfológicas da JNM por meio da técnica de Imunofluorescência (α -bungarotoxina);
- Mensurar a área, perímetro, dispersão e diâmetro máximo da fenda pós-sináptica da JNM;
- Identificar na JMT a presença de telócitos por meio da técnica de Imunofluorescência (CD34+).

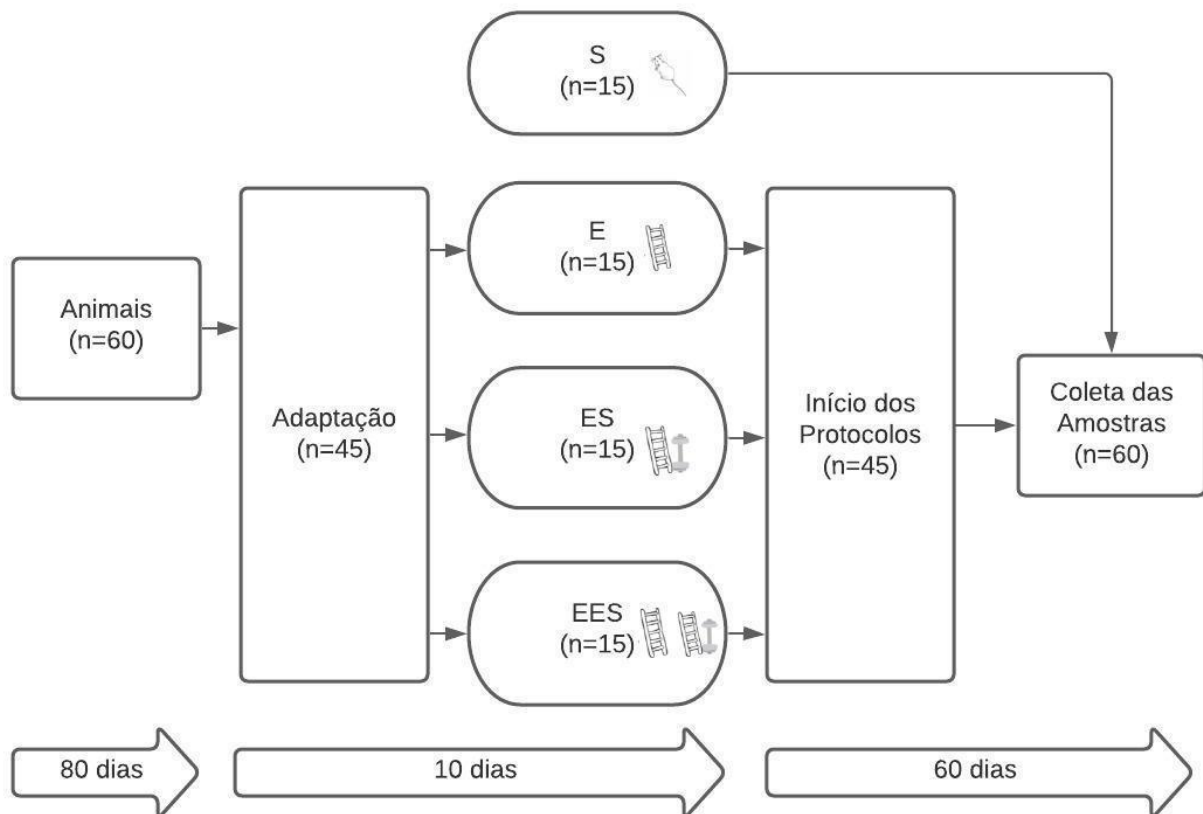
5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 60 ratos *Wistar* adultos (90 dias), organizados em 4 grupos distintos (Figura 4):

- **Sedentário (S)** (n=15): não submetidos ao treinamento de escada vertical;
- **Escalada (E)** (n=15): submetidos ao treinamento em escada vertical sem sobrecarga;
- **Escalada Sobrecarga (ES)** (n=15): submetidos ao treinamento em escada vertical com sobrecarga;
- **Escalada/Escalada Sobrecarga (EES)** (n=15): submetidos ao treinamento em escada vertical sem sobrecarga e com sobrecarga em sessões intercaladas.

Todos os animais foram originários do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu e mantidos em gaiolas com 5 ratos 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 claro/escuro de 12 horas e com água e ração balanceada “*ad libitum*”. Todos os procedimentos apresentados neste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro-SP (nº 2207).

Figura 4. Diagrama cronológico dos protocolos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo autor com Lucidchart®. Com 80 dias iniciaram o processo de adaptação a escada vertical, após 10 dias os mesmos (90 dias) iniciaram os protocolos experimentais que foram realizados durante 60 dias (8 semanas), com 150 dias os protocolos se encerraram e as amostras do músculo bíceps braquial direito foram coletadas.

5.2. Protocolos de Treinamento

Todos os protocolos foram realizados por dois indivíduos do Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LMAF), já familiarizados ao protocolo experimental e treinados para os devidos cuidados com os animais. Além disso, os indivíduos participaram da realização das sessões de treinamento e acompanharam desde a chegada dos animais e adaptação, até as mensurações e análises dos resultados.

5.2.1. Escalada

Os animais realizaram 9 escaladas sem sobrecarga com intervalos de 1 min, 3 tentativas para cada escalada com estímulo manual. Este protocolo foi repetido 3x/semana durante o período de 8 semanas, com total de 24 sessões de treinamento ao final do protocolo (PIMENTEL NETO et al., 2020) (Figura 5A).

5.2.2. Escalada Sobrecarga

Os animais realizaram de 4 a 9 escaladas com sobrecargas de chumbo referentes à massa corporal de cada animal, que representaram 50%, 75%, 90%, e 100% de sobrecarga adicional fixada à cauda. Estas foram utilizadas respectivamente durante as 4 primeiras escaladas, a partir da 5ª escalada foram adicionados 30g de sobrecarga extra progressivamente até a exaustão ou até que se completassem 9 escaladas. O protocolo foi repetido 3x/semana durante o período de 8 semanas, com total de 24 sessões de treinamento. A 1ª e a 24ª sessões foram utilizadas para aplicação do teste de carga máxima carregada (PIMENTEL NETO et al., 2020) (Figura 5B).

5.2.3. Escalada/Escalada Sobrecarga

Os animais iniciaram o protocolo experimental na primeira sessão realizando o protocolo de Escalada Sobrecarga e na segunda sessão o protocolo de Escalada, estes foram intercalados e realizados 3x/semana durante 8 semanas, com total de 12 sessões para cada protocolo.

Figura 5. Imagens dos grupos experimentais durante a execução dos diferentes protocolos em escada vertical.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Imagem do Grupo E durante a realização do protocolo experimental; (B) Imagem Grupo ES durante o protocolo com uso da sobrecarga adicional fixada a cauda (círculo).

5.3. Eutanásia e Dissecação

Os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados por meio de overdose de anestésicos Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal. Para as técnicas de microscopia de luz do ventre muscular, foram dissecadas amostras do terço médio e para a microscopia de luz da JMT e imunofluorescência foram dissecados o terço distal do músculo bíceps braquial direito, criofixados em nitrogênio líquido -196°C, assim alocados sobre o crio molde, estabilizadas com cola biológica e untadas em talco neutro (Tragacanth, SIGMA®), em seguida armazenadas em Freezer a -80°C. Todos os procedimentos foram realizados e supervisionados por uma veterinária especializada e realizada por pessoas certificadas no cuidado e na execução dos devidos procedimentos.

5.4. Análises Funcionais

As análises funcionais foram utilizadas para controle da massa corporal, massa muscular do bíceps braquial e para os testes de desempenho entre os grupos experimentais.

5.4.1. Massa Corporal

A massa corporal dos animais de todos os grupos experimentais foi mensurada semanalmente para reajuste das sobrecargas utilizadas nos protocolos específicos e para comparação e análise da evolução dos grupos experimentais durante os 2 meses de experimento. Para a mensuração foi utilizada uma balança digital (TOMATE SF400®), os dados foram comparados em 3 diferentes períodos, no início do protocolo (P1), com um mês de realização do protocolo (P2) e ao fim do protocolo (P3).

5.4.2 Massa Muscular

A massa muscular do músculo bíceps braquial direito foi mensurada após a sua dissecação. Para a mensuração foi utilizada uma balança semi-analítica (Marte Científica® AD330), e os dados obtidos foram utilizados para comparação da massa muscular entre os grupos experimentais.

5.4.3. Teste de Carga Máxima Carregada

O teste de carga máxima carregada foi realizado em todos os grupos experimentais, por meio de duas avaliações com objetivo de definir a carga máxima que o animal suportou durante a escalada. O Teste 1 (T1) envolveu uma escalada inicial com sobrecarga adicional referente a 50% da massa corpórea do animal, entre as escaladas o

animal foi submetido a 120 segundos de descanso, além disso, um adicional de 30 g de sobrecarga foi adicionado ao aparelho de sobrecarga fixo a cauda para cada escalada subsequente, este procedimento foi sucessivamente repetido até que o animal não realizasse a escalada completa (exaustão) após as 3 tentativas.

A maior sobrecarga utilizada durante a última escalada foi considerada a capacidade de carga máxima carregada do animal. O Teste 2 (T2) foi realizado ao final do protocolo experimental e utilizou as mesmas orientações do T1. Os dados dos testes foram analisados e estabelecidas as médias e desvios-padrões para comparação intragrupos, assim realizada a análise estatística por meio do software GraphPad 8.0.1[®], com uso do método *Two-Way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni (KRAUSE et al., 2017).

5.4.4. Teste de Desempenho Funcional

Para o teste de desempenho funcional foram registrados o tempo de escalada e o número de escaladas de cada animal durante os testes (T1 e T2). O tempo de escalada foi registrado por meio de um cronômetro (segundos), do momento em que o animal iniciou os movimentos colocando-se no primeiro degrau da escada até alcançar o suporte na extremidade superior da escada. O número de escaladas realizadas também foi registrado em todos os grupos experimentais. As variáveis citadas foram documentadas nos intervalos de cada escalada, analisadas e comparadas intragrupos, assim foram obtidas as médias e desvios-padrões. Foi realizada a análise estatística por meio do software GraphPad 8.0.1[®], com uso do método *Two-Way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni.

5.5. Microscopia de Luz

As imagens de microscopia de luz obtidas foram utilizadas para mensuração e análise da dimensão fractal e área dos tecidos especificamente selecionados.

5.5.1. Hematoxilina e Eosina/ Picro-Sirius

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental. Foram realizados cortes longitudinais de 10 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM) nas amostras armazenadas em crio molde para análise da JMT e cortes transversais para análise do ventre muscular, corados com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para destaque dos componentes celulares e Picro-Sirius (PS) para identificação do tecido conjuntivo associado (CARDIFF et al., 2014; BHUTDA et al., 2017). As imagens (n=15) foram obtidas por meio do microscópio de luz (Carl Zeiss Microimaging, Axioskop 40, Göttingen, Germany) do Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da

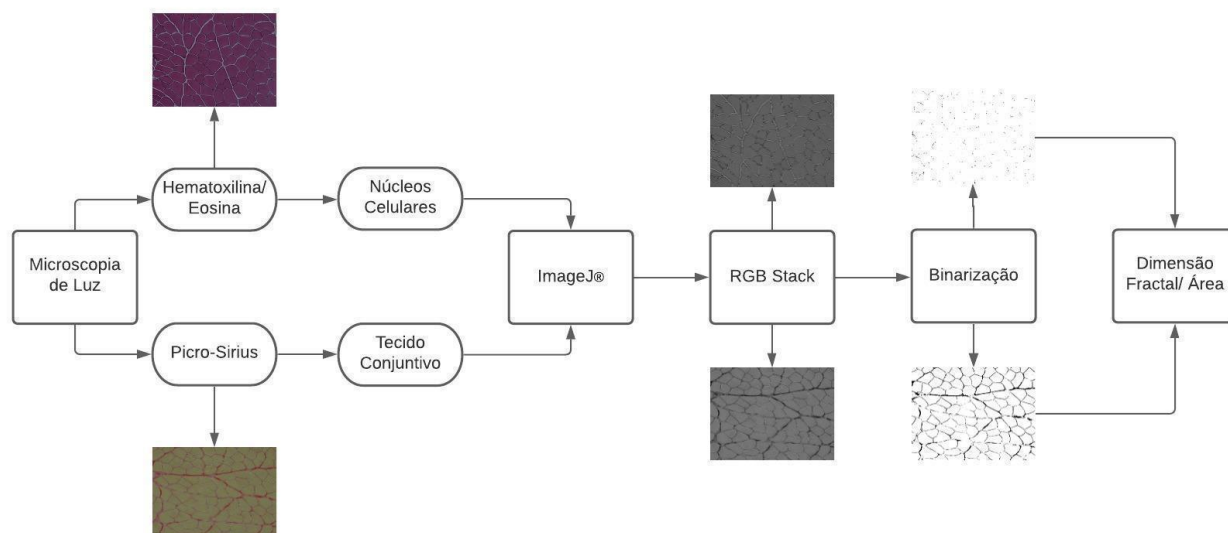
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo Campus Piracicaba (ESALQ/USP).

5.5.2. Mensurações Dimensão Fractal/Área

As imagens das lâminas fotografadas de Microscopia de Luz foram selecionadas (n=15) e por meio do software ImageJ® foi realizada a calibração do mesmo. Para dar início a técnica é necessário selecionar a aba *Set "Scale/Analyze"* e utilizando da ferramenta *"Straight"* para mensurar a barra de escala de cada imagem, e alterar em *"Known Distance"* o valor referente a barra e a unidade de medida para μm . Além disso na barra de tarefas foi necessário selecionar a opção *"Analyze/ Set Measurements"* e ticar a opção de variável a ser calculada no caso a Área. A partir disto foi necessário buscar na aba *"Image"* pelas opções *"Type/RGB Stack"* e selecionar a demarcação evidente do tecido analisado, a partir da demarcação selecionada, é preciso buscar na barra de tarefas por *"Process/Binary/Make Binary"* e desmarcar todas as opções da janela que será aberta, a auto seleção do tecido analisado será apresentada pelo software, pôr fim a tecla M deve ser apertada para apresentação dos resultados da área (Figura 6).

Além da área calculada também foram obtidos os resultados de dimensão fractal, após a binarização as seguintes opções foram selecionadas, *"Analyze/Tools/Fractal Box Count"*, uma pequena janela foi aberta e as opções desmarcadas, foi selecionado então o botão "OK" e um gráfico com o valor da dimensão fractal foi assim apresentado. Em relação a dimensão fractal, esta é utilizada para quantificação da complexidade de organização dos elementos celulares por meio da distribuição de pixels no espaço, sem considerar a textura da imagem, o seu valor padronizado expresso será sempre de 0 a 2, em que valores próximos de 2 representam desorganização tecidual ou celular (CURY et al., 2018), os valores foram associados a área de cada estrutura analisada (Figura 6).

Figura 6. Diagrama das mensurações realizadas a partir das técnicas de Hematoxilina e Eosina e Picro-Sirius.



Fonte: Elaborado pelo autor por meio do Lucidchart®. Diagrama das mensurações realizadas a partir das técnicas de Hematoxilina/Eosina e Picro-Sirius em Microscopia de Luz.

5.5.3. Análise Histoquímica – ATPase Miofibrilar

Foram realizados cortes transversais de 10 µm de espessura (Criostato HM 505 E, MICROM) do terço médio do músculo bíceps braquial direito, estes foram então incubados durante 30 min a 37°C em solução contendo 10 mg de ATP dissolvidos em 2 gotas de água destilada adicionadas em conjunto com 10ml de glicina/tampão NaCl, CaCl₂ atingindo o pH 9,4 adicionado com DTT. Os cortes foram lavados em água destilada e incubados por 2 min em cloreto de cobalto 2%. O processo de lavagem e incubação foi repetido 3 vezes.

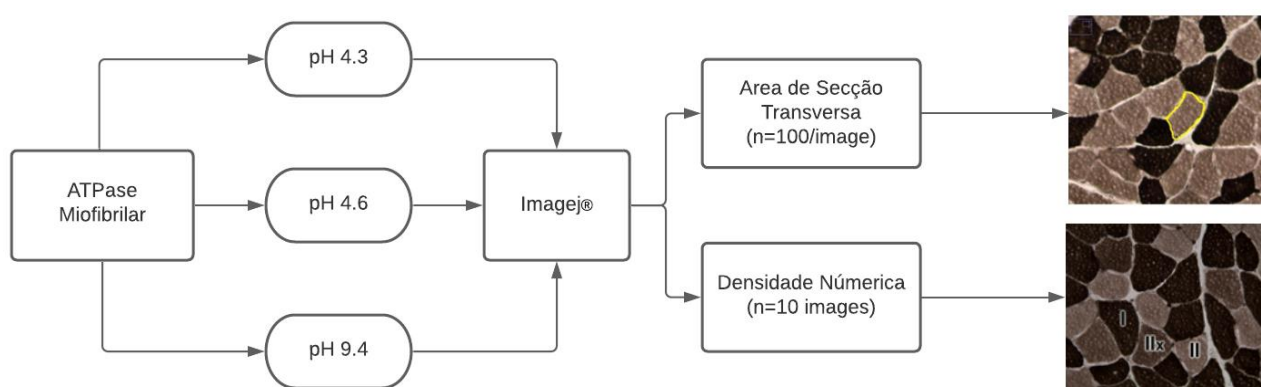
Foi realizada uma nova lavagem das amostras em água destilada e desidratação em séries ascendentes de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%) e finalizadas em xilol, para assim concluir com a fixação das amostras. Para o método de pH 4,3 e 4,6, as seções foram pré incubadas em solução tampão de acetato de sódio 0,1M com EDTA 10 mM durante 10 min a 4°C, as amostras foram posteriormente lavadas com água destilada e incubadas durante 2 min em cloreto de cobalto 2%. O processo foi repetido 3 vezes. Mais uma vez as amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas em séries ascendentes de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%), finalizado com xilol antes da fixação das amostras com Entellan® (KRAUSE et al., 2017a).

Após a finalização das lâminas, as imagens de microscopia de luz coradas com os pHs foram analisadas com auxílio do software ImageJ® para mensuração da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares, Tipo I, IIa e IIx (n=100 por tipo de fibra), para isso foi realizada a calibração do software a partir das imagens selecionadas na aba “*Set Scale/Analyze*” e utilizando a ferramenta “*Straight*” para mensurar a barra de

escala de cada imagem, desta forma são alterados os campos “*Known Distance*” com o valor referente a barra e a unidade de medida para μm , além disso na barra de tarefas foi necessário selecionar a opção “*Analyze/ Set Measurements*” e ticar a opção de variável a ser calculada no caso a Área. Para mensuração de cada fibra e após a calibração a ferramenta “*Polygon Selections*” foi selecionada e para cada fibra mensurada a tecla M foi pressionada para registro das áreas, por fim na janela de resultados, estes foram copiados e as médias e desvios padrões estabelecidos e analisados por meio do software GraphPad Prism® 8.0.1 (Figura 7).

Para o cálculo da densidade numérica foram selecionadas 10 imagens preenchidas com as fibras musculares com ampliação de 100x, e por meio do software ImageJ® foi selecionada a opção “*Multi point tool*” onde foram demarcados os tipos I, IIa e IIx das fibras transversais, por fim para cada imagem foi estabelecida a quantidade de fibras por tipo, a média em todos os grupos e a porcentagem final. Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism® 8.0.1 (Figura 7).

Figura 7. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica Histoquímica de ATPase Miofibrilar.



Fonte: Elaborado pelo autor por meio do Lucidchart®. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica de em Microscopia de Luz - Histoquímica de ATPase Miofibrilar em diferentes pH's (4.3; 4.6; 9.4) para identificação dos tipos de fibras musculares (Tipo I, IIa e IIx), mensuração de suas Áreas de Secção Transversa e a Densidade Numérica dos diferentes tipos de fibra por grupo.

5.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

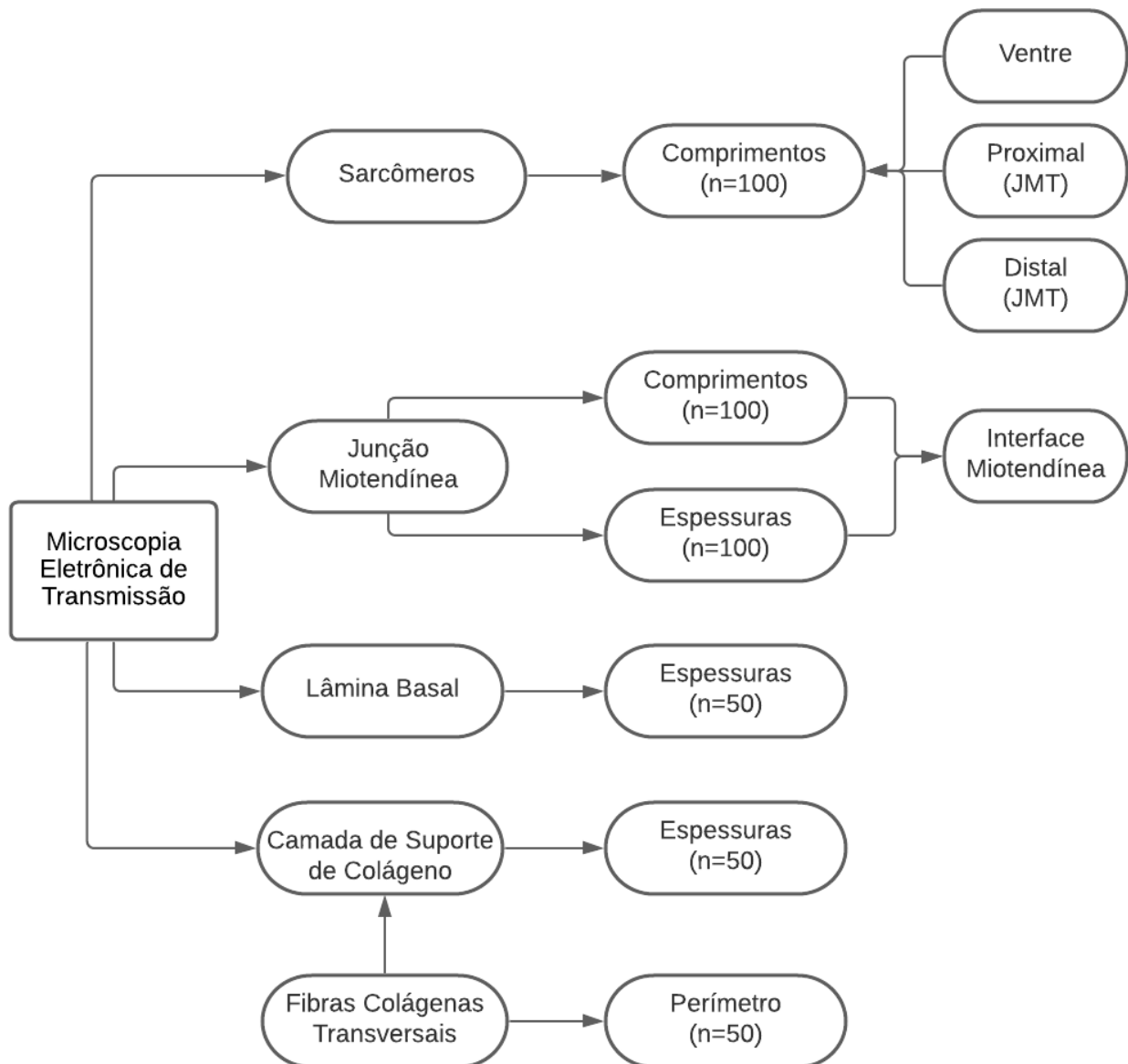
Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, eutanasiados (Overdose de anestésico – Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), via intraperitoneal), as amostras da JMT (3mm³) do músculo bíceps braquial direito foram dissecadas e imersas em solução Karnovsky modificado, durante 48h à 4°C. Posteriormente as amostras foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1% durante 2h, à 4°C, lavadas com solução salina. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação em série crescente de álcoois.

Após a desidratação as amostras foram incluídas em resina (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit Electron Microscopy Sciences, USA). Os blocos foram

trimados para a realização de cortes semifinos de 10 μm (Leica Ultracut UCT, Germany), e corados com o método de azul de toluidina 1%. Após selecionada a área de interesse, foram realizados cortes ultrafinos de 60 nm, coletados em telas de cobre de 200 “mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uranila 4%, lavados em água destilada, contrastados em solução aquosa de citrato de chumbo 0.4% e lavados em seguida com água destilada (CIENA et al., 2012).

As telas foram examinadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM 100, no Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP. Para análise morfométrica foram mensurados os comprimentos dos sarcômeros ($n=100$) da região do ventre muscular, dos sarcômeros proximais ($n=100$) e distais ($n=100$) da JMT, os comprimentos das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas ($n=75$), assim como suas espessuras ($n=100$) e a interface miotendínea ($n=10$) que delimita os tecidos muscular e tendíneo padronizada em 5 cm por imagem, a 48,4% de ampliação, calibrada a partir das barras de escala (software ImageJ®). Além disso foram mensuradas espessuras da lâmina basal em diferentes regiões ao longo da interface miotendínea ($n=50$), espessuras da camada de suporte de colágeno (CSC) ($n=50$) e o perímetro das fibras colágenas transversais que constituem a CSC ($n=50$) (PIMENTEL NETO et al., 2020) (Figura 8).

Figura 8. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão.



Fonte: Elaborado pelo autor por meio do Lucidchart®. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão, onde foram analisados os Sarcômeros de diferentes regiões, a Junção miotendínea (JMT) e a Lâmina basal entre a interface miotendínea e a matriz extracelular.

5.7. Técnica - Imunofluorescência

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, para imunomarcação da JNM e da JMT.

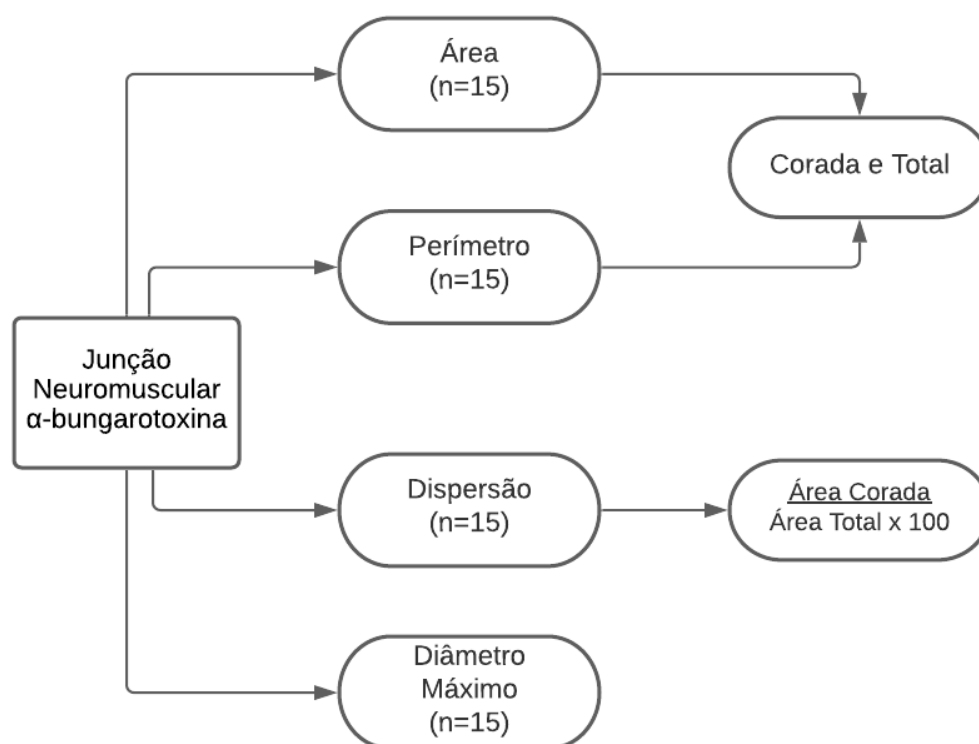
5.7.1. Junção Neuromuscular (α -bungarotoxina)

As amostras do ventre muscular foram utilizadas para visualizar o componente pós-sináptico de cada JNM. Foram realizadas secções longitudinais com espessura de 100 μ m em um criostato a -20°C , as secções foram coletadas em lâminas sililizadas e, em seguida, as amostras foram lavadas 5 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS)

contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) e incubadas durante a noite (16h) em uma câmara umidificada a 4°C em solução contendo rodamina conjugada com α -bungarotoxina (BTX; Molecular Probes, Eugene, OR-T-1175), diluída a 1: 600 em PBS. Após essa etapa, as amostras foram lavadas 5 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA), revestidas com Prolong (Molecular Probes, Eugene, OR-P 10144), posterior aplicação das lamelas e armazenadas em -20°C. Para morfometria, foram capturadas 15 imagens com ampliação de 1000X, por meio do Microscópio de Fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) da UNESP Rio Claro/SP (KRAUSE et al., 2017; ROCHA et al., 2020).

5.7.2. Análises Morfométricas – Junção Neuromuscular

Figura 9. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica de Imunofluorescência com α -bungarotoxina na junção neuromuscular.



Fonte: Elaborado pelo autor por meio do Lucidchart®. Diagrama das mensurações realizadas a partir da técnica de Técnica de Imunofluorescência da junção neuromuscular.

Para as mensurações da região pós-sináptica foi utilizado o software Imagej®. Para isso uma imagem foi selecionada por vez, no exemplo temos uma (A) imagem do Grupo ES, antes de qualquer mensuração a opção "*Straight*" foi selecionada, uma linha foi traçada de acordo com a barra de escala, na aba "*Analyze/Set Scale*" em "*Known Distance*" o valor da barra foi alterado assim como a unidade de medida para μm (Figura 10).

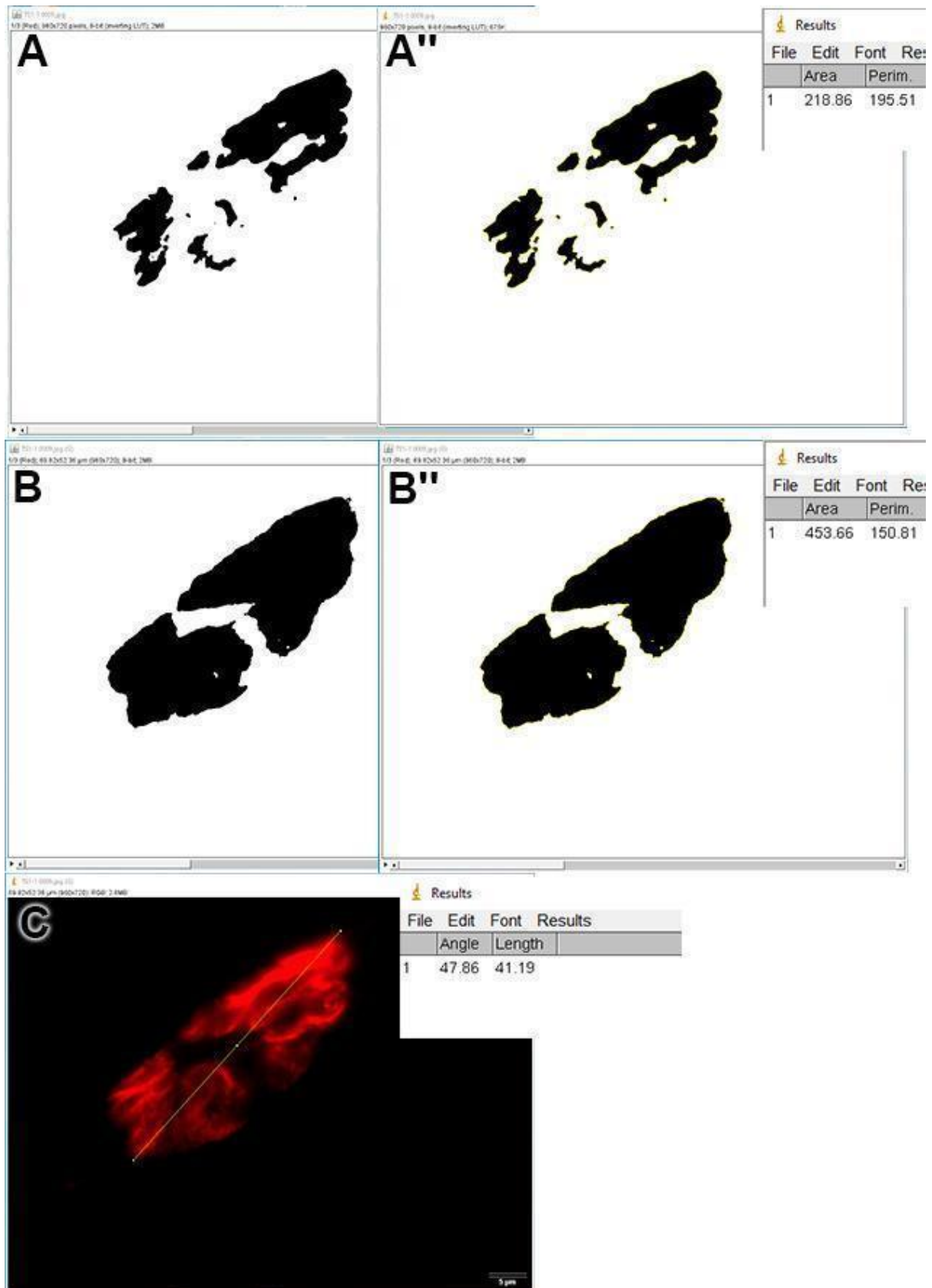
(B) Para mensuração da área corada e perímetro corado foi necessário primeiramente, acessar a aba “*Analyze/Set Measurements*” e selecionar as opções “*Area*” e “*Perimeter*”, o passo seguinte consistiu em acessar a aba “*Process/Binary/Make Binary*”, na sequência uma impressão desta área foi apresentada pelo software. Desta forma, ao clicar na aba “*Edit/Create Selection*” e ao pressionar a tecla M, os valores de área e perímetro foram expressos em uma nova janela intitulada “*Results*” (Figura 10).

(C) O procedimento para o cálculo da área total e perímetro total foi semelhante com o da área corada e perímetro corado, porém, antes de dar início a binarização “*Binary*” foi necessário acessar a aba “*Image/Type/RGB Stack*”, em seguida na aba “*Image/Adjust/Threshold*” foi feita a padronização da área de acordo com a imagem, destacando toda a região apresentada sendo ela corada intensamente ou não, os próximos passos foram os mesmos demonstrados no tópico B (Figura 10).

(D) A mensuração do diâmetro máximo precisa ser ajustada anteriormente em “*Analyze/Set Measurements*”, todas as opções foram desmarcadas, em seguida a opção de linha foi selecionada e os extremos da região em destaque foram percorridos diagonalmente, até que uma linha foi traçada de um extremo ao outro, em seguida ao pressionar a tecla M, uma janela se abre com o resultado do comprimento do diâmetro máximo (JONES et al., 2017) (Figura 10).

Além disso foi mensurada a Dispersão da placa motora considerada pela divisão da área corada da placa final pela área total e multiplicado por 10, que indica a quantidade de AChR dentro de uma determinada área (DESCHENES et al., 2013) (Figura 10).

Figura 10. Mensurações realizadas por meio do software ImageJ® após a aquisição das imagens de imunomarcacão com α -bungarotoxina.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Para as mensurações da região pós-sináptica foi utilizado o software ImageJ®, para isso uma imagem foi selecionada por vez de cada grupo experimental, no exemplo temos uma (A) imagem do Grupo ES binarizada utilizada para mensuração da área corada e perímetro corado após a (A'') seleção realizada pelo software, na imagem abaixo é possível visualizar (B) a binarização e (B'') a seleção

que são utilizadas para mensuração do cálculo da área total e perímetro total e por fim (C) o exemplo de delimitação para mensuração do diâmetro máximo.

5.7.3. Junção Miotendínea - Telócitos

As amostras da JMT foram utilizadas para visualizar o nicho de telócitos na região, para isso foram realizadas secções longitudinais com espessura de 10 μ m em um criostato a -20°C, em seguida, as amostras foram lavadas em solução de PBS 3 vezes, permeabilizadas com Triton X-100 - 0,1%, durante 20 minutos; nova lavagem com PBS + BSA para bloqueio de marcação inespecífica. Após esta etapa foi realizada a incubação por uma hora com o anticorpo policlonal CD34 (Invitrogen® PA5-85917) (1:1000) que foi utilizado para demarcar os núcleos e os prolongamentos dos telócitos, posteriormente foram realizadas 2 lavagens com PBS, e incubado por 1 hora o anticorpo secundário “Alexa Fluor 547” – IgG (anti-rabbit). Posteriormente, as lâminas foram lavadas novamente 2x com PBS. Para finalização as lâminas foram montadas com ProLongGold® (Molecular Probes, Eugene, OR-P10144) reagente contendo 4’6-diamidino-2-phenylindole dihidrochoryde (DAPI) para marcação nuclear. As imagens foram capturadas no Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) da UNESP Rio Claro/SP (PIMENTEL NETO et al. 2020).

5.8. 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.

A normalidade de distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk (alfa=0.05), e as variáveis com distribuição não-normal foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0.05$).

Os dados com distribuição normal foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene, a partir da subtração dos valores individuais pela mediana do grupo, e os resultados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA *One Way* (paramétrica). Caso o valor de “p” fosse baixo, 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 (T1) e da oitava semana (T2) de treinamento que verificaram a progressão intragrupo no teste de carga, número de

escaladas e tempo por escalada, foram considerados como dados dependentes, dessa forma, foi escolhido o teste paramétrico ANOVA *Two-Way*, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS

Após as devidas análises estabelecidas e a definição dos dados previstos para esta etapa os resultados foram organizados e apresentados a seguir.

6.1. Análises Funcionais

As análises funcionais foram estabelecidas do início ao fim do protocolo, para avaliação da massa corporal, massa muscular, teste de carga máxima carregada e desempenho funcional de todos os grupos experimentais.

6.1.1. Massa Corporal

A mensuração da massa muscular dos animais foi realizada semanalmente e analisada estatisticamente em 3 diferentes períodos (P1 – primeira semana, P2 – quinta semana, P3 – oitava semana) em todos os grupos experimentais para avaliar a adaptação corpórea dos animais ao protocolo.

No Grupo S houve aumento de 9,2% do P1 para P2 e 15,3% do P1 para P3, já entre P2 e P3 o aumento foi de 5,5%, as comparações não apresentaram diferenças significativas.

No Grupo E houve aumento de 9,8% do P1 para P2 e 18,9% do P1 para P3, já entre P2 e P3 o aumento foi de 8,2%, todas as comparações não apresentaram diferenças significativas.

No Grupo ES houve aumento de 11,2% do P1 para P2 e 20,7% do P1 para P3, já entre P2 e P3 o aumento foi de 8,5%, as comparações não apresentaram diferenças significativas, porém o Grupo ES foi o que apresentou maior aumento percentual em todos os períodos comparados.

No Grupo EES houve aumento de 9,2% do P1 para P2 e 17,5% do P1 para P3, já entre P2 e P3 o aumento foi de 7,6%, as comparações não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 1. Massa corporal de todos os grupos experimentais.

Períodos	Grupos			
	S	E	ES	EES
P1	366 ± 21.8	395 ± 29.3	395.5 ± 29	396 ± 24.3
P2	400 ± 29.5	434.5 ± 34.9	440 ± 32.6	432.5 ± 29.1
P3	422 ± 35	470 ± 37.1	477.5 ± 31.9	465.5 ± 42.9

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Médias e desvios padrões da massa corporal dos animais na primeira (P1), quinta (P2) e oitava semana (P3) de protocolo expresso em gramas (g). Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0.05$.

6.1.2. Massa Muscular

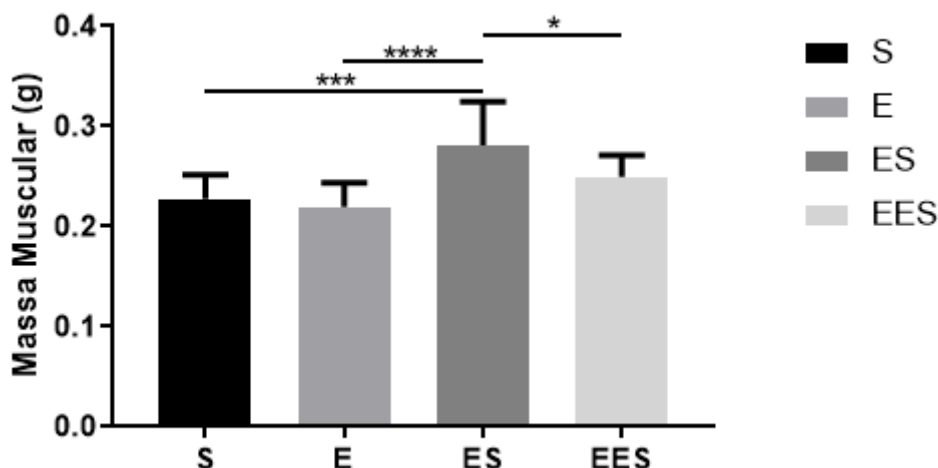
A mensuração do músculo bíceps braquial foi realizada após a dissecação no período pós protocolo em todos os grupos experimentais para demonstração da adaptação da massa dos animais (Figura 11).

O Grupo E apresentou redução de 3,5% da massa muscular em relação a S, o Grupo ES e EES apresentaram aumento de 23,2% e 19,6%, respectivamente em relação ao Grupo S, sendo significativa a diferença entre S e ES ($p < 0.001$).

Os Grupos ES e EES apresentaram aumento de 27,2% e 13,6%, respectivamente em relação ao Grupo E, sendo a diferença estatística entre E e ES significativa ($p < 0.0001$).

Entre os Grupos ES e EES a diferença foi significativa ($p < 0.05$) com redução de 10,7% entre a massa muscular do músculo bíceps braquial.

Figura 11. Massa muscular do Bíceps Braquial pós-período de protocolo.



Fonte: Elaborada pelo autor. Médias e desvios padrões da massa do músculo bíceps braquial expresso em gramas (g). Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0.05$. ***S≠E ($p < 0.001$); ****E≠ES ($p < 0.0001$); *ES≠EES ($p < 0.05$).

6.1.3. Teste de Carga Máxima Carregada/ Teste de Desempenho Funcional

A análise funcional foi feita nos grupos que realizaram o protocolo de escada vertical. Desta forma, apresentamos a evolução quanto ao desempenho dos grupos perante o protocolo e o aumento de carga que representa o ganho de força dos animais, frente ao protocolo proposto (Figura 12).

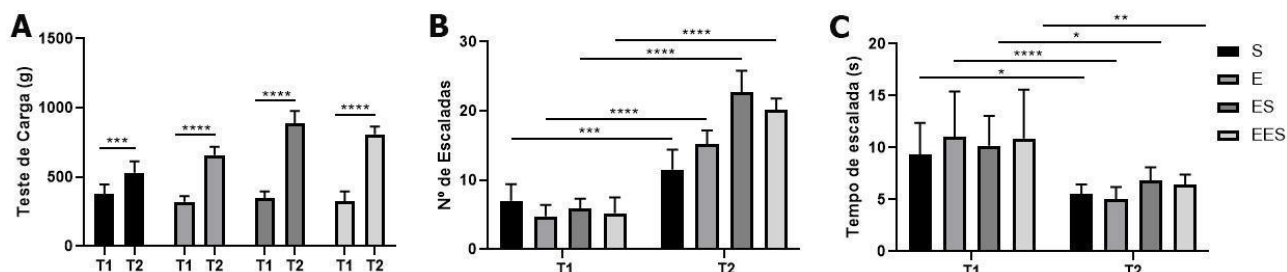
Na Figura 12A foi possível evidenciar o aumento significativo ($p < 0.0001$) de carga do teste pré para o teste pró protocolo em todos os grupos experimentais, no Grupo S o aumento foi de 41,4%, no Grupo E o aumento foi de 205,8%, no Grupo ES o aumento foi de 255,8% e no grupo o aumento foi 284,4%, o que demonstra a eficácia do protocolo periodizado, sem carga, com carga e dos treinamentos intercalados, com o aumento da carga máxima carregada e consequentemente no ganho de força destes grupos.

A análise realizada a partir das médias e desvios padrões do número de escaladas foi significativa ($p < 0.0001$) em todos os grupos experimentais. No Grupo S o aumento foi de 64,2%, no Grupo E observou-se um aumento de 316,6% no teste realizado nas semanas pré e pós protocolo, no Grupo ES o aumento foi de 384,7% e no Grupo EES o aumento foi de 388,4%, desta forma demonstramos não só o aumento de força exercida, mas também uma melhora no desempenho destes grupos nos testes com carga (Figura 12B).

Na análise do tempo de escada entre os testes T1 e T2, em todos os grupos observamos a redução do tempo de realização, no Grupo S foi de 40,5%, no Grupo E foi

de 54,5% ($p<0.0001$), no Grupo ES a redução foi de 33,2% e no Grupo EES a redução foi de 40,7% ($p<0.001$) (Figura 12C).

Figura 12. Teste de Carga Máxima Carregada, do Número de Escaladas e do Tempo de Escalada do Teste de Carga Máxima.



Fonte: Dados obtidos pelo autor. Análise do Teste de Carga Máxima Carregada e do Teste de Desempenho Funcional de todos os grupos experimentais realizados na primeira (T1) e na última semana (T2) de protocolo, os dados foram analisados estatisticamente e foi realizado o pós-teste de Bonferroni. Teste de Carga: ***S ($p<0.001$); **** E, ES e EES ($p<0.0001$). N° de Escaladas: ***S ($p<0.001$); **** E, ES e EES. Tempo de Escalada: *S e ES ($p<0.05$); **EES ($p<0.01$); ****E ($p<0.0001$).

6.2. Microscopia de Luz

As imagens de microscopia de luz coradas com a técnica de HE e PS foram obtidas e analisadas respectivamente para obtenção dos dados de dimensão fractal, área e para análise descritiva da junção miotendínea.

6.2.1. Dimensão Fractal

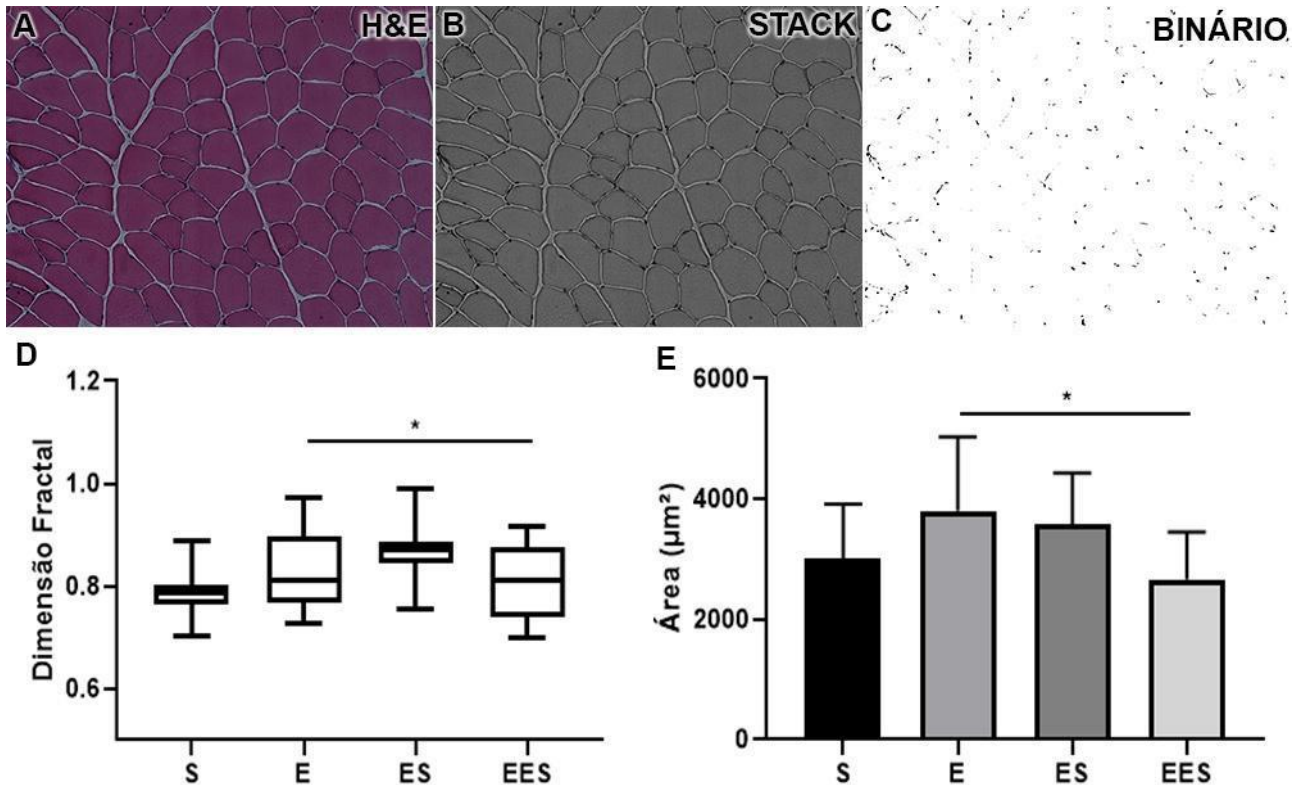
A dimensão fractal foi analisada por meio das imagens obtidas do ventre muscular em todos os grupos experimentais.

Análise Núcleos Celulares

A diferença percentual da dimensão fractal dos núcleos celulares do Grupo S foi 6,4% menor do que no Grupo E, 10,2% menor em comparação com ES e 3,8% menor em relação ao Grupo EES. O Grupo E em relação a ES apresentou valores 3,6% menores do que em ES e 2,4% ($p<0.05$) maiores em relação a EES. Os grupos que utilizaram sobrecarga adicional apresentaram um percentual de 5,8% maior em ES em relação a EES (Figura 13D).

A diferença percentual da área corada por HE que representa os núcleos celulares no Grupo S em relação ao Grupo E foi 26,2% menor, em relação a ES foi 18,8% menor e em relação a EES o percentual foi 11,4% maior. Entre o Grupo E e ES a diferença percentual foi 5,8% maior e entre E e EES foi de 29,8% ($p<0.05$) maior. Entre os Grupos com sobrecarga adicional o percentual foi 25,4% maior em ES em relação a EES (Figura 13E).

Figura 13. Dimensão fractal dos núcleos celulares e a área composta por estes núcleos.



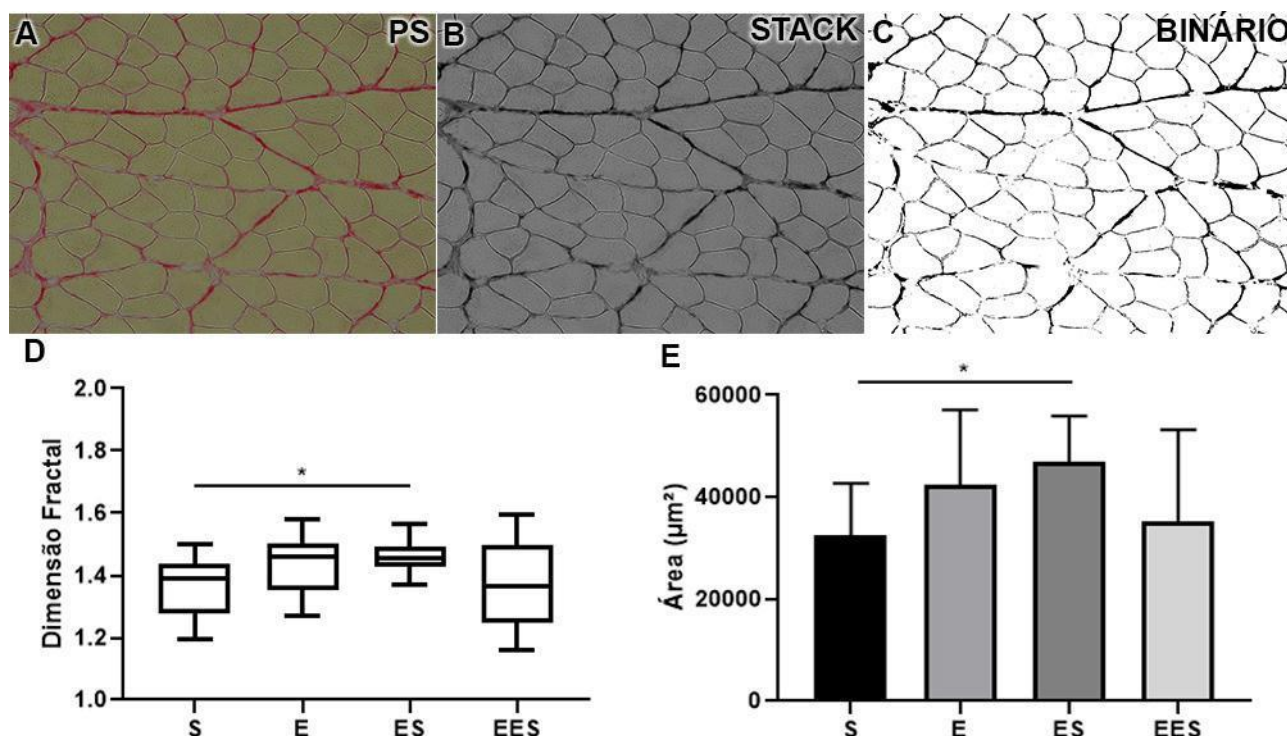
Fonte: Elaborada pelo autor. Médias e desvios padrões da (D) Dimensão fractal dos núcleos celulares e da (E) Área composta por estes núcleos celulares de todos os grupos experimentais em micrômetros quadrados (μm^2). Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0.05$. *E $\neq$ EES ($p < 0.05$). Ampliação: 200x.

Análise Tecido Conjuntivo Associado

A diferença percentual da dimensão fractal do tecido conjuntivo associado no Grupo S foi de 5,1% menor do que no Grupo E, 7,3% ($p < 0.05$) menor em comparação com ES e 0,7% menor em relação ao Grupo EES. O Grupo E em relação a ES apresentou valores 2% menores do que em ES e 4,1% maiores em relação a EES. Os grupos que utilizaram sobrecarga adicional relacionada apresentaram um percentual de 6,1% maior em ES em relação a EES (Figura 14D).

A diferença percentual da área corada por PS do tecido conjuntivo associado no Grupo S em relação ao Grupo E foi de 29,8% menor, em relação a ES foi 44,1% ($p < 0.05$) menor e em relação a EES o percentual foi 7,8% menor. Entre o Grupo E e ES a diferença percentual foi de 10,9% menor e entre E e EES foi de 16,9% maior. Entre os Grupos com sobrecarga adicional o percentual foi 25,1% maior em ES em relação a EES (Figura 14E).

Figura 14. Dimensão fractal da composição de tecido conjuntivo e a área de tecido conjuntivo.



Fonte: Elaborada pelo autor. Médias e desvios padrões da (D) Dimensão Fractal do tecido conjuntivo associado e (E) da Área corada com PS que representa a composição intersticial no músculo bíceps braquial de todos os grupos experimentais expresso em micrômetros quadrados (μm^2). Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0.05$. *C≠ES ($p < 0.05$). Ampliação: 200x.

6.2.2. Análise Histoquímica – ATPase Miofibrilar

Para análise da área de secção transversa e da densidade numérica dos diferentes tipos de fibras musculares foi utilizada a técnica histoquímica de ATPase Miofibrilar que possibilitou por meio dos pHs 4.3, 4.6 e 9.4 a diferenciação das fibras I, II e IIx em cortes transversais de todos os grupos experimentais.

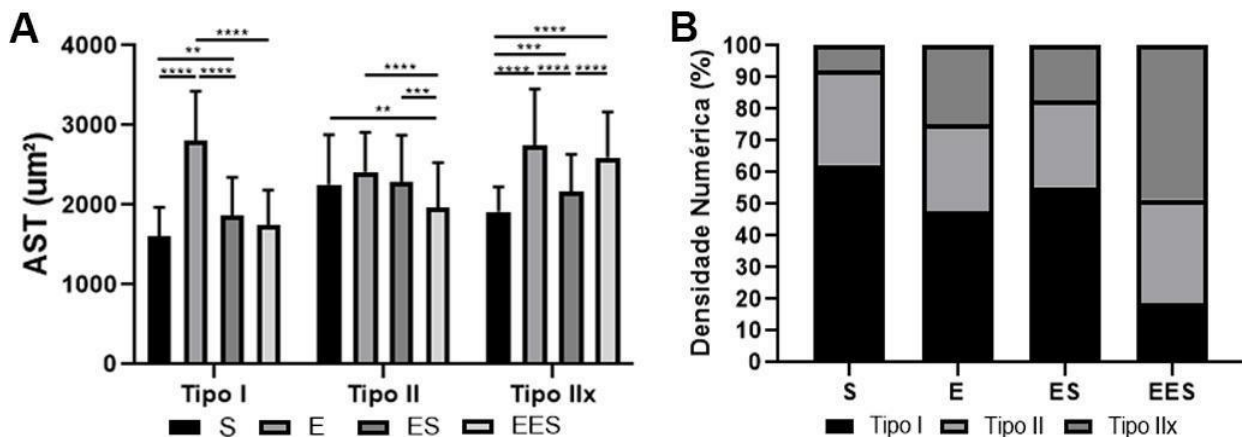
Os dados percentuais das fibras do tipo I demonstraram no Grupo S fibras com área 73,9% ($p < 0.0001$) menores do que em E, 15,9% ($p < 0.005$) menores em relação a ES e 8,5% menores em relação a EES. Entre o Grupo E e ES a área percentual foi 33,3% ($p < 0.0001$) maior, e 37,5% ($p < 0.0001$) maior em relação a EES. Entre os grupos ES e EES a comparação percentual demonstrou a média da área 6,3% maior em ES do que em EES (Figura 15A).

Os dados percentuais das fibras do tipo II no Grupo S foram 7,1% menores do que em E, 1,3% menores em relação a ES e 12,7% ($p < 0.01$) maiores em relação a EES. Entre o Grupo E e ES a área percentual foi 5,3% maior, e 18,5% ($p < 0.0001$) maior em relação a EES. Entre os grupos ES e EES a comparação percentual apresentada foi 13,9% ($p < 0.001$) maior em ES do que em EES (Figura 15A).

Os dados percentuais das fibras do tipo IIx no Grupo S foram 43,4% ($p<0.0001$) menores do que em E, 12,8% ($p<0.001$) menores em relação a ES e 35,5% ($p<0.0001$) menores em relação a EES. Entre o Grupo E e ES a área percentual foi 21,3% ($p<0.0001$) maior, e 5,4% maior em relação a EES. Entre os grupos ES e EES a comparação percentual apresentada foi 20,2% ($p<0.0001$) menor em ES do que em EES (Figura 15A).

No Grupo S a porcentagem da densidade numérica das fibras tipo I foi de 62,4%, das fibras tipo II foi de 29,9% e das fibras tipo IIx foi de 7,7%. No Grupo E a porcentagem das fibras tipo I foi de 47,5%, das fibras tipo II foi 27,6% e das fibras tipo IIx foi de 24,9%. No Grupo ES as fibras tipo I representaram 55,4%, as fibras tipo II 27,3% e as fibras tipo IIx foram 17,3%. Por fim, no Grupo EES as fibras tipo I quantificadas representaram 18,5% da densidade, as fibras tipo II 32,9% e as fibras tipo IIx 48,6% (Figura 15B).

Figura 15. Área de Secção Transversa e Densidade Numérica dos diferentes tipos de fibra muscular.



Fonte: Elaborada pelo autor. Médias e desvios padrões da área de secção transversa (AST) dos diferentes tipos de fibras musculares (A) Tipo I, Tipo II, Tipo IIx identificados com os pHs 4.3, 4.6 e 9.4 do músculo bíceps braquial expresso em micrômetros quadrados (μm^2); (B) Densidade numérica quantificada para cada tipo de fibra dentre os grupos experimentais. Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p<0.05$. Tipo I: **** $S\neq E$, $E\neq ES$, $E\neq EES$ ($p<0.0001$); $S\neq ES$ ** $p<0.005$. Tipo II: ** $S\neq EES$ ($p<0.01$), **** $E\neq EES$ ($p<0.0001$), *** $ES\neq EES$ ($p<0.001$). Tipo IIx: **** $S\neq E$, $S\neq EES$, $E\neq ES$, $ES\neq EES$ ($p<0.0001$); *** $S\neq ES$ ($p<0.001$).

6.2.3. Junção Miotendínea

Por meio da microscopia de luz foi possível diferenciar as características estruturais da JMT dos grupos experimentais.

No Grupo S foi possível evidenciar núcleos celulares longitudinais, paralelos à JMT provenientes da matriz extracelular. Na região tendínea, observam-se núcleos ovais, que possuem distanciamento em relação a junção miotendínea (Figura 16A).

Nas imagens de PS identificou-se finas camadas de tecido intersticial entre as fibras musculares adjacentes e a conexão que se estende do músculo até o tendão formando a JMT (Figura 16E).

No Grupo E foi possível evidenciar núcleos celulares aglomerados na região da JMT, estes estão posicionados paralelamente na longitudinal, porém é possível observar características específicas de alguns destes núcleos que apresentam formatos ovalados e alongados em diferentes regiões da figura (Figura 16B).

O tecido conjuntivo associado foi mais espesso e possui a conexão aparentemente mais concisa com o tecido muscular (Figura 16F).

No Grupo ES observou-se núcleos celulares alongados em grande quantidade em paralelo com a JMT, enquanto os núcleos ovalados se apresentam em conjunto na região da JMT (Figura 16C).

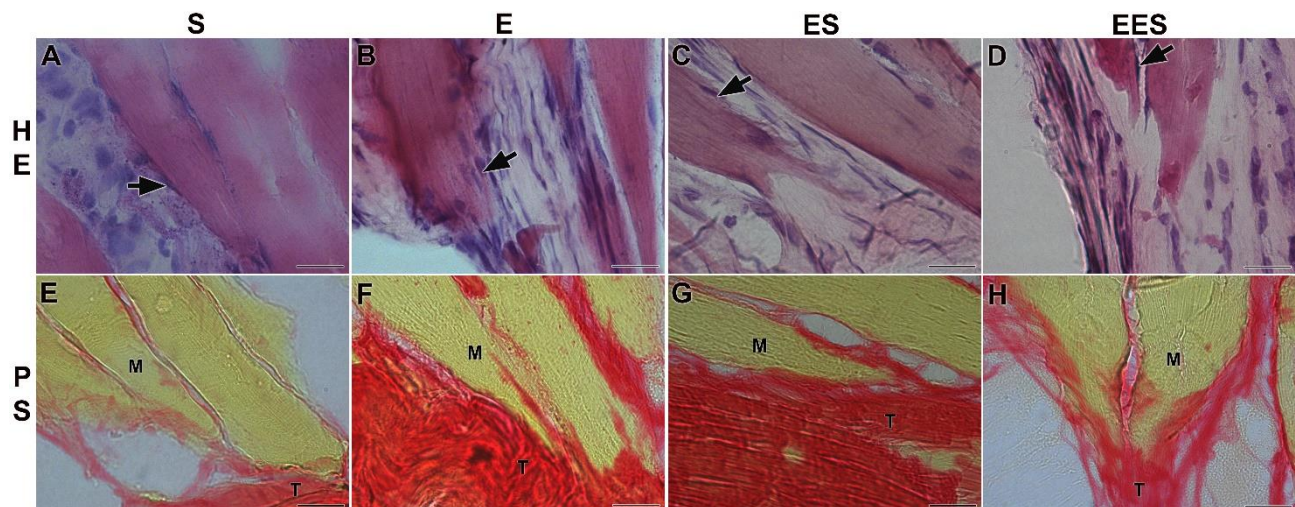
O tecido tendíneo foi observado organizado interligado à fibra muscular, onde suas linhas colágenas acompanham o direcionamento paralelo da fibra, disposição esta semelhante à dos núcleos apresentados no mesmo grupo experimental (Figura 16G).

No Grupo EES os grupamentos celulares se aglomeram principalmente no tecido tendíneo e paralelamente às fibras musculares esqueléticas, possuem formatos ovalados

e alongados em alguns casos, porém não estavam aglomerados na região da JMT (Figura 16D).

O tecido conjuntivo associado interligou duas fibras musculares paralelas e possuía aspecto fibroso, principalmente pelo delineamento das fibras colágenas na longitudinal (Figura 16H).

Figura 16. Microscopia de Luz: cortes longitudinais da Junção Miotendínea dos Grupos Sedentário (S), Escalada (E), Escalada Sobrecarga (ES) e Escalada/Escalada Sobrecarga (EES) para as colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e Picro-Sirius (PS).



Fonte: Elaborada pelo autor. Imagens de Microscopia de Luz cortes longitudinais da junção miotendínea dos grupos experimentais. (seta) núcleos celulares adjacentes; (M) fibras musculares longitudinais; (T) tecido tendíneo. Ampliação: 400x.

6.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os sarcômeros e as ultraestruturas da JMT foram mensuradas e analisadas estatisticamente diante das imagens obtidas por MET.

6.3.1. Sarcômeros

Os comprimentos dos sarcômeros do ventre, proximais e distais anatomicamente relacionados, foram mensurados em todos os grupos experimentais para análise de suas adaptações diante dos diferentes protocolos de escada vertical, evidenciados nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 17).

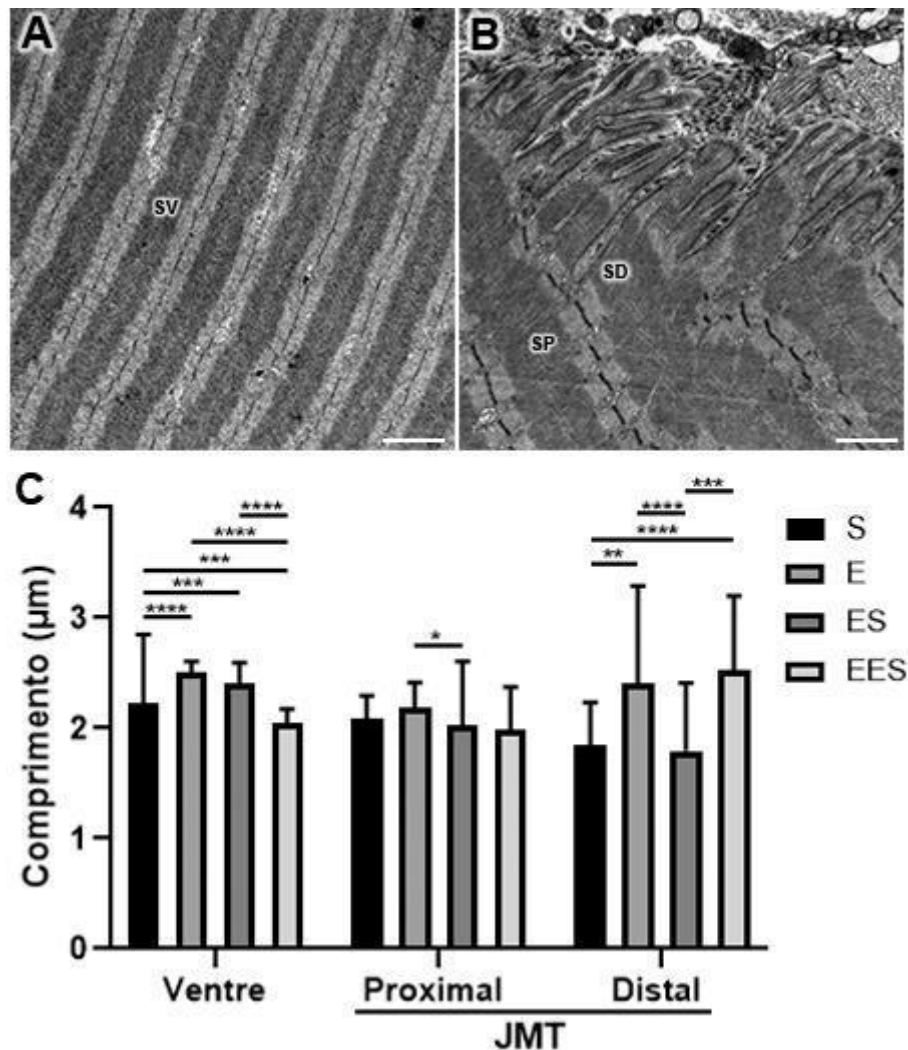
A análise morfométrica dos comprimentos dos sarcômeros do ventre demonstrou os seguintes dados percentuais. Os comprimentos do Grupo S foram 12,3% ($p < 0.0001$) menores do que o Grupo E, em relação ao Grupo ES o Grupo S foi 7,9% ($p < 0.005$) menor e por fim em relação ao Grupo EES o Grupo S foi 8,5% ($p < 0.005$) maior. No Grupo E

evidenciou-se comprimentos 3,9% maiores do que no Grupo ES e em comparação com EES o Grupo E apresentou comprimentos 18,6% ($p<0.0001$) maiores, além disso Grupo ES demonstrou comprimentos 15,2% ($p<0.0001$) maiores do que no Grupo EES (Figura 17C).

Os comprimentos dos sarcômeros proximais nos proporcionaram os seguintes percentuais. No Grupo S os comprimentos foram 4,4% menores do que no Grupo E, em relação ao Grupo ES o Grupo S foi 2,7% maior e por fim em relação ao Grupo EES o Grupo S foi 4,9% maior. No Grupo E evidenciou-se comprimentos 6,9% maiores do que no Grupo ES e em comparação com EES o Grupo E apresentou comprimentos 9% ($p<0.05$) maiores, já no Grupo ES demonstrou comprimentos 2,2% maiores do que no Grupo EES (Figura 17C).

Em relação aos comprimentos dos sarcômeros distais, os mesmos apresentaram os seguintes percentuais. No Grupo S os comprimentos foram 30,6% ($p<0.01$) menores do que no Grupo E, em relação ao Grupo ES o Grupo S foi 2,8% maior e por fim em relação ao Grupo EES o Grupo S foi 36,8% maior ($p>0.0001$). No Grupo E evidenciou-se comprimentos 25,2% ($p<0.0001$) maiores do que no Grupo ES e em comparação com EES o Grupo E apresentou comprimentos 4,7% ($p<0.05$) menores, entretanto o Grupo ES demonstrou comprimentos 40,1% ($p<0.001$) menores do que no Grupo EES (Figura 17C).

Figura 16. Descrições morfoquantitativas dos sarcômeros do ventre, proximal e distal da junção miotendínea, por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão.



Fonte: Elaborada pelo autor. Médias e desvios padrões dos comprimentos dos (A) Sarcômeros do ventre muscular (SV), (B) proximal (SP) e distal (SD) da JMT. Dados tratados estatisticamente com a análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0.05$. Ventre: ****S≠E, E≠EES, ES≠EES ($p < 0.0001$); ***S≠ES, S≠EES ($p < 0.001$). JMT: Proximal: *E≠ES ($p < 0.05$). Distal: **S≠E ($p < 0.01$); ****S≠EES, E≠ES ($p < 0.0001$); ***ES≠EES ($p < 0.001$). Ampliações: (A)10.000x; (B)12.000x.

6.3.2. Junção Miotendínea

A partir das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão da JMT foram mensurados os comprimentos e espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas que são estruturas essenciais para o desenvolvimento e adaptação da interface miotendínea (Figura 18).

No Grupo S os comprimentos da invaginações mensurados foram 0,4% maiores do que no Grupo E, em relação ao Grupo ES os comprimentos foram 61% ($p < 0.0001$) menores e em relação ao Grupo EES os comprimentos foram 46,3% ($p < 0.0001$) menores. Entre os grupos que realizaram os diferentes protocolos o Grupo E apresentou comprimentos 61,8% menores do que o Grupo ES ($p < 0.0001$) e 47% menores do que o Grupo EES, por fim, a

relação entre os Grupos que utilizaram sobrecarga adicional demonstrou que o Grupo ES possui comprimentos de invaginações 9,1% ($p<0.05$) maiores do que o Grupo EES (Figura 18E).

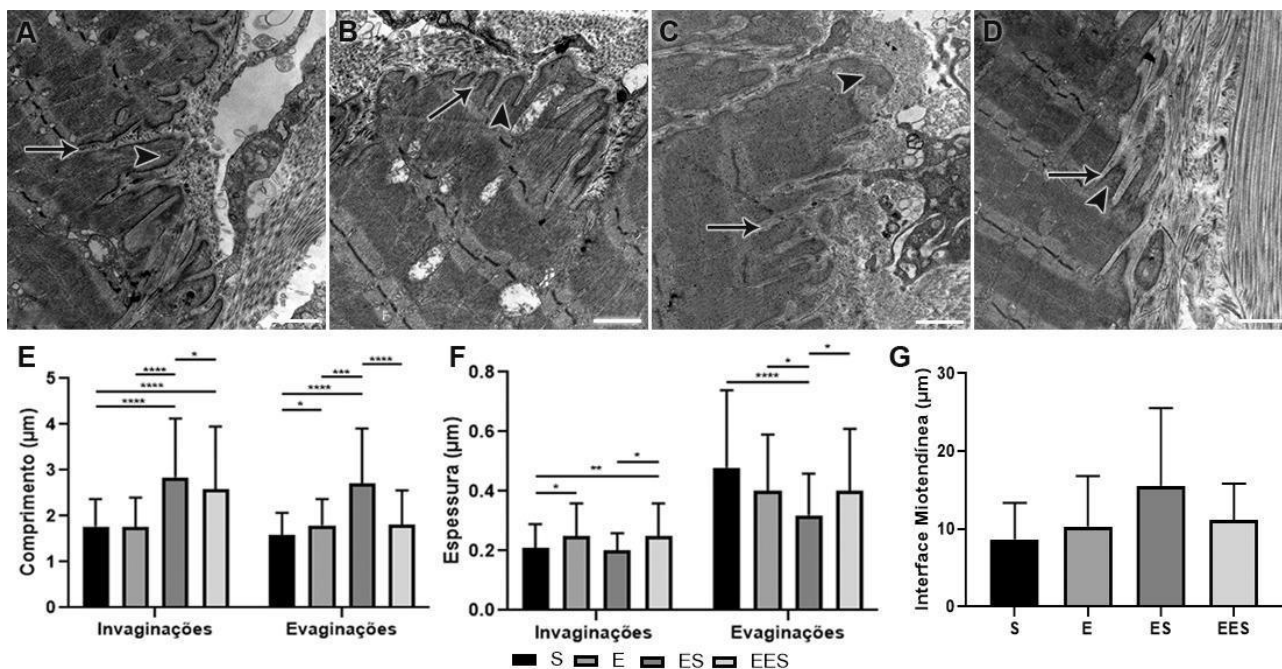
No Grupo S o percentual dos comprimentos das evaginações foi 13,2% ($p<0.05$) maior do que no Grupo E, em relação ao Grupo ES 70,3% ($p<0.0001$) menor e em relação ao Grupo EES foi 13,5% ($p<0.0001$) menor. Entre os grupos que realizaram os protocolos de escada vertical o Grupo E apresentou comprimentos 50,4% menores do que o Grupo ES ($p<0.001$) e 0,2% menor do que o Grupo EES, por fim, a relação entre os Grupos que utilizaram sobrecarga adicional demonstrou que comprimentos das evaginações no Grupo ES foram 33,3% ($p<0.0001$) maiores do que o Grupo EES (Figura 18E).

Em relação às espessuras das invaginações mensuradas do Grupo S, estas foram 19% ($p<0.05$) menores do que no Grupo E, em relação ao Grupo ES foram 4,7% maiores e em relação ao Grupo EES as espessuras foram 19% ($p<0.001$) menores. Entre o Grupo E e ES o percentual foi 20% maior e 0,4% maior do que o Grupo EES, por fim, a relação entre os Grupos que utilizaram sobrecarga adicional apresentou espessuras no Grupo ES 25% ($p<0.05$) maiores do que o Grupo EES (Figura 18F).

Em relação a espessura das evaginações sarcoplasmáticas o Grupo S apresentou um percentual 16,6% maior do que no Grupo E, em relação ao Grupos ES o Grupo S demonstrou espessuras 33,3% maiores e por fim em relação ao Grupo EES o percentual foi de 16% em maiores espessuras. Entre os grupos que realizaram os protocolos o Grupo E demonstrou espessuras 20% maiores do que em relação a ES e 0.2% maiores em relação a EES, e entre ES e ESS as espessuras foram 25% no Grupo ES (Figura 18F).

A interface miotendínea não apresentou diferenças significativas, porém o Grupo E apresentou o comprimento de interface 19% maior, o Grupo ES foi 79,7% maior e o Grupo EES foi 28,9% maior em comparação ao Grupo S. Em relação ao Grupo E, ES foi 51% maior e EES foi 8.3% maior. Entre os grupos que utilizaram sobrecarga adicional durante os protocolos ES foi 28,2% maior do que EES (Figura 18G).

Figura 17. Descrições dos elementos ultraestruturais que formam a interface miotendínea, por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão.



Fonte: Elaborada pelo autor. Médias e desvios padrões dos comprimentos e espessuras das invaginações (seta) e evaginações (cabeça de seta) sarcoplasmáticas que compreendem a interface miotendínea dos grupos (A) Sedentário, (B) Escalada, (C) Escalada Sobrecarga e (D) Escalada/Escalada Sobrecarga. Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0.05$. (E) Comprimentos Invaginações: ****S $\neq$ ES, S $\neq$ EES, E $\neq$ ES ($p < 0.0001$); *ES $\neq$ EES ($p < 0.05$). Comprimentos Evaginações: *S $\neq$ E ($p < 0.05$); ***E $\neq$ ES ($p < 0.001$); ****S $\neq$ ES, ES $\neq$ EES ($p < 0.0001$). (F) Espessuras Invaginações: *S $\neq$ E, ES $\neq$ EES ($p < 0.05$); **S $\neq$ EES ($p < 0.01$). Espessuras Evaginações: ****S $\neq$ ES ($p < 0.0001$); *E $\neq$ ES, ES $\neq$ EES ($p < 0.05$). (G) Interface Miotendínea de todos os grupos experimentais. Ampliações: (A, B, C, D) 10000x.

6.3.3. Componentes da Matriz Extracelular

A lâmina basal que limita a interface miotendínea e a matriz extracelular (Figura 19A) teve sua espessura analisada e mensurada, desta forma foi possível definir suas principais adaptações diante dos protocolos de exercício em escada vertical.

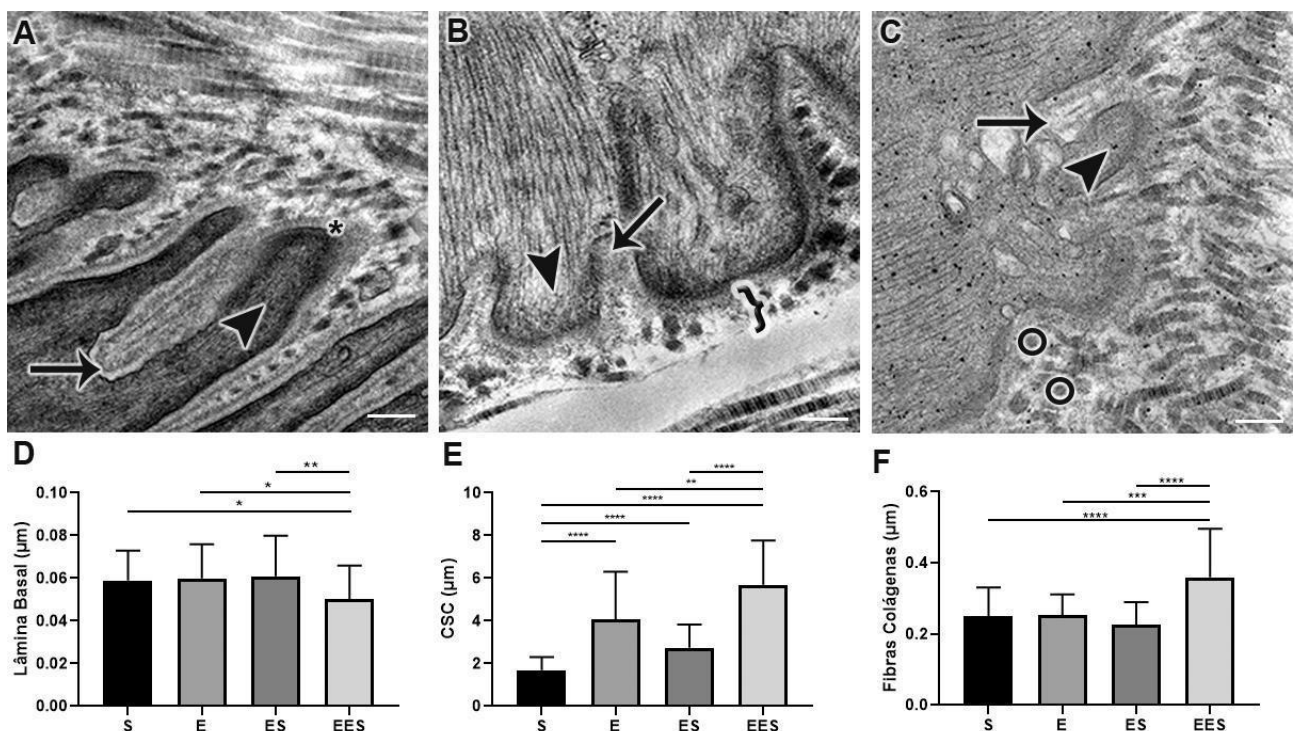
O Grupo S apresentou espessura 1,6% menor que o Grupo E, 3,3% menor do que no Grupo ES e 15,5% ($p < 0.05$) maior do que no Grupo EES (Figura 19D). Já no Grupo E foi possível evidenciar espessuras 1,6% menores do que no Grupo ES, e 16,6% ($p < 0.05$) maiores do que no grupo ES (Figura 19D). O Grupo ES demonstrou espessuras 18% ($p < 0.01$) maiores em relação ao Grupo EES (Figura 19D).

A espessura da camada de suporte de colágeno foi 138,4% ($p < 0.0001$) maior em E, 61,6% ($p < 0.001$) maior em ES e 235,1% ($p < 0.0001$) maior em EES do que em S (Figura 19E). Em relação à comparação com o Grupo E, o Grupo ES foi 32,2% ($p < 0.001$) menor e o Grupo EES foi 40,5% ($p < 0.0001$) maior (Figura 19E). Entre ES e EES o grupo de

protocolos combinados apresentou espessura 107,3% ($p<0.0001$) maior (Figura 19E).

As fibras colágenas transversais em E apresentaram comprimentos 0,7% maiores do que em S, 9,5% menores em ES em relação a S e em EES foram 43,4% maiores do que em S. No Grupo ES evidenciou-se perímetros 10,2% menores do que o Grupo E e em EES os perímetros foram 42,2% maiores do que em E. Em EES os perímetros foram 58,5% maiores do que em ES (Figura 19F).

Figura 18. Descrições morfoquantitativas das espessuras da lâmina basal, da camada de suporte de colágeno e do perímetro das fibras colágenas transversais, por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão.



Fonte: Elaborada pelo autor. Médias e desvios padrões das espessuras da lâmina basal (*) que limitam a interface miotendínea e a matriz extracelular (A) onde podemos identificar as invaginações (seta) e as evaginações sarcoplasmáticas (cabeça de seta), além de na matriz extracelular, foi possível identificar e mensurar a (chave) Camada de Suporte de Colágeno (CSC) e (círculo) as fibras colágenas transversais que estão presentes na CSC. Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p<0.05$. *S $\neq$ EES, E $\neq$ EES ($p<0.05$); **ES $\neq$ EES ($p<0.01$). Ampliação: 50.000x.

6.4. Técnica de Imunofluorescência

Os dados de plasticidade da junção neuromuscular foram demonstrados por meio da imunomarcagem com α -bungarotoxina e da JMT com CD34+ e DAPI em todos os grupos experimentais.

6.4.1. Junção Neuromuscular

A imunomarcção com α -bungarotoxina foi de suma importância para identificação da região pós-sináptica do músculo bíceps braquial e possibilitou a mensuração das adaptações desta região em todos os grupos experimentais.

Foram mensuradas a área corada e área total da região pós-sináptica demarcada. Sobre os dados da área corada, o Grupo S apresentou médias percentuais 8,5% maiores do que o Grupo E, 31,3% maiores do que o Grupo ES e 15,9% maiores do que em EES. O grupo ES apresentou-se 24,8% maior do que ES e 8% maior do que em EES, por fim o Grupo ES demonstrou percentual da média da área corada 22,4% menor do que em EES (Figura 20A).

Sobre os dados da área total, o Grupo S apresentou médias percentuais 4,9% menores do que no Grupo E, 13,5% maiores do que o Grupo ES e 12% menores do que em EES. O grupo E apresentou-se 17,6% maior do que ES e 6,7% menor do que em EES, por fim o Grupo ES demonstrou percentual da média da área total 29,6% menor do que em EES (Figura 20A).

Foram mensurados também o perímetro corado e o perímetro total da região pós-sináptica demarcada. Sobre os dados do perímetro total no Grupo S observou-se as médias percentuais 33,3% maiores do que o Grupo E, 39,2% maiores do que o Grupo ES e 36,3% maiores do que em EES. O grupo ES apresentou um percentual 8,8% maior do que ES e 4,4% maior do que em EES, por fim o Grupo ES demonstrou percentual da média do perímetro corado 4,8% menor do que em EES (Figura 20B).

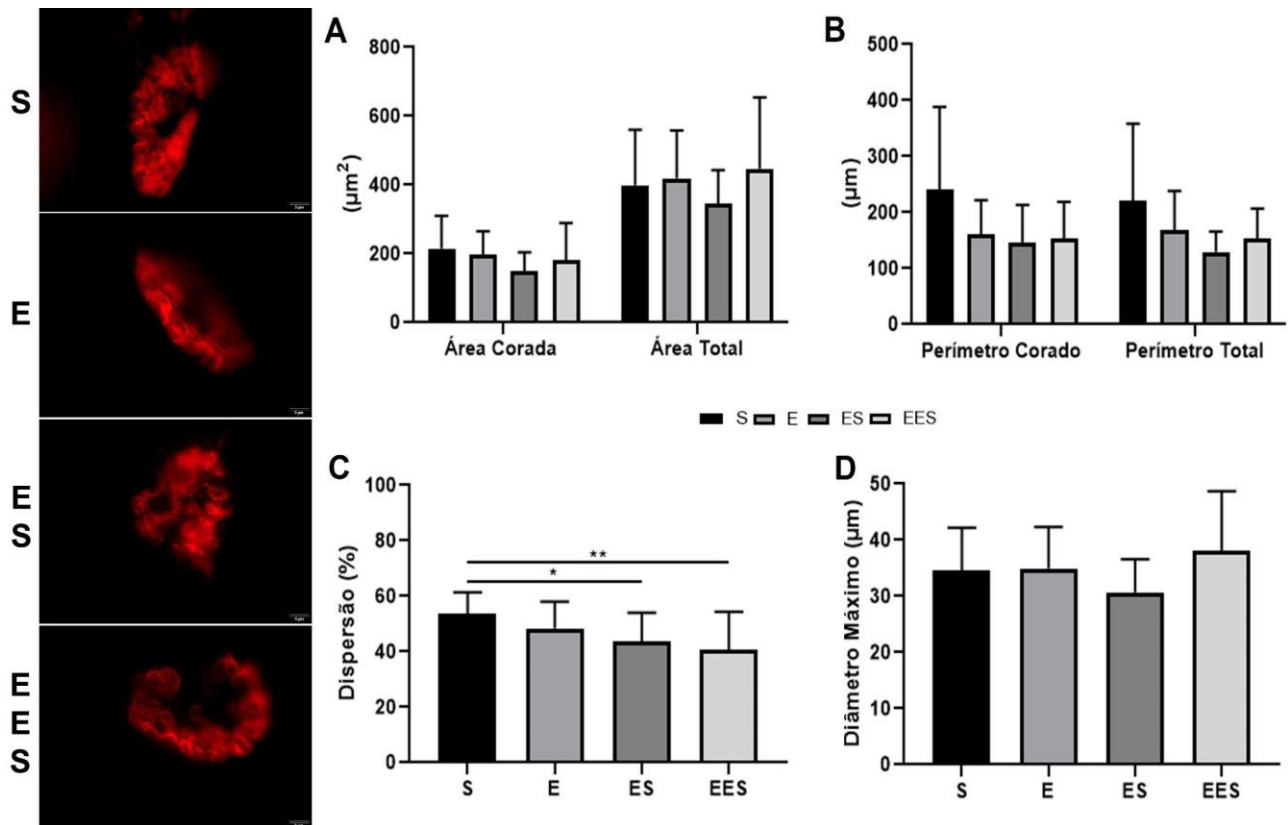
O perímetro total no Grupo S apresentou médias percentuais 23,8% maiores do que o Grupo E, 48,5% maiores do que o Grupo ES e 30,7% maiores do que em EES. O grupo E apresentou um percentual 23,1% maior do que ES e 9,1% maior do que em EES, o Grupo ES demonstrou percentual do perímetro total 18,2% menor do que em EES (Figura 20B).

A dispersão entre a área corada e a área total foi realizada e analisada estatisticamente. No Grupo S os dados percentuais foram 9,5% maiores do que o Grupo E, 18,6% ($p>0.05$) maiores do que o Grupo ES e 23,9% ($p>0.005$) maiores do que em EES. O grupo E apresentou um percentual 10,1% maior do que ES e 15,9% maior do que em EES, o Grupo ES demonstrou percentual da dispersão 6,4% maior do que em EES (Figura 20C).

Como dado adicional foi mensurado o diâmetro máximo de cada região pós-sináptica identificada nas imagens de imunofluorescência. No Grupo S os dados percentuais foram 1,1% menores do que no Grupo E, 11,3% maiores do que no Grupo ES e 10,4% menores

do que em EES. O grupo E apresentou um percentual 12,3% maior do que ES e 9,1% menor do que em EES, o Grupo ES demonstrou percentual da dispersão 24,5% menor do que em EES (Figura 20D).

Figura 19. Descrições morfoquantitativas da fenda pós-sináptica da junção neuromuscular, por meio da imunomarcacão com α -bungarotoxina.



Fonte: Imagem elaborada pelo autor. Legenda: Médias e desvios padrões dos dados de (A) Área Corada e Área Total, (B) Perímetro Corado e Perímetro Total, (C) Dispersão e (D) Diâmetro Máximo. Dados tratados estatisticamente por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn's e nível de significância de $p < 0.05$. *S≠ES ($p < 0.05$); **S≠EES ($p < 0.001$). Ampliações: 1.000x.

6.4.2. Telócitos

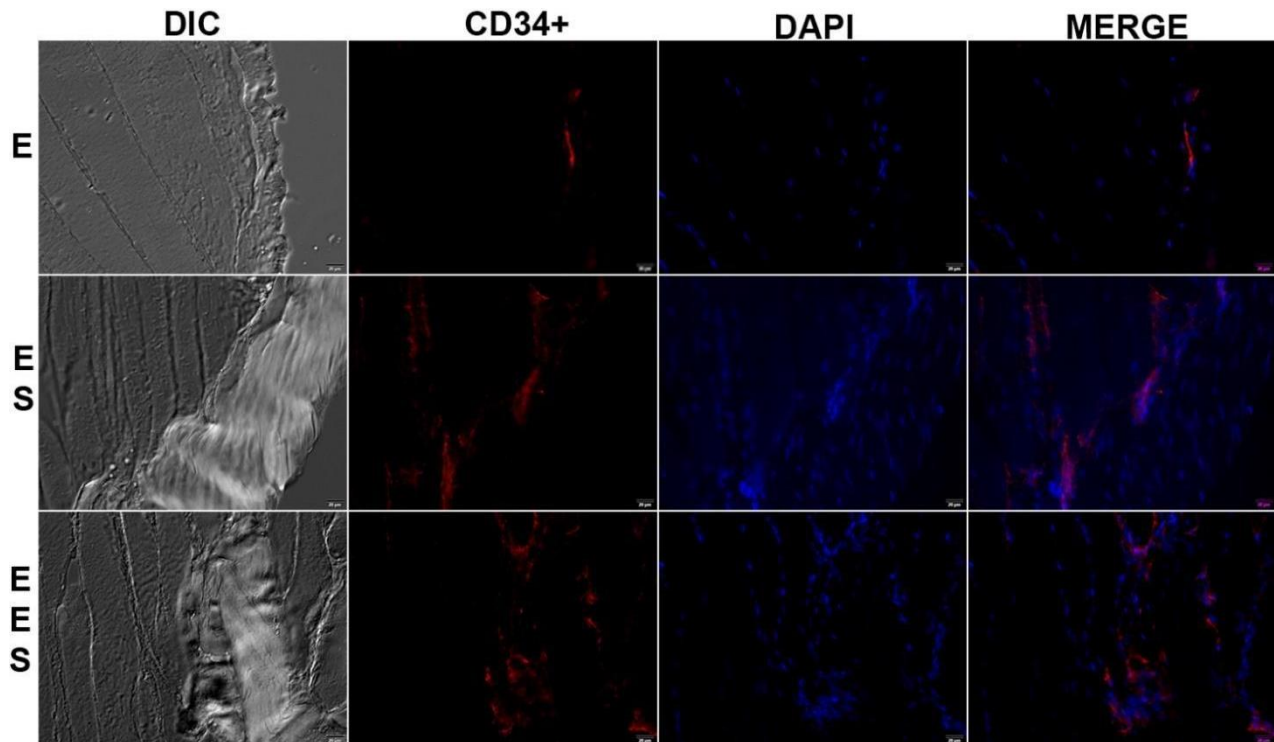
Os resultados de imunofluorescência com os marcadores de CD34+ e DAPI apresentaram características específicas em sua disposição e íntima relação com a região da junção miotendínea (Figura 21).

No Grupo E foi possível identificar telócitos na região da JMT, principalmente próximo a sua interface.

No Grupo ES foi possível identificar a presença de telócitos na região da junção miotendínea e entre as fibras musculares próximas a essa região, estes formam uma rede integrada que se interligam por meio de suas ramificações os telópodos.

No grupo EES os telócitos foram evidenciados em uma rede condensada na região da interface miotendínea e no tecido tendíneo.

Figura 20. Região da junção miotendínea (DIC) imunomarcada com CD34+ (telócitos), núcleos dos telócitos e núcleos adjacentes (DAPI) e a sobreposição destes marcadores (MERGE).



Fonte: Elaborada pelo autor.: Imagens de imunomarcção da junção miotendínea (DIC), com telócitos (CD34 +/vermelho) e núcleos celulares (DAPI/azul). Os grupos estão representados em (E) Escalada, (ES) Escalada Sobrecarga e (EES) Escalada/Escalada Sobrecarga. Ampliação: 400x.

7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram os efeitos de 3 diferentes protocolos de treinamento em escada vertical, sem e com sobrecarga e com a combinação destes protocolos, onde foi possível evidenciar as adaptações neuromusculares e miotendíneas associadas (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados quantitativos obtidos em todos os grupos que realizaram os protocolos em escada vertical.

			Grupos		
			E	ES	EES
Análises Funcionais	Antropometria	Massa Corporal	↑↑	↑↑↑	↑
		Massa Muscular	↓	↑↑	↑
	Testes	Teste de Carga	↑	↑↑↑	↑↑
		N de Escaladas	↑	↑↑↑	↑↑
		Tempo de Escalada	↓	↑↑	↑
Microscopia de Luz	Análise Fractal	Dimensão Fractal (HE)	↑↑	↑↑↑	↑
		Área (HE)	↑↑	↑	↓
		Dimensão Fractal (PS)	↑↑	↑	↑↑↑
		Área (PS)	↑↑	↑↑↑	↑
	ATPase Miofibrilar	AST Tipo I	↑↑↑	↑↑	↑
		AST Tipo II	↑↑	↑	↓
		AST Tipo Iix	↑↑↑	↑	↑↑
		Densidade Tipo I	↓↓	↓	↓↓↓
		Densidade Tipo II	↓↓	↓	↑
		Densidade Tipo Iix	↑↑	↑	↑↑↑
Microscopia Eletrônica de Transmissão	Sarcômeros	Ventre	↑↑	↑	↓
		Proximal	↑	↓	↓↓
		Distal	↑	↓	↑↑
	Comprimento	Invaginações Sarcoplasmáticas	↓	↑↑	↑
		Evaginações Sarcoplasmáticas	↑	↑↑↑	↑↑
	Espessura	Invaginações Sarcoplasmáticas	↑↑	↓	↑
		Evaginações Sarcoplasmáticas	↓↓	↓↓↓	↓
	Matriz Extracelular	Interface Miotendínea	↑	↑↑↑	↑↑
		Lâmina Basal	↑	↑↑	↓
		Camada de Suporte de Colágeno	↑↑	↑	↑↑↑
		Fibras Colágenas Transversais	↑	↓	↑↑
Imunofluorescência	Junção Neuromuscular	Área Corada	↓	↓↓↓	↓↓
		Área Total	↑	↓	↑↑
		Perímetro Corado	↓	↓↓↓	↓↓
		Perímetro Total	↓	↓↓↓	↓↓
		Dispersão	↓	↓↓	↓↓↓
		Diâmetro Máximo	↑	↓	↑↑

Fonte: Elaborada pelo autor.: Tabela com todos os resultados quantitativos obtidos durante o experimento classificados por ↑ (aumento razoável); ↑↑ (aumento considerável); ↑↑↑ (aumento expressivo); ↓ (redução razoável); ↓↓ (redução considerável); ↓↓↓ (redução expressiva).

7.1. Análises Funcionais

7.1.1. Antropometria

A massa corporal ao final do protocolo apresentou aumento proporcional em todos os grupos experimentais que realizaram os diferentes protocolos em escada vertical, e associados à massa do músculo em si, os grupos que utilizaram sobrecarga.

A redução da massa muscular em E e o aumento em ES e EES, demonstram que os protocolos com sobrecarga induzem a hipertrofia, mesmo que sejam combinados com exercícios sem sobrecarga, tais dados corroboram com Tamaki et al. (1992), que utilizaram comparação semelhante entre exercício resistido (agachamento) e aeróbio (corrida em esteira) e obteve aumento considerável da massa muscular, principalmente no grupo que realizou o treinamento resistido, assim como no estudo de Souza et al. (2014), que relacionou o aumento com protocolos de exercício resistido e obesidade.

Por meio dos dados da massa corpórea dos animais observaram-se aumento progressivo no Grupo ES, resultante da hipertrofia muscular mediante ao exercício físico resistido, no Grupo E observa-se discreta progressão da massa devido às adaptações metabólicas referentes ao exercício aeróbio.

Ao demonstrar aumento da massa no Grupo ES, conforme descrições do estudo de Harris (2009), observou-se discrepância nas alterações consequentes do exercício resistido, no mesmo estudo a massa corpórea dos animais diminuiu em ratos idosos e em adultos, no estudo presente as alterações promoveram aumento da massa total, que demonstra o princípio de hipertrofia nos maiores grupamentos musculares utilizados no exercício de escalada.

Houve um aumento da massa em ambos os grupos com uso de sobrecarga durante o protocolo, assim como evidenciado por Schoenfeld et al. (2016), que observaram aumento da massa muscular em membros superiores, com exercícios de intensidades diferentes, comprovando que ambos contribuem com o ganho muscular em músculos específicos para realização da prática.

As adaptações morfométricas do Grupo ES estão diretamente relacionadas ao exercício em escada vertical e às características fisiológicas do músculo, como ocorreu em Krause Neto et al. (2017b) e Rocha et al. (2020b). Além disso, o aumento da massa muscular associada ao modelo experimental escolhido foi semelhante a Pimentel Neto et

al. (2020).

7.1.2. Testes Funcionais

Após a realização do teste de carga máxima carregada, no Grupo ES, observou-se o aumento expressivo da carga máxima carregada, como consequência da prática do protocolo de exercício com sobrecarga, que necessitam do recrutamento das fibras de contração rápida, e contribuem no desempenho metabólico e estrutural do músculo estriado esquelético de forma a adaptá-lo ao treinamento proposto, proporcionando hipertrofia e o aumento exponencial da força (HORNBERGER; FARRAR, 2004; KRAUSE NETO et al. 2017a).

Santos et al. (2016) também demonstraram aumento entre a primeira e a última semana de teste de carga máxima, tal resultado ocorreu devido a aplicação semanal do teste, este era realizado para correção da carga de protocolo diferente do utilizado no protocolo da atual pesquisa baseada na massa corpórea do animal.

Em estudo realizado por Krause et al. (2017a), demonstraram aumento para o grupo de treinamento resistido, a diferença se deve a aplicação do protocolo em ratos idosos em maior tempo de protocolo, da mesma forma correspondeu a uma melhora no trabalho realizado.

Os resultados nos testes propostos pré e pós protocolo indicam, a melhora no desempenho funcional, consequência esta da adaptação motora e dos tecidos exigidos para execução dos movimentos, que demonstram ainda a padronização dos animais na execução das escaladas, em decorrência do tempo de prática associados a fatores morfológicos e fisiológicos (BALSHAW et al., 2017).

Existem fatores fisiológicos, não analisados, que podem estar associados a tais mudanças, e influenciam no aumento da musculatura (MOBLEY et al., 2018; STEC et al., 2016) como, genes associados ao crescimento e remodelamento tecidual (BAMMAN et al., 2007; DAVIDSEN et al., 2011; THALACKER-MERCER et al., 2013) e a ativação de fatores sinalizadores da regulação de síntese proteica (MAYHEW et al., 2011; MITCHELL et al., 2013) que foram afetados e conseqüentemente corroboram com as adaptações funcionais associadas às alterações morfológicas e fisiológicas do presente estudo.

Além disso, determina a evolução funcional destes que se desenvolveram por meio da combinação dos fatores envolvidos, conseqüentemente contribuíram com a hipertrofia muscular e com o aumento do número de escaladas, com a redução tempo de realização

e principalmente com o aumento da carga máxima carregada, corroborando assim com a proposta de treinamento planejada e periodizada que pode ser associada com humanos Garber et al. (2011).

7.2. Microscopia de Luz

7.2.1. Análise Dimensão Fractal

A análise de DF pode ser utilizada como ferramenta para caracterizar estruturas anatômicas e processos fisiológicos como fluxo sanguíneo pulmonar e miocárdico, estruturas bronquiais, vascularização da retina e organização dos diferentes tipos de fibras musculares (ARSOS; DIMITRIU, 1995; KARPERIEN et al., 2008; POPOVIC et al., 2018), desta forma o aumento dos núcleos celulares e do tecido intersticial do músculo bíceps braquial contribuem com a caracterização dos resultados, que demonstraram as inéditas adaptações dos protocolos em escada vertical.

Nos grupos que realizaram os protocolos específicos sem e com sobrecarga, houve aumento dos núcleos celulares periféricos às fibras musculares transversais, principalmente em ES, e redução nos grupos com protocolos combinados. Tais alterações podem estar respectivamente relacionadas ao aumento da atividade celular e as microlesões causadas pelo exercício com sobrecarga periodizado e a adaptação diante da combinação dos protocolos, que corroboram com alterações de estudos com distrofia muscular (CURY et al., 2018)

A dimensão fractal da área intersticial aumentou em todos os grupos que realizaram protocolo, principalmente no Grupo ES. O que indica o acúmulo de colágeno intersticial associado a hipertrofia muscular e conseqüentemente ao aumento de núcleos celulares responsáveis pela manutenção dos tecidos associados e corrobora com o fato reportado por Korolj, Wu e Radisic (2019) que estabeleceram a DF como uma forma de mensurar o estado de saúde dos tecidos.

7.2.2. ATPase Miofibrilar

A AST das fibras musculares apresentou aumento das fibras tipo I no Grupo E, possivelmente devido à característica oxidativa predominante no músculo bíceps braquial de ratos (FUENTES et al., 1998) e à capacidade exigida pelos tipos específicos de fibras musculares para executar o protocolo sem carga adicional (GUNDERSEN, 2011; TALBOT e MAVES, 2016).

As fibras do tipo II e IIx aumentaram no Grupo ES devido à carga adicional utilizada para a realização dos protocolos de escada vertical e aos padrões estabelecidos durante as sessões de protocolo, que se referem a um modelo experimental de hipertrofia muscular (GUNDERSEN, 2011; LOURENÇO et al., 2020).

Com o protocolo de sobrecarga adicional, observamos maiores fibras tipo II e IIx, que corrobora com a hipertrofia das fibras musculares, devido à sua característica fisiológica, que contribui com a maior produção de força, velocidade de contração, influxo de cálcio e sensibilidade adaptativa (QAISAR et al., 2016).

No Grupo EES, o aumento da AST das fibras IIx demonstrou a adaptação associada às características glicolíticas / oxidativas predominantes fisiologicamente e necessárias para a realização do exercício com e sem carga em diferentes protocolos (PETTE, 1998; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011; JORGENSEN et al., 2020).

Os resultados da AST apresentam aumento proporcional à densidade das fibras em todos os grupos experimentais, demonstrando hipertrofia e hiperplasia dos diferentes tipos de fibras, referentes à exigência fisiológica/específica de cada protocolo de exercício proposto (ROCHA et al., 2020b).

As adaptações musculares observadas no presente estudo podem ser definidas, principalmente pela funcionalidade exigida e pelo padrão de treinamento estabelecido para cada grupo, adaptação semelhante ao que ocorre em humanos (ESBJÖRNSSON et al., 1993; PETTE, 1998) e devido ao padrão de movimento e execução exigido por esse músculo diante de cada um dos protocolos (JORGENSEN et al., 2020).

7.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

7.3.1. Invaginações e Evaginações

Os Grupos treinados apresentaram diversas particularidades em relação ao Grupo S. O Grupo E demonstrou ampla ramificação de suas invaginações corroborando com estudos desenvolvidos por Kojima et al. (2008) e Curzi et al. (2012), em ambos os estudos experimentais foram submetidos a exercícios que priorizavam a capacidade aeróbia, assim como no Grupo E, os achados se complementam ao evidenciar a formação de amplas ramificações formadas pelas invaginações sarcoplasmáticas, que envolvem as evaginações de forma a proporcionar maior resistência da área de interação músculo-tendínea.

Os dados evidenciados em relação ao comprimento das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas especificamente no Grupo E corroboram com os dados encontrados por Sierra et al. (2017), este demonstrou maior aumento do comprimento das invaginações do que das evaginações em treinamento de natação, ambos os estudos apresentam significância em relação ao Grupo sedentário, ou seja, a JMT demonstra adaptações que contribuem com o aumento das ultraestruturas e consequentemente da interface músculo-tendínea mesmo em exercício sem sobrecarga (PIMENTEL NETO et al., 2020).

As adaptações no Grupo E, como o aumento das invaginações sarcoplasmáticas em espessura e comprimento, e redução das evaginações sarcoplasmáticas demonstram que treinamento está associado com a capacidade aeróbia como no treinamento de natação e modelo experimental de menopausa realizado por GUZZONI et al. (2018), onde os resultados foram diferentes em relação às espessuras invaginações sarcoplasmáticas.

No Grupo ES evidenciou-se elevada atividade celular na região próxima a JMT, e o aumento do comprimento tanto das invaginações como das evaginações sarcoplasmáticas, estas características na região da JMT promoveram maior área de contato comprovada pelo aumento da interface miotendínea já identificada por CURZI et al. (2012), consequentemente menor suscetibilidade a lesões. Tais modificações incidem diretamente em benefícios na principal região anatômica do aparelho locomotor.

Enquanto, no Grupo ES o aumento dos comprimentos da invaginações corroboram com estudo de Hart e Zernicke (2020), em exercício de esteira com intensidade progressiva foram apresentados resultados semelhantes, que indicam maior resposta adaptativa do tecido muscular na região da JMT associados à hipertrofia e a adaptação dos sarcômeros desta região que compõe a evaginação sarcoplasmática.

O exercício resistido promoveu adaptações morfológicas que contribuíram com a alteração da interface músculo tendínea (KOJIMA et al., 2008; CURZI et al., 2012; CURZI et al., 2016), que se correlaciona diretamente com o aumento de força apresentado nos testes funcionais e a hipertrofia muscular. Estas adaptações corroboram com estudos recentes que associaram estas alterações com diferentes protocolos em escada vertical (PIMENTEL NETO et al., 2020, ROCHA et al., 2020b).

7.3.2. Componentes da Matriz Extracelular

A lâmina basal que delimita a ECM na JMT apresentou redução em sua espessura diante dos protocolos de treinamento. No Grupo E houve atenuação em sua espessura tão significativa quanto no Grupo ES, resultados que diferem dos encontrados em estudos feitos

por Curzi et al. (2012) em exercício em esteira que demonstrou o aumento desta estrutura nos grupos treinados, tal fator pode estar associado a ação das metaloproteinases que compõem esta região como diversos níveis de laminina e colágeno tipo IV (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013), pois são responsáveis principalmente pela formação do esqueleto desta membrana, além de estarem associados a atividade miogênica (POPESCU et al., 2010, RAYAGIRI et al., 2018).

O rearranjo morfológico da lâmina basal indica atividade das células também provenientes de seu envoltório, as células satélites que quando ativadas para controle do equilíbrio homeostático em meio aos tecidos microlesados (DAHIYA et al., 2011), promovem alterações nas proteínas desta membrana assim como os diferentes tipos de colágenos nessa região, que podem influenciar em suas adaptações e consequentemente nas adaptações das células adjacentes (DUMONT et al., 2015) principalmente do tecido muscular (SANES, 2003).

A adaptação da CSC e com suas fibras de colágeno dispostas transversalmente com os protocolos de exercício físico, corrobora com a relação entre o aumento do depósito de colágeno associado a diferentes estímulos (GUMUCIO et al., 2015) a hipertrofia muscular em diferentes protocolos de escada vertical (PIMENTEL NETO et al., 2020) e a obesidade (GRILLO et al., 2021) que consequentemente promove o remodelamento da matriz extracelular e o aumento da produção de colágeno em diferentes regiões do músculo estriado esquelético (DAVIS et al., 2013), na JMT tal relação foi evidente principalmente com a combinação dos protocolos.

O aumento de colágeno promove a contribuição estrutural e compensação da matriz extracelular em relação ao ventre muscular de acordo com a força de transmissão contrátil exigida nesta região, promovendo menor riscos a lesões e o aumento de sua resistência (KJAER et al., 2004, MENDIAS et al., 2017).

7.4. Junção Neuromuscular

No Grupo ES, houve redução da estrutura da fenda pós-sináptica e da densidade das fibras musculares, possivelmente devido à característica funcional das fibras tipo II e IIx na ação e funcionalidade necessária para o protocolo em escada com sobrecarga, o que indica a manutenção de as zonas ativas que se adaptam e contribuem com a neurotransmissão reduzindo a distância de acesso das vesículas sinápticas aos canais de Ca^{2+} (CHEN; MIZUSHIGE; NISHIMUNE, 2012; NEHER, 1998).

Além disso, as mensurações da fenda pós-sináptica do Grupo E mostraram dados das características morfométricas com redução mínima em resposta a diferentes exercícios físicos. Em relação ao Grupo ES, houve principalmente uma redução em sua estrutura, diferentemente do Grupo EES, que apresentou aumento neste aspecto, devido a exercícios específicos combinados (ARNOLD et al., 2014; TINTIGNAC et al., 2015).

Segundo Krause Neto et al. (2015), a partir de uma meta análise sobre os efeitos do treinamento nos componentes da JNM, o treinamento com sobrecarga induz ao aumento da área total das placas motoras das fibras rápidas em músculos pélvicos de ratos. Diante disso, verificamos que a análise do músculo bíceps braquial demonstrou redução da área total, possivelmente por sua característica motora específica e pela composição estrutural (FUENTES et al., 1998; PETTE et al., 1998).

Os dados observados indicam que a associação dos protocolos promove alterações em ratos jovens relacionadas à densidade do JNM, diminuindo com a chegada da idade adulta, e o protocolo EES manteve sua distribuição como principal adaptação (JIANJUN et al., 2002; TINTIGNAC et al., 2015).

A menor dispersão no Grupo EES esteve diretamente associada à redução das fibras musculares da AST tipo I e ao predomínio desse tipo de fibra no músculo bíceps braquial (FUENTES et al., 1998; DESCHENES et al., 2011). Segundo Wilson e Deschenes (2005) o tipo de exercício e o tipo da composição miofibrilar resultam em diferentes efeitos na atividade morfológica pós-sináptica, principalmente em sua dispersão, que consequentemente foi reduzida em todos os protocolos experimentais analisados.

7.5. Telócitos

Os telócitos foram encontrados na matriz extracelular, consequentemente na região intersticial, na região da junção miotendínea, esta célula é particularmente encontrada no interstício de alguns tecidos como músculo liso (LIANG et al., 2019), cardíaco (MARINI et al., 2018), na língua (músculo estriado esquelético) (ROSA et al., 2019) e em alguns órgãos como pâncreas (BOSCO et al., 2013), testículo (LIU et al., 2019) e fígado (LIU et al., 2016) em diferentes espécies e ainda não foi associada a estímulos relacionados ao exercício físico que possam apresentar suas alterações

O achado destas células de origem estromal em todos os grupos experimentais pode indicar a ligação às microlesões e consequentemente à regeneração muscular causada pela hipertrofia muscular proporcionada pelos protocolos de treinamento. Assim associadas aos fatores miogênicos e tróficos atuantes na JMT, a necessidade da nutrição desta região

com o possível fator da presença de capilares na matriz extracelular também na JMT associados aos telócitos (PIMENTEL NETO et al., 2020), e as adaptações que podem ser proporcionadas como consequência do exercício resistido (GANDAHÍ et al., 2020) e sem sobrecarga e combinado.

Além disso, a identificação de um nicho de telócitos em proximidade e seus prolongamentos envolvendo a JMT em todos os grupos reforça o fato do nicho destas células e do seu envolvimento com as demais estruturas celulares associadas na JMT. O encontro destas células próximas a JMT pode determinar seu nicho de proliferação mioblástica e início do processo pós-inflamatório advindo das microlesões (URCIOLO et al., 2013), principalmente por nesta região terem sido encontrados os telócitos e células satélites em exercício em escada vertical recentemente (PIMENTEL NETO et al., 2020).

8. CONCLUSÕES

Diante dos diferentes protocolos experimentais em escada vertical com e sem sobrecarga e de sua combinação, concluímos que:

- As massas corporais apresentaram aumento em todos os grupos experimentais;
- A massa muscular demonstrou aumento nos grupos que realizaram protocolo com sobrecarga adicional (ES e EES) e redução em E;
- Na análise de desempenho funcional foi possível evidenciar o aumento da carga carregada, do número de escaladas e a redução do tempo em todos os grupos experimentais;
- A área e a dimensão fractal do tecido conjuntivo demonstrou aumento em todos os grupos com treinamento, e evidente aumento da área nuclear nos grupos E e ES, com destaque para a organização da complexidade em ES;
- A ATPase miofibrilar demonstrou o aumento das fibras Tipo I e IIx em todos os grupos experimentais, porém nas fibras Tipo II houve aumento apenas nos Grupos de treinamento específico (E e ES) e redução no Grupo associado (EES);
- Os sarcômeros diminuem seus comprimentos do ventre para à JMT, principalmente o ES. Entretanto, quando associados (EES) promovem aumento;
- Quanto maior a carga máxima utilizada, maiores os comprimentos de invaginações e evaginações apresentados nos grupos E, ES e EES;
- O comprimento das invaginações sarcoplasmáticas é inversamente proporcional a espessura das evaginações sarcoplasmáticas em todos os grupos que realizaram treinamentos;
- O exercício com sobrecarga adicional promove aumento da interface miotendínea;
- Observou-se redução da lâmina basal no Grupo EES;
- Os exercícios combinados promovem o aumento da camada de suporte de colágeno e das fibras colágenas transversais na matriz extracelular;
- A fenda pós-sináptica apresentou amplo remodelamento com a redução da área corada, perímetro corado, perímetro total e consequentemente da dispersão em todos os grupos experimentais de treinamento. Entretanto, a área total e o diâmetro máximo apresentaram redução após o treinamento com sobrecarga (ES) e aumento nos Grupos sem sobrecarga (E) e treinamento associado (EES).

- Foram identificados em todos os grupos experimentais a presença de telócitos na JMT.

REFERÊNCIAS

- 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 and Nerve**, v. 18, n. 9, p. 961–968, 1995.
- BALSHAW, T.G.; MASSEY, G.J.; MADEN-WILKINSON, T.M.; MORALES-ARTACHO, A.J.; MCKEOWN, A.; APPLEBY, C.L.; FOLLAND, J.P. Changes in agonist neural drive, hypertrophy and pre-training strength all contribute to the individual strength gains after resistance training. **European Journal of Applied Physiology**, 117, 631–640, 2017.
- BAMMAN, M.M.; PETRELLA, J.K.; KIM, J.; MAYHEW, D.L.; CROSS J.M. Cluster analysis tests the importance of myogenic gene expression during myofiber hypertrophy in humans. **Journal of Applied Physiology**, 102, 2232–2239, 2007.
- BOSCO, C.; DÍAZ, E.; GUTIÉRREZ, R.; GONZÁLEZ, J.; PÉREZ, J. Ganglionic nervous cells and telocytes in the pancreas of *Octodon degus* Extra and intrapancreatic ganglionic cells and telocytes in the degus. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v.177, p.224–230, 2013.
- BHUTDA, S; SURVE, M.V.; ANIL, A.; KAMATH, K; SINGH, N; MODI, D; BANERJEE, A. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues, **Bio-protocol**, v.7, p.1-10, 2017.
- BRIGIDO, M.K.; MAESENEER, M.; MORAG, Y. Distal Biceps Brachii. **Seminars in Musculoskeletal Radiology** v.17, p.20–27, 2013.
- CARDIFF, R.D.; MILLER, C. H.; MUNN, R.J. Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, p.655–658, 2014.
- CARMONA, C.; BARTOLOMÉ, M.J.L; ESCRIBANO.C.J. Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. V. 15, N. 1, p. 26-30, 2011.
- CHAITOW. L. Telocytes: Connective tissue repair and communication cells. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**. v.2, p.231-233, 2017.
- CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged *Wistar* rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.
- CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; BOLINA, C.S.; BOLINA-MATOS, R. S.; RICE, R. G.; DA SILVA, M. C. P.; MIGLINO, M.A.; 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.

CRETOIU, D; RADU, B.M; BANCUI, A.; BANCUI, D.D; CRETOIU, S.M. Telocytes heterogeneity: from cellular morphology to functional evidence. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2016.

CURY, S.S.; FREIRE, P.P.; MARTINUCCI, B.; DOS SANTOS, V.C.; 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**, p.1-7, 2018.

CURZI, D.; SALUCCI, S.; MARINI, M.; ESPOSITO, F.; AGNELLO, L.; VEICSTEINAS, A.; BURATTINI, S.; FALCIERI, E. How physical exercise changes rat myotendinous junctions. **European Journal of Histochemistry**, v.56, p.117-122, 2012.

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

CURZI, D., BALDASSARRI, V., DE MATTEIS, R., SALAMANNA, F., BOLOTTA, A., FRIZZIERO, A. Morphological adaptation and protein modulation of myotendinous junction following moderate aerobic training. **Histology and Histopathology**. v.30, p.465–72, 2015.

DAHIYA, S.; BHATNAGAR, S.; HINDI, S.M.; JIANG, C.; PAUL, P.K.; KUANG, S.; KUMAR, A. Elevated levels of active matrix metalloproteinase-9 cause hypertrophy in skeletal muscle of normal and dystrophin deficient mdx mice. **Human Molecular Genetics**. v.20, p.4345–4359, 2011.

DARABID, H., PEREZ-GONZALEZ, A.P., ROBITAILLE, R. Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. **Nature Reviews Neuroscience**.v.15, p.703-18, 2014.

DAVIDSEN, P.K.; GALLAGHER, I.J.; HARTMAN, J.W.; TARNOPOLSKY, M.A.; DELA, F.; HELGE, J.W.; PHILLIPS, S.M. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. **Journal of Applied Physiology**, v.110, p.309–317, 2011.

DAVIS, M. E. GUMUCIO, J. P., SUGG, K. B., BEDI, A., MENDIAS, C. L. MMP inhibition as a potential method to augment the healing of skeletal muscle and tendon extracellular matrix. **Journal of Applied Physiology**. v.115, p.884–891, 2013.

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, p.744–753, 2013.

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 Neurosciences Research** v.93, p.504–513, 2015.

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 and Behavior**, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2016.

DESCHENES, M.R.; TUFTS, H.L.; LI, S.; NORONHA, A.L.; ADAN, Matthew A. Effects of exercise training on neuromuscular junctions and their active zones in young and aged muscles. **Neurobiology of Aging**, [S. l.], v. 95, p. 1–8, 2020.

DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. **The Company of Biologists Ltd. Development**. Cambridge, 2015.

FAUSSONE-PELLEGRINI; M.S.; POPESCU, L.M. Telocytes. **Biomolecular Concepts**. V.2, E.6, 2011.

FRONTERA, W.R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**. 2014.

FUENTES, I.; COBOS, A.R.; SEGADE, L.A.G. Muscle fibre types and their distribution in the biceps and triceps brachii of the rat and rabbit. **Journal of Anatomy**. v.192, p.203–210, 1998.

GANDAH, N. S.; DING, B.; SHI, Y.; BAI, X.; GANDAH, J. A.; VISTRO, W. A., CHEN, Q.; PING YANG, P. Identification of telocytes in the pancreas of turtles—A role in cellular. **Communication International Journal of Molecular Sciences**. v.21, p.1–20, 2020.

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. **American College of Sports and Medicine**. P.1334-1359, 2011.

GHERGHICEANU, M.; MANOLE, C.G.; POPESCU, L.M. TELOCYTES IN ENDOCARDIUM: Electron Microscope Evidence. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** v.14, N.9, p. 2330-2334, 2010.

GRILLO, B.A.C; MARTINEZ, G.Z.; ROCHA, L.C.; JACOB, C. DOS S.; PIMENTEL NETO, J.; WATANABE, I.; CIENA, A.P. Myotendinous Junction Components of Different Skeletal Muscles Present Morphological Changes in Obese Rats. **Microscopy and Microanalysis**. P.1-6 April, 2021.

GONZALEZ-FREIRE, M.; SEMBA, R.D.; UBAIDA-MOHEIN, C.; FABBRI, E.; SCALZO, P.; HOJLUND, K.; DUFRESNE, C.; LYASHKOV, A.; FERRUCI, L. The Human skeletal muscle proteome project: a reappraisal of the current literature. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**. p.1-14, 2016.

GUMUCIO, J. P., SUGG, K. B., MENDIAS, C. L. TGF—A superfamily signaling in muscle and tendon adaptation to resistance exercise. **Exercise Sports Science Reviews**. 43, p.93–99, 2015.

GUZZONI, V., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., MARQUETI, R. C. Tendon remodeling in response to resistance training, anabolic androgenic steroids aging. **Cells**. v.12, 251, 2018.

HAYWOOD, K. M., GRETCHELL, N., Desenvolvimento Motor ao Longo da Vida – 5. Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.

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

JACOB, C. dos S.; ROCHA, L. C.; PIMENTEL NETO, J. P.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Effects of physical training on sarcomere lengths and muscle-tendon interface of the cervical region in an experimental model of menopause. **European Journal of Histochemistry**, v. 63, n. 3, p. 131–5, 2019.

JEONG, J.Y.; PARK, S.M.; PARK, Y.E.; YOO, J.C. Morphological classification of anatomical variants of the intra-articular portion of the long head of the biceps brachii tendon and analysis of the incidence and the relationship with shoulder disease for each subtype. **Journal of Orthopedic Surgery**, v.25, n.3, p.1–6, 2017.

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. 160240, p. 1–16, 2017.

KARDONG, K. V. Vertebrados - Anatomia Comparada, Função e Evolução. **Roca Didático**, 7ª Edição, 2016.

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.

KENDALL, F.P.; MCCREARY, E.K.; PROVANCE, P.G.; RODGERS, M.M.; ROMANI, W.A. Músculos: Provas e funções com postura e dor. **Editora Manole**. 5ª Ed., 2007.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiology Reviews**. v.84, p.649–698, 2004.

KLEIBER, T.; KUNZ, L.; DISSELHORST-KLUG, C. Muscular coordination of biceps brachii and brachioradialis in elbow flexion with respect to hand position, **Frontiers in Physiology** v.6, p.1-5, 2015.

KOJIMA, H; SAKUMA, E; MABUCHI, Y; MIZUTANI, J; HORIOCHI, O; WADA, I; HORIBA, M; YAMASHITA, Y; HERBERT, D; SOJI, T; OTSUKA, T. Ultrastructural changes at the myotendinous junction induced by exercise. **Journal of Orthopedic Science**. v.13, n.3, p.233-239, 2008.

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

KRAUSE NETO, W.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; DE SOUZA, R. R.; GAMA, E. F. Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: Systematic review of animal experimental studies. **BMC Research Notes**. v. 8, n. 1, p. 1–15, 2015.

KRAUSE, W.N.; SILVA, W.; CIENA, A.P.; BOCALINI, D.; ANARUMA, C.; GAMA, E. Divergent effects of resistance training and anabolic steroid on the postsynaptic region of different skeletal muscles of aged rats, **Experimental Gerontology**. p.80-90, 2017a.

KRAUSE, W.N.; SILVA, W.; CIENA, A.P.; BOCALINI, D.; NUCCI, R.; ANARUMA, C.; GAMA, E. Total training load may explain similar strength gains and muscle hypertrophy seen in aged rats submitted to resistance training and anabolic steroids. **The Aging Male**, 2017b.

LANDIN, D.; THOMPSON, M.; JACKSON, M.R. Actions of the Biceps Brachii at the Shoulder: A Review. **Journal of Clinical Medicine Research**. v.9, n.8, p.667-670, 2017.

LENDARO, E.; NILSSON, S.; ORTIZ-CATALAN, M. Differential Activation of Biceps Brachii Muscle Compartments for Human-Machine Interfacing. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference**. P.4705-4709, 2018.

LE MOAL, E.; PIALOUX, V.; JUBAN, G.; GROUSSARD, C.; ZOUHAL, H.; CHAZAUD, B.; MOUNIER, R. Redox control of Skeletal Muscle Regeneration. **Antioxidants and Redox Signaling**. v.0, n. 0, p.1-35, 2017.

LI, L., XIONG, W-C., ME, IL. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. **Annual Review of Physiology**. v.80, p.159-88, 2018.

LIANG, Y.; WANG, S.; AN, T.; TARIQUE, I.; VISTRO, W.A.; LIU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, H., SHI, Y.H.; HASEEB, A.; GANDAH N.S.; IQBA, A.; YANG, H.; CHEN, Q.; YANG, P. Telocytes as a novel structural component in the muscle layers of the goat rumen. **Cell Transplant**. v.28, p.955–966, 2019.

LIU, J. et al. Telocytes in liver. **Current Stem Cell Research and Therapy**. v.11, p.415–419, 2016.

LIU, Y.; LIANG, Y.; WANG, S.; TARIQUE, I.; VISTRO, W.A.; ZHANG, H.; HASEEB, A.; GANDAH N.S.; IQBAL, A.; AN, T.; YANG, H.; CHEN, Q.; YANG, P. Identification and characterization of telocytes in rat testis. **Aging**. v. 11, n. 15, p. 5757-68, 2019.

LODO, L.; MOREIRA, A.; ZAVANELA, P.M.; NEWTON, M.J.; MCGUIGAN, M.R.; AOKI, M.S. Is there a relationship between the total volume of load lifted in bench press exercise and the rating of perceived exertion? **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness** v.52, e.5, 483-488, 2012.

MANETTI, M., TANI, A., ROSA, I., CHELLINI, F., SQUECCO, R., IDRIZAJ, E., ORLANDINI, Z., MANNESCHI, L.I., SASSOLI, C. Morphological evidence for telocytes as stromal cells supporting satellite cell activation in eccentric contraction-induced skeletal muscle injury. **Scientific Reports**, v.9, p.1–14, 2019.

MARZETTI, E., CALVANI, R., TOSATO, M., CESARI, M., DI BARI, M., CHERUBINI, A., BROCCATELLI, M., SAVERA, G., D'ELIA, M., PAHOR, M. BERNABEI, R., FRANCESCO LANDI, F. Physical activity and exercise as countermeasures to physical frailty and sarcopenia. **Aging Clinical and Experimental Research**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 35–42, 2017.

MAYHEW, D.L.; HORNBERGER, T.A.; LINCOLN, H.C.; BAMMAN, M.M. Eukaryotic initiation factor 2B epsilon induces cap-dependent translation and skeletal muscle hypertrophy. **The Journal of Physiology**, v.589, p.3023–3037, 2011.

MENDIAS, C. L., SCHWARTZ, A. J., GREKIN, J. A., GUMUCIO, J. P., SUGG, K. B. Changes in muscle fiber contractility and extracellular matrix production during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**. v.22, p.571–579, 2017.

MITCHELL, C.J.; CHURCHWARD-VENNE, T.A.; BELLAMY, L.; PARISE, G.; BAKER S.K.; PHILLIPS, S.M. Muscular and systemic correlates of resistance training-induced muscle hypertrophy. **PLoS One**, 8, e78636, 2013.

MOBLEY, C.B.; HAUN, C.T.; ROBERSON, P.A.; MUMFORD, P.W.; KEPHART, W.C.; ROMERO, M.A.; ROBERTS, M.D. Biomarkers associated with low, moderate, and high vastus lateralis muscle hypertrophy following 12 weeks of resistance training. **PLoS One**, 13, e0195203, 2018.

MOO, E.K.; FORTUNA, R.; SIBOLE, S.C.; ABUSARA, Z; HERZOG, W. In vivo Sarcomere Lengths and Sarcomere Elongations Are Not Uniform across an Intact Muscle. **Frontiers in Physiology**. v.7, p.1-9, 2016.

MOORE, K. L., DALLEY, A. F., AGUR, A. M. R. Anatomia Orientada para a Clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p.1126, 2019.

MURRAY, L.M., COMLEY, L.H., THOMSON, D., PARKINSON, N., TALBOT, K., GILLINGWATER, T.H. Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre-and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. **Human molecular genetics**; v.17, p.949-62, 2008.

PETTE, D. Training effects on the contractile apparatus. **Acta Physiologica Scandinavica**. v.162, p.367-376, 1998.

PIMENTEL NETO, J., ROCHA, L.C., KLEIN, G.B., JACOB, C. DOS S., KRAUSE NETO, W., WATANABE, I.; CIENA, A.P. Myotendinous junction adaptations to ladder-based resistance training: identification of a new telocyte niche. **Scientific Reports**, v.10: e.14124., 2020.

POPESCU, L. M.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S. TELOCYTES – a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. V. 14, N. 4, p. 729-740, 2010.

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.

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

RAYAGIRI, S. S.; RANALDI, D; RAVEN, A.; AZHAR, N.I.F.M.; LEFEBVRE, O.; ZAMMIT, P.S.; BORYCKI, A.E. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. **Nature Communications**. 9, 1–2, 2018.

ROCHA, L. C.; JACOB, C. dos S.; BARBOSA, G.K.; PIMENTEL NETO, J. P.; 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**. p.1-8, 2020a.

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

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.

ROSA, I. TAVERNA, C.; NOVELLI, L.; MARINI, M.; IBBA-MANNESCHI, L.; MANETTI, M. Telocytes constitute a widespread interstitial meshwork in the lamina propria and underlying striated muscle of human tongue. **Scientific Reports**, 2019.

SÁNCHEZ-MEDINA, L.; GONZÁLEZ-BADILLO, J.J. Velocity loss as an indicator of neuromuscular fatigue during resistance training. **Medicine and Science in Sports and Exercise** v. 43, p. 1725-1734, 2011.

SANES, J. R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, n.15, p.2601–12604, 2003.

SIERRA, L.R.; FÁVARO, G.; CERRI, B.R.; ROCHA, L.C.; ALMEIDA, S.R.Y.; WATANABE, I.; CIENA, A.P. Myotendinous junction plasticity in aged ovariectomized rats submitted to aquatic training. **Microscopy Research and Technique**, p.1-7, 2018.

SHEN, C., LU, Y., ZHANG, B., FIGUEIREDO, D., BEAN, J., JUNG, J., WU, H., BARIK, A., YIN, D.M., XIONG, W.C., MEI, L. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. **Journal of Clinical Investigation**. V.123, p.5190-202, 2013.

SONG, D., CRETOIU, D., WANG, X. Mitochondrial DNA in Telocytes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**.v.1038. p.55-70, 2017.

SOUZA, M.V.C.; LEITE, R.C.; LINO, A.D.S.; MARQUETI, R.C.; BERNARDES, C.F.; ARAUJO, H.S.S.; BOUSKELLA, E.; SHIGUEMOTO, G.E.; PEREZ, S.E.A.; AGUIAR, L.G.K. 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.

SPIERING B.A.; KRAEMER W.J.; ANDERSON J.M.; ARMSTRONG L.E.; NINDL B.C.; VOLEK J.S.; MARESH C.M. Resistance exercise biology: manipulation of resistance exercise programme variables determines the responses of cellular and molecular signaling pathways. **Sports Medicine**, v. 38, p. 527-540, 2008.

STEC, M.J.; KELLY, N.A.; MANY, G.M.; WINDHAM, S.T.; TUGGLE, S.C.; BAMMAN, M.M. Ribosome biogenesis may augment resistance training-induced myofiber hypertrophy and is required for myotube growth in vitro. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, 310, p.E652–E661, 2016.

TAJSHARGHI, H. Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, n. 7, p. 1259-1275, 2008.

THALACKER-MERCER, A.; STEC, M.; CUI, X.; CROSS, J.; WINDHAM, S.; BAMMAN, M. Cluster analysis reveals differential transcript profiles associated with resistance training-induced human skeletal muscle hypertrophy. **Physiological Genomics**, v.45, p499–507, 2013.

TIDBALL, J.G.; CHAN, M. Adhesive strength of single muscle cells to basement membrane at myotendinous junctions. **Journal of Applied Physiology**, v.67, p.1063- 1109, 1989.

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

TIDBALL, J.G., QUAN, D.M. Modifications in myotendinous junction structure following denervation. **Acta Neuropathology**. v.84, p.135–140, 1992).

TU, W.Y., XU. W., ZHANG, K., SHEN, C. Whole-mount staining of neuromuscular junctions in adult mouse diaphragms with a sandwich-like apparatus. **Journal of Neuroscience Methods**. P1-21, 2020.

WEINSTEIN, A.A.; CHIN, M.K.C.; KEYSER, R.E.; KENNEDY, M.; NATHAN, S.D.; WOOLSTENHULME, J.G.; CONNORS, G.; CHAN, L. Effect of aerobic exercise training on fatigue and physical activity in patients with pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Medicine Journal**. v.107, n.5, p.778-784, 2013.

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.

WU, H.; XIONG, W. C.; MEI, L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. **Development** **137**, v.7, p.1017-1033, 2010.

ZHANG, H.; LU, S.; XU, T.; FENG, Y.L.; LI, H.; GE, J. Morphological evidence of telocytes in mice aorta. **Chinese Medicine Journal**. v.128, p.348–352, 2015.