

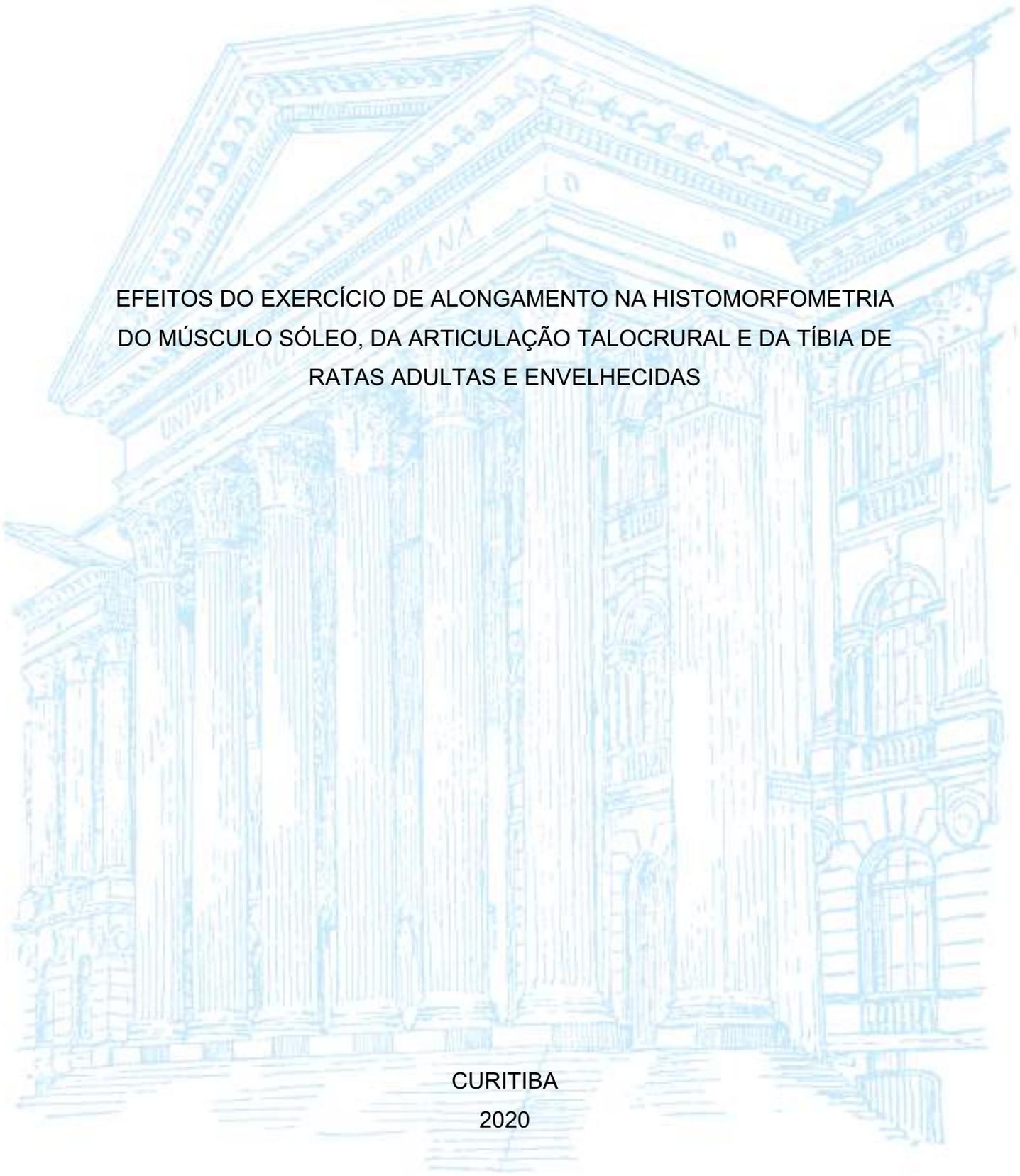
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HILANA RICKLI FIUZA MARTINS

EFEITOS DO EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO NA HISTOMORFOMETRIA
DO MÚSCULO SÓLEO, DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL E DA TÍBIA DE
RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS

CURITIBA

2020



HILANA RICKLI FIUZA MARTINS

EFEITOS DO EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO NA HISTOMORFOMETRIA
DO MÚSCULO SÓLEO, DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL E DA TÍBIA DE
RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Doutora em Educação Física.

Orientadora: Profa. Dra Anna Raquel Silveira Gomes

Co-Orientadora: Profa Dra Talita Gianello Gnoato Zotz

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Glenn Maria Seriski Silva – CRB-9 1406)

Martins, Hilana Rickli Fuza

Efeitos do exercício de alongamento na histomorfometria do músculo sóleo da articulação talocrural e da tíbia de ratas adultas e envelhecidas. / Hilana Rickli Fuza Martins. – Curitiba, 2020.
158 p.: il.

Orientadora: Anna Raquel Silveira Gomes.
Coorientadora: Talita Gianello Groato Zotz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Educação Física.

1. Exercícios de alongamento. 2. Sistema musculoesquelético. 3. Cartilagem articular. 4. Ossos. 5. Idosos. 6. Ratos Wistar. I. Título. II. Gomes, Anna Raquel S., 1976- III. Zotz, Talita Gianello Groato, 1988- IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Educação Física.

CDD (22. ed.) 613.718



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EDUCAÇÃO FÍSICA -
40001016047F0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em EDUCAÇÃO FÍSICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **HILANA RICKLI FIUZA MARTINS** intitulada: "EFEITOS DO EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO NA HISTOMORFOMETRIA DO MÚSCULO SÓLEO, DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL E DA TÍBIA DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS", que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de deuter está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

18/12/2020 19:35:37.0

TALITA GIANELLO GNOATO ZOTZ
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/12/2020 19:24:38.0

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/12/2020 07:59:36.0

CAROLINA AGUIAR MOREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/12/2020 19:19:33.0

FERNANDO AUGUSTO LAVEZZO DIAS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/12/2020 10:00:36.0

RICARDO AURINDO DE PINHO
Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Novo Edifício do Departamento de Educação Física - Campus Centro Politécnico - Curitiba - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3072 - E-mail: pgedf@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SICA-UFPR, com a seguinte identificação única: 66458

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prgpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinatura.jsp>
e insira o código 66458

DEDICATÓRIA

Ao Marcos ao nosso filho Davi, o nosso maior presente!

AGRADECIMENTOS

Nas páginas deste documento estão relatados alguns dos resultados do trabalho desenvolvido ao longo dos anos em que frequentei a Universidade Federal do Paraná como aluna do Programa de Pós Graduação em Educação Física. Mas além da tese aqui apresentada, essas páginas também contêm sentimentos diversos, muitos quilômetros rodados, e muitas pessoas envolvidas às quais que eu gostaria de prestar meus agradecimentos.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dra. Anna Raquel Silveira Gomes, por ter me aceitado como aluna de mestrado e doutorado e por ter me ensinado tanto! Agradeço a dedicação com a minha formação acadêmica e pelas oportunidades que me concedeu ao longo de todos esses anos! Com você aprendi a escrever e a submeter um artigo científico, a fazer orçamentos e compras, a planejar um experimento o que inclui a administração do tempo, gerenciamento de pessoas e de material, a preparar uma palestra, a planejar uma aula, a fazer parcerias, e a ser pesquisadora mesmo com minhas limitações. Você é um exemplo de professora, pesquisadora e mãe!

Agradeço à minha co-orientadora Prof^a Dra. Talita Gianello Gnoato Zotz pelo apoio incondicional e disponibilidade prestados. Obrigada pela paciência, orientação e compreensão. Eu realmente aprendi muito com você desde o mestrado e você é um exemplo de dedicação, de professora, pesquisadora e mãe!

Agradeço a toda equipe do Projeto de Pesquisa “Efeitos do alongamento em ratas idosas” pela parceria ao longo desses anos. À Kátia e às alunas de iniciação científica do curso de Fisioterapia da UFPR, Talita, Nayara, Elizandra, Stefanie e Milena sou extremamente grata pela dedicação de vocês com o projeto e por terem me feito companhia.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES) pelo apoio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Também agradeço ao CNPq e Fundação Araucária pela concessão das bolsas das alunas de iniciação científica e mestrado.

Agradeço à Prof^a Dra Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro da Unioeste pela parceria ao longo dos anos e de forma especial no ano de 2020! Estendo os meus

sinceros agradecimentos aos seus alunos de iniciação científica que com esforço e dedicação contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes da UFPR por conceder espaço no seu Laboratório para a realização do experimento. Agradeço também aos seus alunos que gentilmente nos receberam no laboratório e nos auxiliaram. De forma especial agradeço à Malu, pela prontidão com que sempre nos atendeu!

Agradeço ao Prof Dr. Fernando Dias da UFPR por conceder espaço em seu laboratório nos dias da eutanásia e também pela parceria no projeto.

Agradeço à Prof^a Dra. Lucia Noronha da PUC-PR pela parceria no projeto! Agradeço ao Seigo, Carol e Ana Paula por me receberem bem e sempre prontamente atenderem meus pedidos!

Agradeço ao Prof Dr. Mário Navarro da UFPR por me permitir frequentar, utilizar e aprender no seu laboratório e por se preocupar sempre comigo e com as minhas viagens!

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo de Tarso da Cunha Chaves da UFPR por me autorizar utilizar e armazenar o nosso material no Laboratório de Biologia Molecular.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza da UFPR por me autorizar armazenar amostras no freezer -80° do seu laboratório!

Agradeço aos professores membros da banca de qualificação, Profa Dra Lucia Noronha e Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes pelos pertinentes apontamentos que contribuíram grandemente com esse estudo. Também agradeço aos membros da banca de defesa, Profa Dra Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri, Profa Dra Carolina Aguiar Moreira, Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias e Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho pelas sugestões e críticas.

Agradeço à Angela e Paula Borges por me receberem toda semana com tanto carinho e por me ensinarem tanto! Agradeço à Debora da Fisiologia por me atender sempre bem! Tenho um carinho muito grande por vocês!

Agradeço ao Rodrigo, secretário do PPGEDF pela cordialidade e disposição em sempre me atender. Agradeço ao colegiado do PPGEDF pelo aprendizado.

Agradeço à Prof^a Dra. Elisangela Valevein Rodrigues do IFPR pela parceria! Elis, muito obrigada por tudo e principalmente por sua amizade!

Agradeço à Luiza Herminia Gallo pela amizade, e pelas palavras de motivação quando precisei!

Aos pós-graduandos do PPGEDF com quem convivi nesse período, Simone, Jarbas, Karina, Tamires, Audrin, Lindomar, agradeço a companhia!

Agradeço a chefia do Departamento de Fisioterapia da Unicentro representada pelos professores Patricia Tyski Suchow, Angela Dubiela Julik, João Afonso Ruaro e Marina Pegoraro Baroni e ao Prof Luiz Alfredo B. Ferreira que foi meu coordenador na Faculdade Guairacá, pelo apoio que sempre recebi de nesse período!

Agradeço aos meus pais Roberto e Estael pelo apoio incondicional em todas os momentos da minha vida. À minha irmã Debora por sempre torcer por mim e por me dar o meu sobrinho que amo tanto!

Ao Marcos pelo seu companheirismo nas aventuras dessa vida e por ter me levantado várias vezes, quando pensei que não teria mais forças!

Por fim e mais importante, agradeço a Deus por me sustentar e conduzir até aqui!

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu”

Eclesiastes 3:1

RESUMO

O alongamento passivo é rotineiramente prescrito para pessoas de diferentes faixas etárias e condições clínicas. Porém, não são conhecidos os efeitos simultâneos que ocorrem na cartilagem da articulação envolvida e no osso em resposta à força aplicada para alongar o músculo, assim como não são claros se existe a interação dos fatores idade e número de sessões. **Objetivo:** Avaliar os efeitos simultâneos do alongamento passivo na histomorfometria do músculo sóleo, cartilagem da articulação talocrural e tibia de ratas adultas e envelhecidas. **Método:** *Rattus norvegicus wistar* albino fêmeas com 28 meses (ratas envelhecidas) e 3 meses de idade (ratas adultas), foram divididas em 4 grupos: adultas 2 semanas (GA2; n=7, 254,4±18,5g); adultas 4 semanas (GA4; n=7, 251,2±16,7g); envelhecidas 2 semanas (GE2; n=7; 307,2±48,3g) e envelhecidas 4 semanas (GE4; n=8; 297,1±24,7g). As ratas foram submetidas à 6 e 12 sessões de alongamento mecânico passivo estático com volume de 240 segundos cada. A articulação talocrural esquerda foi posicionada em dorsiflexão máxima por meio de um aparato que também possuía uma célula de carga e registrava a força aplicada para promover o alongamento. A pata contralateral foi utilizada como controle já que não foi alongada. O alongamento foi realizado 3x/semana (4 repetições de 60s intervaladas por 30s). Foram avaliados: massa corporal; massa muscular absoluta e relativa; comprimento muscular; número de sarcômeros em série e comprimento do sarcômero; área de secção transversa da fibra muscular (ASTFM); imunomarcção de colágeno 1 e 3, Fator α de necrose tumoral (TNF- α) e fator transformador de crescimento β (TGF- β 1); área de tecido não contrátil intramuscular; espessura da cartilagem; número de condrócitos; área do canal medular; espessura do osso cortical; número de osteócitos e número de lacunas cheias e vazias. Foi realizado o teste ANOVA de três vias com os fatores idade (adultas, envelhecidas), número de sessões (6 e 12 sessões) e condição experimental (sóleo alongado e sóleo não alongado). Quando interação significativa foi observada, teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi realizado. **Resultados:** No GE2 foi observada redução (26,4%) da ASTFM. No GA2 foram encontradas diminuição (8%) da ASTFM e da espessura da zona profunda da cartilagem (43,7%) e aumento da espessura da zona superficial (2%). No GE4, os achados foram redução (16,8%) da ASTFM, maior imunomarcção de colágeno 3 (32,5%) e TNF- α (78,7%), número de condrócitos (50,4%) e menor imunomarcção (63%) de TGF- β 1 em comparação ao membro não alongado. No GA4, os efeitos observados foram diminuição (59,6%) da imunomarcção do colágeno 1 e do TNF- α (66,6%), da espessura da zona superficial e (13,8%) e do número de osteócitos (41,5%). **Conclusão:** O alongamento do músculo promove efeitos no trofismo muscular, mas efeitos também são observados em cartilagem e osso os quais são dependentes da idade e do tempo. Respeitando as devidas limitações e extrapolações, sugere-se que o músculo, a cartilagem e o osso envelhecidos, são menos mecanossensíveis ao alongamento e/ou levam mais tempo para responder ao alongamento.

Palavras-Chave: Exercício de alongamento muscular; Músculo esquelético, Cartilagem articular, Osso; Idoso, Adulto, Ratos Wistar.

ABSTRACT

Muscle stretching exercise is commonly prescribed for people of different age and clinical conditions. However, the concomitant effects on cartilage and bone in response to the same force applied to stretch muscle in adult and aged rats are not yet known and it is not clear whether there is an interaction of age and number of sessions. **Objective:** To evaluate the simultaneous effects of passive stretching on soleus muscle histomorphometry, cartilage of talocrural joint and tibia of adult and aged rats. **Methods:** The study was performed with females *Rattus Norvegicus Wistar* with 28 months old (aged rats) and 3 months old (adult female rats), comprising 4 groups: 2 weeks adult group (GA2; n = 7; 254.4 ± 18.5g), 4 weeks adult group (GA4; n = 7; 251.2 ± 16.7g), 2 weeks aged group (GE2; n = 7; 307.2 ± 48.3g) and 4 weeks aged group (GE4; n = 8, 297.1 ± 24.7g). The rats were submitted to a static passive mechanical stretching exercise protocol for 2 weeks and 4 weeks. The left ankle was positioned in maximum dorsiflexion through an apparatus containing a load cell. The left soleus muscle was stretched 3x / week (4 repetitions of 60s and 30s of rest), while the non-stretched right soleus was used as a control. The outcomes were evaluated: body mass; muscle mass; relative mass; final muscle length; number of sarcomeres in series in muscle fibers; sarcomere length of muscle fibers. muscle fiber cross-sectional area (MFCSA); immunostaining of type collagen I, collagen type III, TNF- α and TGF β 1; cartilage thickness; number of chondrocytes; area of medullary canal; thickness of the cortical bone; number of osteocytes and number of full and empty lacunae. **Results** The aged rats submitted to 6 sessions showed lower ASTFM (26,4%), while adult rats showed decrease in ASTFM (8%) and thickness of superficial zone of cartilage (43,7%) and increase in thickness of the deep zone of the cartilage (2%). Aged rats submitted to 12 sessions showed lower ASTFM (16,8%), higher immunostaining of collagen 3 (32,5%) and TNF- α (78,7%) and lower immunostaining of TGF β -1 (63%) and higher number of chondrocytes in the talus (50,4%). The adult rats showed lower collagen 1 (59,6%) and TNF- α immunostaining (66,6%) and number of osteocytes (41,5%). **Conclusion:** Muscle stretching promotes effects on muscle trophism, but effects are also seen in cartilage and bone which are age and time dependent. Respecting the limitations and extrapolations, it is suggested that the aged muscle, cartilage and bone are less mechano-sensitive to stretching and/or take longer to respond to stretching.

Key-words: Muscle Stretching Exercises; Muscle, Skeletal; Articular cartilage; Bone and Bones; Aged; Adult; Rats, Wistar.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO COM RATAS ENVELHECIDAS.....	58
FIGURA 2- LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO COM RATAS ADULTAS	59
FIGURA 3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS	60
FIGURA 4 - CALIBRAÇÃO DA CÉLULA DE CARGA DO APARATO	61
FIGURA 5 - PROTOCOLO DE ALONGAMENTO UTILIZANDO O APARATO	62
FIGURA 6 - DISSECAÇÃO DO MÚSCULO SÓLEO	63
FIGURA 7 - DESENHO ESQUEMÁTICO DAS SECÇÕES REALIZADAS NO MÚSCULO SÓLEO	64
FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA (100X EM IMERSÃO) DE FIBRA ISOLADA DE MÚSCULO SÓLEO DE RATA, PREPARADA PARA CONTAGEM DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE.	65
FIGURA 9 - CORTE HISTOLÓGICO TRANSVERSAL DO MÚSCULO SÓLEO EM OBJETIVA DE 10X CORADO COM HE PARA ANÁLISE DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DA FIBRA MUSCULAR (ASTFM).....	67
FIGURA 10 - AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE IMUNOMARCAÇÃO POR ÁREA DE FIBRA MUSCULAR	70
FIGURA 11 - PORCENTAGEM DE TECIDO NÃO CONTRÁTIL EM RELAÇÃO À ÁREA DA FIBRA MUSCULAR.....	71
FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIA DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL	72
FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA DA TÍBIA	73
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DA CONTAGEM DO NÚMERO DE OSTEÓCITOS	74
FIGURA 15 - FORÇA APLICADA PARA PROMOVER O ALONGAMENTO EM RATAS ENVELHECIDAS E ADULTAS.....	78
FIGURA 16 - EFEITO DO ALONGAMENTO NO COMPRIMENTO MUSCULAR, NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE E COMPRIMENTO DOS SARCOMÊROS.....	83
FIGURA 17 - IMUNOMARCAÇÃO DO COLÁGENO 1	86
FIGURA 18 - IMUNOMARCAÇÃO DO COLÁGENO 3	88

FIGURA 19 - IMUNOMARCAÇÃO DO TGF-B1	90
FIGURA 20 - IMUNOMARCAÇÃO DO TNF- α	92
FIGURA 21 - ÁREA DE TECIDO NÃO CONTRÁTIL	93
FIGURA 22 - NÚMERO DE CONDRÓCITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA.....	94
FIGURA 23 - NÚMERO DE CONDRÓCITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS.....	95
FIGURA 24 - ESPESSURA TOTAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA	96
FIGURA 25 - ESPESSURA TOTAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS	97
FIGURA 26 - ESPESSURA DA ZONA SUPERFICIAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA.....	98
FIGURA 27 - ESPESSURA DA ZONA SUPERFICIAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS	99
FIGURA 28 - ESPESSURA DA ZONA PROFUNDA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA	100
FIGURA 29 - ESPESSURA DA ZONA PROFUNDA DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS	101
FIGURA 30 - FOTOMICROGRAFIAS DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ADULTAS	102
FIGURA 31 - FOTOMICROGRAFIAS DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ENVELHECIDAS- MEMBRO NÃO ALONGADO	103
FIGURA 32 - FOTOMICROGRAFIAS DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ENVELHECIDAS - MEMBRO ALONGADO	104
FIGURA 33 - FOTOMICROGRAFIAS DA MEMBRANA SINOVIAL DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ADULTAS.....	105
FIGURA 34 - FOTOMICROGRAFIAS DA MEMBRANA SINOVIAL DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ENVELHECIDAS.....	106
FIGURA 35 - ÁREA DO OSSO E CANAL MEDULAR E ESPESSURA DA TÍBIA	107
FIGURA 36 - LACUNAS VAZIAS, LACUNAS CHEIAS E ÓSTEÓCITOS.....	108

FIGURA 37 - FOTOMICROGRAFIA DA SECÇÃO TRANSVERSAL DA DÍAFISE DA TÍBIA.....	110
FIGURA 38 - FOTOMICROGRAFIA DA SECÇÃO TRANSVERSA DA DIÁFISE DA TÍBIA.....	111
FIGURA 39 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS.....	112
FIGURA 40 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NO NÚMERO DE CONDRÓCITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS.....	112
FIGURA 41 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA ESPESSURA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS.....	113
FIGURA 42 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA ESPESSURA DA ZONA SUPERFICIAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS.....	113
FIGURA 43 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA ESPESSURA DA ZONA PROFUNDA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS.....	114
FIGURA 44 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA HISTOMORFOMETRIA DA TÍBIA.....	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- FORÇA APLICADA PARA PROMOVER O ALONGAMENTO DO MÚSCULO SÓLEO (N)	80
TABELA 2- COMPARAÇÃO DA MASSA CORPORAL INICIAL E FINAL E MASSA MUSCULAR ABSOLUTA E RELATIVA.....	81
TABELA 3- ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DA FIBRA MUSCULAR (ASTFM) DO MÚSCULO SÓLEO	84
Tabela 4- RELAÇÃO COLÁGENO1/COLÁGENO 3	89

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

1RM: uma repetição máxima

ADM: Amplitude de movimento

Akt/PKB: Proteína quinase B

APC: gene da polipose adenomatosa coli

CEUA: Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais

Ck1: caseína quinase 1

CONCEA: Conselho Nacional de Controle e Experimentação animal

CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo

DVL: proteína *Dishevelled*

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

FAK: quinase de adesão focal

FNP: facilitação neuromuscular proprioceptiva

FoxO: Proteína Forkhead

FZD: receptor transmembrana de sete passagens chamado *Frizzled*

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GSK3: glicogênio sintase quinase 3

GSK3 β : glicogênio sintase quinase 3 β

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL3: interleucina 3

IL6: interleucina 6

LAP: Peptídeo associado à latência

LEF: fator estimulador de linfócitos

LRP5: receptor proteína-5 relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade

LTBP: Proteína de ligação ao complexo latente TGF β

MEC: matriz extracelular

MMP-2 metaloprotease gelatinase A

MMP-9: metaloprotease gelatinase B

MMPs: Metaloproteases

mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

MyoD: fator de transcrição que pertence à família de proteínas "basic helix-loop-helix"

NF- κ B: fator nuclear kappa B

NO: óxido nítrico.

p38MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

PCP: Planar Cell Polarity

PGE2: prostaglandina E2.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

RAS: proteína (vírus do sarcoma de rato).

RUNX2: fator de transcrição.

SMAD: família de proteínas de transdução de sinal que respondem a TGF- β .

TBS: tampão fosfato-salino

TCF: fator de transcrição de célula T

TGF β : Fator transformador de crescimento beta.

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

Wnts: família de proteínas que participam de uma gama de processos biológicos celulares, como embriogênese, organogênese e formação tumoral.

β -cat: β -catenina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivos específicos	22
1.2 HIPÓTESES.....	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO MUSCULAR	29
2.1.1 Parâmetros de prescrição do exercício de alongamento.....	30
2.1.2 Efeitos do exercício de alongamento em animais adultos e humanos	31
2.1.3 Efeitos do exercício de alongamento em humanos e animais idosos	36
2.2 Sistema osteomioarticular: nível macroscópico e microscópico	39
2.2.1 Músculo esquelético e matriz extracelular do músculo esquelético.....	39
2.2.2 Cartilagem articular	46
2.2.3 Osso.....	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS	56
3.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	56
3.2.1 Grupo experimental com ratas envelhecidas.....	56
3.2.2 Grupo experimental com ratas adultas	58
3.3 PROTOCOLO DE ALONGAMENTO	60
3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E DISSECAÇÃO MUSCULAR E ÓSSEA	63
3.5 PROCEDIMENTOS PARA IDENTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE	64
3.6 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	65
3.7 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	67
3.8 ANÁLISE DO TECIDO NÃO CONTRÁTIL INTRAMUSCULAR.....	70
3.9 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO DO TORNOZELO	71
3.10 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA TÍBIA.....	73
3.11 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL	74
3.12 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA DA TÍBIA	75
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
4 RESULTADOS.....	78

4.1 INTENSIDADE DO ALONGAMENTO.....	78
4.2 MASSA CORPORAL E MASSA MUSCULAR	80
4.3 HISTOMORFOMETRIA MUSCULAR	82
4.3.1 Comprimento muscular, número de sarcômeros em série e comprimento dos sarcomêros	82
4.3.2 Área de secção transversa da fibra muscular	83
4.3.3 Imunomarcção da matriz extracelular do músculo sóleo	84
4.3.4 Tecido não contrátil intramuscular	93
4.4 HISTOMORFOMETRIA DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL	94
4.4.1 Análise morfológica da cartilagem da articulação talocrural	101
4.4.2 Análise morfológica da membrana sinovial.....	104
4.5 TÍBIA	106
4.5.1 Análise morfológica da tíbia	109
4.6 SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	112
5 . DISCUSSÃO	115
5.1 MÚSCULO:	116
5.2 CARTILAGEM.....	129
5.3 OSSO:.....	132
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
REFERÊNCIAS.....	139

1 INTRODUÇÃO

O alongamento passivo é um exercício popular em clínicas de fisioterapia e ambientes esportivos além de ser praticado e prescrito para pessoas de diferentes faixas etárias e condições clínicas (DEYNE, 2001; APOSTOLOPOULOS et al., 2015). Quando uma força externa é aplicada para alongar o músculo, a articulação é posicionada em amplitude extrema, e compressão ocorre em alguns pontos da cartilagem articular (VASILCEAC et al., 2011), e portanto, o estímulo mecânico do alongamento pode afetar músculo e cartilagem.

Estudos relataram adaptações histomorfométricas da cartilagem articular e do músculo esquelético ao alongamento passivo. No músculo e tecido conjuntivo intramuscular e intermuscular, foram reportados em experimentos com animais a reorganização macromolecular dos feixes de colágeno do músculo sóleo (COUTINHO et al., 2006a; CAÇÃO-BENEDINI et al., 2013a;), prevenção da atrofia e indução da hipertrofia (COUTINHO et al., 2004; SALVINI et al., 2006; SECCHI et al., 2008; CAÇÃO-BENEDINI et al., 2013) e aumento do número de sarcômeros em série (SALVINI et al., 2006; PEVIANI et al., 2018). Na cartilagem da articulação talocrural imobilizada, o alongamento passivo do músculo sóleo de ratos resultou em danos mas não prejudicou a cartilagem da articulação não imobilizada (RENNER et al., 2006). Dessa forma são conhecidos os efeitos do alongamento passivo no músculo e cartilagem relatados em estudos que investigaram músculo e cartilagem em separado mas as respostas do músculo e cartilagem ao mesmo estímulo não são claras.

Ainda, o osso por ser uma estrutura mecanossensível responde a estímulos externos, porém as respostas do osso ao estímulo do alongamento realizado no músculo também não são compreendidas. Um estudo focou no sistema Flexercell, uma placa flexível, como uma ferramenta para estudar as respostas celulares ao alongamento mecânico e relatou que a sinalização do alongamento têm um efeito positivo na proliferação de osteoblastos (YU et al., 2016), mas existe falta de estudos com animais que descrevam o efeito do alongamento muscular no osso.

Um aspecto fundamental para compreensão de como o estímulo do alongamento pode afetar músculo, cartilagem e osso é a prescrição. O *American College of Sports Medicine* (GARBER et al., 2011) recomenda o alongamento estático para a maioria dos indivíduos em pelo menos 2 a 3 dias por semana, duração de 15 a 30 segundos e número de repetições de 2 a 4 vezes, com intensidade moderada (CHODZKO-ZAJKO et al., 2009; PAGE, 2012; ACSM, 2013; ACSM, 2018). Para idosos saudáveis, entretanto, é recomendada a frequência de mais que 2 dias/semana e duração de 30 a 60 segundos em cada grupamento muscular (ZALESKI et al., 2016). A intensidade recomendada do exercício de alongamento é que o músculo deve ser tensionado até o ponto que seja percebida a resistência ou a percepção de leve desconforto (ACSM, 2013; ACSM, 2018).

Embora a duração e a frequência sejam importantes no planejamento e implementação de um programa de alongamento, a intensidade, ou seja, a magnitude da força aplicada à articulação durante o alongamento (JACOBS; SCIASCIA, 2011) pode ser o parâmetro chave para compreensão de como o exercício de alongamento pode afetar as estruturas musculoesqueléticas envolvidas, em nível macro e microscópico. Ao contrário dos parâmetros duração e frequência que são fáceis de quantificar e controlar, a intensidade é mais difícil de quantificar por ser subjetiva (APOSTOLOPOULOS et al., 2015; FREITAS et al., 2016).

Assim, a força aplicada para realizar o alongamento é um parâmetro importante a ser investigado para assim avaliar os efeitos no sistema musculoesquelético. No entanto, a maioria dos estudos realizados com animais adultos e envelhecidos (COUTINHO et al., 2004; RENNER et al., 2006; SALVINI et al., 2006; SECCHI et al., 2008; CAÇÃO-BENEDINI et al., 2013; PEVIANI et al., 2018; VIDAL et al., 2020) e com humanos jovens e idosos (CRISTOPOLISKI et al., 2009; RODACKI et al., 2009; STANZIANO et al., 2009; WATT et al., 2011; GALLO et al., 2013, 2015) não avaliaram a força exercida durante o alongamento.

Desse modo, além da duração e frequência do exercício, conhecer a força aplicada contribuirá para a compreensão dos efeitos na histomorfometria e dos mecanismos celulares envolvidos na adaptação do músculo, cartilagem e osso

ao mesmo estímulo. Ainda, a investigação desses efeitos em modelo animal adulto e envelhecido poderá nortear a prescrição de protocolos de alongamento para pessoas de diferentes faixas etárias.

Portanto, a presente tese teve como objetivo investigar os efeitos do alongamento passivo realizado durante 6 e 12 sessões na histomorfometria do músculo sóleo, da cartilagem da articulação talocrural e da tibia de ratas adultas e envelhecidas.

1.1 OBJETIVOS

Comparar os efeitos de 6 e 12 sessões de alongamento passivo na histomorfometria do músculo sóleo, cartilagem articular da articulação talocrural e tibia de ratas adultas e envelhecidas.

1.1.1 Objetivos específicos

Avaliar massa corporal, massa muscular absoluta e relativa do músculo sóleo;

Avaliar e comparar a força aplicada para alongar músculo sóleo adulto e envelhecido.

Verificar o efeito do alongamento passivo no crescimento longitudinal investigando os desfechos comprimento muscular, número de sarcômeros em série e comprimento dos sarcômeros;

Avaliar o efeito do alongamento passivo no crescimento radial mensurando a área de secção transversa das fibras musculares do sóleo;

Investigar o efeito do alongamento no tecido conjuntivo do músculo sóleo quantificando a imunomarcação dos colágenos 1 e 3.

Averiguar os mecanismos envolvidos na adaptação do músculo ao exercício de alongamento por meio da investigação e quantificação da imunomarcação de TNF α e TGF- β 1.

Avaliar os efeitos do alongamento passivo no número de condrócitos, espessura total, espessura da cartilagem da zona superficial e zona profunda da cartilagem articular da articulação talocrural.

Investigar os efeitos do alongamento na área do canal medular, espessura do osso cortical, número de osteócitos, número de lacunas cheias e lacunas vazias da tíbia.

1.2 HIPÓTESES

Hipótese 1: A força aplicada para realizar o alongamento passivo promove aumento dos parâmetros histomorfométricos do músculo sóleo, cartilagem e osso de ratas adultas enquanto altera somente a histomorfometria do músculo e cartilagem de ratas envelhecidas.

Hipótese 2: O alongamento passivo aumenta a massa muscular, comprimento muscular, a área de secção transversa e número de sarcômeros em série do músculo sóleo de ratas adultas e envelhecidas de forma mais expressiva nas ratas adultas e com 12 sessões.

Hipótese 3: O alongamento passivo aumenta a imunomarcagem de colágeno 1 e 3, TNF- α e TGF- β 1 no músculo sóleo de ratas adultas e envelhecidas, de forma mais expressiva nas ratas adultas e com 12 sessões.

Hipótese 4: O alongamento passivo aumenta a área de tecido não contrátil e de forma mais expressiva nas ratas adultas e com 12 sessões.

Hipótese 5: O alongamento passivo aumenta a espessura da cartilagem articular total, da zona superficial e profunda e número de condrócitos da articulação talocrural de ratas adultas e envelhecidas, de forma mais expressiva nas ratas adultas e com 12 sessões.

Hipótese 6: O alongamento passivo aumenta o número de osteócitos na tíbia de ratas adultas de forma mais expressiva com 12 sessões.

DEFINIÇÕES DE TERMOS UTILIZADOS NA PRESENTE TESE

Nesta seção estão apresentadas as definições e conceitos de termos-chave utilizados ao longo do texto para estabelecer a clareza na comunicação entre autores e leitor, facilitando a compreensão e evitando o significado ambíguo de termos que podem ser interpretados de maneiras diferentes.

Ângulo de penação se refere ao ângulo entre a direção das fibras musculares esqueléticas e a linha de geração de força de um músculo (LIEBER; FRIDÉN, 2000).

O conceito de atrofia muscular adotado para a presente tese se refere a redução na massa muscular. A área de seção transversal reduzida de miofibras com subsequente comprometimento da força é a principal característica da atrofia muscular, refletindo uma depleção de proteínas contráteis. A atrofia muscular também é frequentemente caracterizada por uma mudança na composição do tipo de fibra (FANZANI et al., 2012)

Cisalhamento se refere as forças com cargas tangenciais e opostas aplicadas em uma direção angular (NORDIN; FRANKEL, 2003).

A complacência muscular depende das propriedades visco elásticas e do estado de contração da unidade motora provocada pela atividade elétrica do nervo motor. A complacência tecidual está relacionada à facilidade em com que o tecido é alongado, indicando que o tecido é alongado sem grande esforço (MILLER et al., 2001; KUROSE et al., 2006; YLINEN et al., 2009)

O componente muscular passivo é dependente das propriedades estruturais do músculo e da fáscia que o circunda, indicando que o tecido conjuntivo muscular contribui para a força de resistência passiva de um músculo quando ele é estirado (LINDLE et al., 1997; GAJDOSIK, 2001; GAJDOSIK et al., 2005).

Quando a tensão muscular aumenta para encontrar a resistência e permanece estável à medida que o músculo diminui seu comprimento se refere a contração concêntrica (PADULO et al., 2013).

Crimpagem se refere as ondulações das fibras de colágeno (SCHLEIP; MÜLLER, 2013).

As forças de curvamento são aplicadas de modo que causam o envergamento da estrutura em um eixo. A magnitude do estresse é proporcional à sua distância do eixo do osso, ou seja, quanto mais distante do eixo maior é a magnitude (NORDIN; FRANKEL, 2003).

A elasticidade tem um papel importante para o incremento da produção motora dos movimentos. Se um tendão ou músculo é alongado, a energia elástica é armazenada dentro destas estruturas biológicas. Essa energia deformada é comprimida e utilizada para aumentar a produção motora na fase concêntrica do ciclo de alongamento e encurtamento (KRONBAUER; DE SOUZA CASTRO, 2013).

Quando o músculo aumenta seu comprimento à medida que a resistência se torna maior que a força que o músculo está produzindo é denominado de contração excêntrica (PADULO et al., 2013). Os exercícios excêntricos são realizados contra a gravidade, usando o peso do corpo ou uma carga adicional. Exemplos de exercícios excêntricos: a fase descendente do movimento de agachamento (ISNER-HOROBETI et al., 2013).

A fáscia é uma ampla rede de tecido conjuntivo projetada para transmitir tensão e força de tensão durante o movimento (SCHLEIP; MÜLLER, 2013).

O limite de Hayflick é o limite de encurtamento dos telômeros. O tempo de vida das células é definido de acordo com o tamanho dos telômeros, sendo que se os telômeros se encurtam demais a célula morre (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

A microarquitetura óssea se refere a arquitetura trabecular e cortical (MARTIN; CORREA, 2010a; FANZANI et al., 2012).

Musculoesquelético abrange músculos, ossos (osso e ossos) e cartilagens (cartilagem) do corpo (Descritores em Ciências da Saúde (DECS)).

Os músculos posturais ou tônicos são responsáveis pela manutenção do corpo contra a gravidade e apresentam um predomínio de fibras de contração lenta (MINAMOTO, 2005).

Os componentes elásticos do músculo são assumidos como a titina, membrana e tecido conjuntivo intersticial que contribuem para a força passiva (MACINTOSH; MACNAUGHTON, 2005).

As demais propriedades ósseas que influenciam sua resistência a fraturas, que não se referem à massa óssea e explicam a discrepância entre os valores de densidade mineral óssea e o risco de fratura, têm sido definidas como “qualidade óssea”. A qualidade óssea é determinada por suas propriedades estruturais e materiais e orquestrada pela remodelação óssea, um processo contínuo de renovação por meio do qual o osso velho ou danificado é substituído por um osso mecanicamente saudável e a homeostase do cálcio é mantida (MARTIN; CORREA, 2010).

Capacidade reduzida para ativação da síntese proteica pode afetar a capacidade de aumento do tamanho celular frente a “sinais de crescimento” como a sobrecarga mecânica. O aumento de massa muscular esquelética (anabolismo muscular) é identificado, a longo prazo pela diferença entre a síntese e a degradação proteica. Porém, acredita-se que alterações no metabolismo proteico decorrentes do envelhecimento são responsáveis por resposta anabólica deficiente, também conhecida como resistência anabólica (ANDRADE; LANCHÁ; CAMPOS-FERRAZ, 2015).

A capacidade do material de resistir à deformação elástica se refere à resiliência. Representa a energia que o material é capaz de absorver sem sofrer deformação permanente, ou seja, leva em consideração apenas a quantidade de energia absorvida durante a deformação elástica. Um alto grau de resiliência é encontrado, por exemplo, na cartilagem das articulações (GUEDE; GONZALEZ; CAEIRO, 2013).

A taxa de mudança do torque de resistência durante o deslocamento angular da articulação, na ausência de contração muscular é a rigidez articular passiva. É dependente da área de secção transversa e composição dos tecidos que estão ao redor da articulação (LEITE et al., 2012).

A rigidez muscular passiva é definida como a razão entre a mudança na tensão do músculo por unidade de mudança no seu comprimento, quando é alongado sem a presença de atividade contrátil. A rigidez muscular é uma propriedade mecânica do músculo relacionada com a resistência deste tecido à deformação, sendo representada graficamente pela inclinação da curva *stress-strain* (AQUINO; VIANA; FONSECA, 2005).

A rigidez musculotendínea é a resistência da unidade musculotendínea oposta à deformação de alongamento (GANS, 1982).

A tensão ativa muscular representa os efeitos contráteis ou a força gerada pela interação dos filamentos de actina e miosina (PAGE, 2012).

A tensão passiva muscular surge dos componentes do tecido conjuntivo do músculo esquelético quando alongada além do comprimento de repouso (PAGE, 2012).

As forças de torção são aplicadas de modo que causam um giro em torno do eixo. A magnitude do estresse é proporcional à sua distância do eixo do osso, ou seja, quanto mais distante do eixo, maior é a magnitude (NORDIN; FRANKEL, 2003).

As deformações de tração ocorrem quando o material é esticado (TURNER; BURR, 1993).

O aumento imediato no comprimento muscular pode ocorrer devido ao comportamento viscoelástico dos músculos sempre que eles sofrem alongamentos de magnitude e duração ou frequência suficientes (WEPPLER; MAGNUSSON, 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO MUSCULAR

O alongamento estático, alongamento dinâmico e alongamento com prévia contração muscular são as três técnicas de alongamento muscular mais frequentemente descritas na literatura. O tipo mais comum é o estático, no qual o músculo é mantido sob tensão e a articulação é sustentada por uma força externa em um ângulo constante durante todo o período do exercício (ICHIHASHI; IBUKI; NAKAMURA, 2014; PAGE, 2012; MARTINS, et al., 2013).

A adaptação do músculo à essa força é definida como plasticidade muscular, que é a capacidade da célula muscular de alterar sua estrutura e função em resposta a vários estímulos (ZÖLLNER et al., 2012; APOSTOLOPOULOS et al., 2015). Mas a resposta celular à força mecânica varia e depende da maneira como ela é aplicada. Um exemplo é o estudo que mostrou que em cultura de fibroblastos, o alongamento cíclico repetitivo ou de alta amplitude promoveu aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e apoptose, enquanto o alongamento estático de curta duração reduziu as citocinas pró-inflamatórias IL-3 e IL-6, demonstrando respostas opostas. Ainda, enquanto o alongamento cíclico ou de alta amplitude geralmente aumenta o fator transformador de crescimento β (TGF- β), o alongamento estático de curta duração atenua o aumento tanto do TGF- β 1 solúvel quanto do pró-colágeno 1 após lesão tecidual (COREY et al., 2012), demonstrando que a resposta é dependente da magnitude e forma de aplicação da força externa.

Entre as respostas adaptativas ao alongamento passivo está o aumento do comprimento do músculo que pode ser explicado pelas teorias da adição de sarcômeros em série, adaptação viscoelástica e/ou aumento da tolerância ao alongamento. A sarcomerogênese resultante do alongamento é explicada pelo mecanismo denominado mecanotransdução, no qual o estímulo mecânico afeta a matriz extracelular (MEC), e proteínas integrinas detectam e transmitem esse estímulo para o interior da célula, que ativa uma série de proteínas nucleares e modificam a transcrição gênica e assim regulam a sarcomerogênese (MARTINS et al., 2013; CAÇAO-BENEDINI et al., 2014; APOSTOLOPOULOS et al., 2015),

Também é por meio desse mecanismo que um estímulo mecânico causa alterações intracelulares, como aumento na síntese de proteínas e resultam no aumento da força muscular e na amplitude de movimento (SALVINI; PEVIANI; RUSSO, 2012). As miofibras são capazes de diferenciar entre tensão longitudinal produzindo crescimento no comprimento através da deposição de sarcômeros em série, e sobrecarga funcional ou resistência, que produz a hipertrofia na área transversal (DUNN; OLMEDO, 2016).

Dessa forma, os efeitos do alongamento no músculo são conhecidos pela análise das respostas adaptativas à força imposta sobre ele durante o exercício de alongamento pelo processo denominado mecanotransdução.

2.1.1 Parâmetros de prescrição do exercício de alongamento

Quatro parâmetros do exercício de alongamento foram identificados como sendo importantes para influenciar potencialmente o aumento da flexibilidade muscular e a mobilidade de uma articulação: intensidade, duração, frequência e a posição do alongamento (APOSTOLOPOULOS et al., 2015). Essas variáveis podem ser agrupadas de forma a definir volume e intensidade do alongamento, com o volume referindo-se ao tempo total sob alongamento e intensidade à percepção de quão desconfortável ele é (YOUNG; ELIAS; POWER, 2006).

Os parâmetros de prescrição são rotineiramente investigados em estudos com o objetivo de avaliar os efeitos do alongamento muscular e compreender os mecanismos envolvidos. Em um destes estudos realizado em humanos, os resultados indicaram que a rigidez musculotendinea dos flexores plantares de jovens foi reduzida após duas repetições com duração de 30 segundos de alongamento passivo, e que quando comparada com 4 repetições, não houve redução além da observada com as duas repetições (RYAN et al., 2009).

Uma revisão sistemática relatou que os exercícios de alongamento são comumente prescritos com 2 a 4 repetições, com duração variando entre 10s-30s para jovens adultos e 30s-60s para adultos mais velhos, e recomendou volume mínimo de 60s para cada grupo muscular, tanto em adultos como idosos (GAMA et al., 2018).

Também foi sugerido que exercício de alongamento para os músculos isquiotibiais e tríceps sural de jovens, realizados três vezes por semana, gera

maiores ganhos na flexibilidade do que aqueles realizados uma vez por semana, e promove ganhos semelhantes aos realizados cinco vezes por semana (MARQUES et al., 2009).

Freitas e Mil-Homens (2015) investigaram o efeito do programa de alongamento estático de alta intensidade com duração de 8 semanas na arquitetura muscular e relataram aumento significativo no comprimento do fascículo do bíceps femoral em indivíduos jovens. Outro estudo mostrou que 6 semanas de alongamento passivo realizado 1 vez por semana ou 3 vezes por semana em homens adultos jovens não aumentou a força muscular e hipertrofia, independente da frequência, mas também não foram encontrados efeitos negativos nesses desfechos (SATO et al., 2020).

Assim, a flexibilidade, semelhantemente às outras capacidades físicas aeróbia, força e resistência neuromuscular é uma aptidão treinável e por isso, os efeitos dos parâmetros de prescrição do exercício de alongamento devem ser investigados e em modelos de faixas etárias diferentes, a fim de que os objetivos sejam alcançados com a prescrição apropriada.

2.1.2 Efeitos do exercício de alongamento em animais adultos e humanos

Muitos estudos avaliaram os efeitos do alongamento passivo em animais e humanos de idade adulta, e, portanto, nessa seção o enfoque será dado aos parâmetros de prescrição utilizados e os efeitos observados.

Estudo realizado com ratos mostrou diminuição da inflamação aguda, redução da migração de neutrófilos e aumento dos mediadores pró-resolutivos do tecido conjuntivo como resultado de 14 sessões de alongamento que foram realizados uma vez por dia, com duração de 10 minutos. Os resultados revelaram importantes interações entre as funções dos sistemas musculoesquelético e imunológico, indicando que o alongamento pode ser utilizado terapeuticamente (BERRUETA et al., 2016).

Outro estudo observou efeito anti-inflamatório local do exercício de alongamento no tecido conjuntivo da região lombar. Ratos adultos foram submetidos ao modelo de inflamação do tecido subcutâneo da região lombar, e foram tratados com alongamento ativo, 2 vezes por dia, por 10 minutos, em 12

dias. Para os autores, é possível que um número de mecanismos locais e sistêmicos potencialmente inter-relacionados possam ter contribuído para a redução da inflamação tecidual observada no modelo animal em resposta ao alongamento (COREY et al., 2012).

Os efeitos mecânicos do exercício de alongamento no tecido conjuntivo foram relatados por Cação-Benedini e colaboradores (2013). No estudo dos referidos autores, 10 sessões de alongamento passivo realizado em dias consecutivos, consistindo em 10 repetições com duração de 30 segundos cada e intervalo de 30 segundos entre as repetições e aplicado manualmente em músculo de ratas adultas previamente imobilizado, promoveu o aumento na concentração de colágeno 3 e menor concentração de colágeno 1, indicando melhora na extensibilidade tecidual do tecido conjuntivo intramuscular, o que contribui para o aumento da mobilidade.

Outro estudo mostrou que sessões diárias de alongamento passivo promoveram reorganização macromolecular dos feixes de colágeno do tecido conjuntivo do músculo sóleo de rato adulto previamente imobilizado em posição de encurtamento. O alongamento realizado manualmente consistiu em 10 repetições, com duração de 1 minuto cada repetição e 30 segundos de intervalo entre as repetições, por 3 semanas (COUTINHO et al., 2006).

Embora os estudos anteriores tenham apresentado o efeito do alongamento no tecido conjuntivo muscular, outro estudo mostrou que o alongamento passivo realizado manualmente, duas vezes por semana, em músculos normais de ratos jovens não alterou a porcentagem de tecido conjuntivo. O alongamento estático passivo foi realizado duas vezes por semana durante oito semanas consecutivas, com duração de 40 minutos cada sessão (SECCHI et al., 2008).

Dessa forma, músculo previamente encurtado por modelo de imobilização teve como resposta a reorganização do tecido conjuntivo enquanto músculo não encurtado não apresentou resposta do tecido conjuntivo muscular ao alongamento passivo. É necessário ressaltar que os parâmetros de prescrição foram diferenciados, com estudos utilizando volume de 300 segundos (CAÇÃO-BENEDINI et al., 2013a), 600 segundos (SALVINI et al., 2006) ou 40 minutos

(SECCHI et al., 2008), o que demonstra que os efeitos são dependentes dos parâmetros de prescrição.

Além de repercussões no tecido conjuntivo muscular, adaptações musculares também são relatadas. Em um estudo, 9 sessões de alongamento passivo realizado manualmente no músculo sóleo imobilizado de ratos jovens, com 10 repetições de 1 minuto de duração cada e intervalo de 30 segundos, acarretou aumento do comprimento e número de sarcômeros em série, mas não promoveu ganhos na área de secção transversa (SALVINI et al., 2006).

Outro estudo mostrou que uma única sessão de alongamento no músculo sóleo de rato jovem previamente imobilizado em posição de encurtamento usando fita adesiva, e realizado uma vez por semana com duração de 40 minutos foi suficiente para prevenir a perda de sarcômeros em série e atrofia muscular que são consequências da imobilização (GOMES et al., 2004).

A atrofia do músculo sóleo de ratos jovens, que também foi previamente imobilizado em posição de encurtamento, foi controlada por 9 sessões de alongamento passivo com duração de 40 minutos cada, e nos músculos que não foram encurtados pela imobilização, o protocolo de alongamento induziu sarcomerogênese e hipertrofia muscular (COUTINHO et al., 2004).

O alongamento realizado no músculo sóleo previamente imobilizado em ratos adultos, com frequência de 3 vezes por semana, com 10 repetições, com 1 minuto de duração, intervalados por 30 segundos durante 3 semanas, impediu a atrofia muscular. Quando o alongamento foi realizado diariamente causou hipertrofia, demonstrando efeito no trofismo muscular (COUTINHO et al., 2006).

Por outro lado, um estudo concluiu que uma única sessão de alongamento estático passivo, constituída de 10 repetições mantidas durante um minuto, com intervalo de 30 segundos, contribuiu para a atrofia muscular pois ativou a via ubiquitina-proteassoma no músculo sóleo de rato jovem. Os resultados mostraram aumento na expressão gênica da atrogina-1 48 horas após uma única sessão de alongamento quando comparada ao grupo controle. Outro grupo de ratos no mesmo estudo foram alongados durante 2, 3 ou 7 dias, com o mesmo protocolo. Os resultados mostraram aumento da expressão da atrogina-1 nas 3 situações quando comparado ao grupo controle, sendo que quando o

alongamento foi realizado 3 vezes durante uma semana, a expressão da atrogina foi maior que nas outras situações (PEVIANI et al., 2007).

Portanto, os efeitos observados no músculo foram aumento do comprimento e número de sarcômeros em série (SALVINI et al., 2006), prevenção da perda de sarcômeros em série e atrofia muscular de músculos encurtados por modelo de imobilização (GOMES et al., 2004), hipertrofia muscular (COUTINHO et al., 2006) mas também foi relatado atrofia muscular (PEVIANI et al., 2007) e novamente, os parâmetros de prescrição foram diferenciados, com estudos utilizando volume de 600 segundos (SALVINI et al., 2006; COUTINHO et al., 2006; PEVIANI et al., 2007) e 40 minutos (GOMES et al., 2004; COUTINHO et al., 2004) realizados em 1 sessão (GOMES et al., 2004; PEVIANI et al., 2007) ou 9 sessões (SALVINI et al., 2006; COUTINHO et al., 2006; COUTINHO et al., 2004), demonstrando que os efeitos são dependentes dos parâmetros de prescrição.

A partir da análise dos resultados dos estudos em animais citados acima, fica clara a variabilidade entre as prescrições e que os parâmetros descritos em sua maioria foram o número de repetições, a duração, a frequência e o número total de sessões, sem relato da avaliação e interpretação dos efeitos da intensidade do exercício. Por isso, é importante o estudo do exercício de alongamento que contemple todos os parâmetros de prescrição para compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação muscular ao exercício realizado.

O uso de modelos animais para estudar o efeito do alongamento permitem investigar a histomorfometria e os mecanismos celulares envolvidos na adaptação do músculo esquelético, o que é limitado em estudos com humanos. Em humanos, o efeito do alongamento é frequentemente investigado, porém os estudos relatam efeitos funcionais e não histomorfométricos, pelas limitações relativas à metodologia de investigação histomorfométrica em humanos. Portanto, estudos com animais podem contribuir para a compreensão dos efeitos funcionais do alongamento através da interpretação dos efeitos histomorfométricos, celulares e moleculares observados no músculo esquelético.

Dessa forma, os efeitos do alongamento passivo em humanos também serão abordados nessa seção. Estudo realizado com jovens do sexo masculino, verificou os efeitos de uma sessão composta por 3 repetições mantidas por 60 segundos e intervalo de 30 segundos, com intensidade alta e baixa. A intensidade do alongamento foi baseada na escala de avaliação numeral em que o alongamento de baixa intensidade foi relatado como desconforto percebido entre 1 e 2, e alta intensidade entre 9 e 10. Independente da intensidade, ambos os grupos melhoraram a ADM, mas não foram observadas diferenças entre as duas intensidades do alongamento na arquitetura muscular (comprimento do fascículo e ângulo de penação) e torque passivo (SANTOS et al., 2019).

Dois protocolos de alongamento estático dos músculos isquiotibiais com diferentes intensidades (50% e 85% da percepção de desconforto) e volumes (120 segundos 240 segundos) foram testados em homens jovens treinados. Foram realizadas 3 repetições (intensidade de 85%) e 6 repetições (intensidade de 50%) com duração de 40 segundos e intervalo de 15 segundos, e avaliadas a ADM de flexão de quadril, o pico de força e a atividade muscular durante o exercício isométrico máximo de flexão do joelho. Os efeitos agudos observados foram aumento na ADM em ambos os protocolos e redução no pico de força com a intensidade de 85%. Dessa forma, volume e intensidade do alongamento são importantes para a compreensão das alterações específicas na flexibilidade, atividade muscular e força e assim contribuem para melhorar os programas de reabilitação e a prescrição de treinamento que incluam as capacidades físicas flexibilidade e força (MARCHETTI et al., 2019).

Tendo em vista que o tempo de manutenção de alongamento assim como o tempo de intervalo entre as repetições também varia muito entre os estudos, um trabalho foi realizado com o objetivo de investigar o efeito do alongamento estático com diferentes intervalos de repouso na rigidez do músculo gastrocnêmico. Foram realizados 120 segundos de alongamento no gastrocnêmio de homens jovens, com intervalo de 30 segundos ou 0 segundos entre as repetições. Os resultados mostraram que o intervalo de descanso de 0 s diminuiu a rigidez muscular em maior extensão, embora o intervalo de descanso de 30 s também diminuiu a rigidez muscular. Assim, um intervalo de

descanso mais curto pode ser mais eficaz na redução da rigidez muscular (NOJIRI et al., 2019).

Uma revisão sistemática de estudos realizados em humanos, apresentou o efeito agudo do alongamento estático na performance muscular, concluindo que alongamentos com tempo de até 45s podem ser usados em rotinas de pré-exercício sem risco de diminuições significativas nos desempenhos das tarefas dependentes de força, potência ou velocidade, enquanto durações mais longas, por exemplo, 60 s têm mais probabilidade de causar redução pequena ou moderada no desempenho (KAY; BLAZEVOICH, 2012).

Outra revisão sistemática, executada também com estudos realizados com humanos jovens, mostrou que alongamento estático promoveu redução da performance física de magnitude pequena a moderada, e que o alongamento estático com duração maior que 60 segundos promoveu maiores prejuízos em comparação a duração menor que 60 segundos (BEHM et al., 2016).

Dessa forma, as adaptações musculares relacionadas ao exercício de alongamento em jovens dependem da intensidade, duração e frequência do exercício de alongamento, gerando respostas diferenciadas e diretamente influenciadas pelos parâmetros de prescrição.

2.1.3 Efeitos do exercício de alongamento em humanos e animais idosos

Na população idosa, o alongamento é comumente utilizado para aumentar o comprimento muscular e a ADM além de ser utilizado para melhorar o equilíbrio postural (REDDY; ALAHMARI, 2016). Em estudos com idosos humanos, o exercício de alongamento foi eficaz para aumentar a amplitude de movimento de quadril, joelho e tornozelo em 20 a 30%, assim como o equilíbrio (REDDY; ALAHMARI, 2016), a mobilidade de flexão de tronco e flexão de quadril (OLIVEIRA; OLIVEIRA; PIRES-OLIVEIRA, 2016), melhorar a mobilidade de idosas sedentárias (DAL PAZ et al., 2018), a capacidade funcional (GALLO et al., 2015) e flexibilidade dos flexores do joelho de idosas institucionalizadas (GALLON et al., 2011), demonstrando assim as repercussões na funcionalidade.

Portanto, estudos com população idosa também são frequentes na área de investigação dos efeitos do alongamento e, assim, nessa seção o enfoque

será dado aos parâmetros de prescrição utilizados e os efeitos observados em estudos com animais e humanos.

Um estudo verificou os efeitos de um programa de exercício de alongamento estático realizado durante 10 semanas. O alongamento foi realizado nos músculos flexores do quadril, isquiotibiais e gastrocnêmio, em 4 repetições com duração de 30 segundos cada, duas vezes por semana. O volume do alongamento foi eficaz em aumentar a ADM em todas as articulações, assim como aumentou o equilíbrio e tempo de apoio unipodal, tanto com olhos abertos e fechados. Os autores atribuíram a melhoria no equilíbrio ao fato do alongamento ter induzido alterações tanto na propriocepção quanto pode ter reduzido a rigidez da articulação, fásia e unidade musculotendínea, afetando assim a capacidade de se adaptar adequadamente aos desafios de estabilidade (REDDY; ALAHMARI, 2016).

Outro estudo realizado com mulheres idosas, avaliou os efeitos do alongamento estático realizado durante 12 semanas, com cada sessão durando 60 minutos, duas vezes por semana. Vinte exercícios foram realizados considerando os grupos musculares para as regiões cervical e membros superiores (trapézio superior, escalenos, esternocleidomastóideos, flexores e extensores do punho e dos dedos, deltóides, tríceps e peitorais); tronco e membros inferiores (oblíquos, quadrado lombar, isquiotibiais, adutores, glúteos, abdutores e tríceps sural). Os exercícios foram realizados ativamente, com três repetições, mantido por 30 segundos cada, com um intervalo de descanso de 1 minuto entre as repetições. Como resultados, as idosas apresentaram aumento na mobilidade de flexão de tronco e flexão de quadril (OLIVEIRA; OLIVEIRA; PIRES-OLIVEIRA, 2016).

Recomenda-se a realização de treinamento de flexibilidade mais do que 2 dias/semana, mantendo cada repetição do exercício de alongamento por 30 a 60 segundos, em cada grupamento muscular e intensidade definida como sensação de leve desconforto para idosos saudáveis (ZALESKI et al., 2016; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE et al., 2018). Em relação à prescrição do exercício de alongamento, revisões sistemáticas indicam que para os idosos a duração do alongamento deve ser entre 30 e 60 segundos (ZOTZ et al., 2014; GAMA et al., 2018).

Diante do exposto acima são conhecidos os efeitos do alongamento estático passivo em idosos humanos. No entanto, estudos com animais envelhecidos são raros, embora permitam a investigação dos efeitos do alongamento em nível celular e molecular. A vantagem de estudos utilizando roedores envelhecidos é o fato de os animais possuírem morbidades e mecanismos bastante semelhantes aos encontrados em humanos com sarcopenia, mas o custo elevado e a limitada disponibilidade de roedores envelhecidos tornam o uso deste modelo difícil. Modelos de roedores envelhecidos são os modelos mais naturais e têm várias vantagens em comparação com outros modelos de sarcopenia, como os modelos com suspensão dos membros posteriores e modelos de atrofia por desuso (BAEK et al., 2020).

Utilizando esse modelo, um protocolo de exercício de alongamento passivo estático realizado com um aparato com célula de carga, 3 vezes por semana, durante uma semana promoveu redução da porcentagem de imunomarcação de TGF- β 1 e colágeno 1 e aumentou a porcentagem de imunomarcação de colágeno 3 no músculo sóleo de ratas envelhecidas, indicando efeito anti-fibrótico do exercício. As sessões consistiram em 4 repetições com 1 minuto de duração cada e intervalo de 30 segundos entre as repetições (ZOTZ et al., 2016).

Também utilizando o modelo de ratas envelhecidas e comparando com ratas jovens, outro estudo igualmente investigou os efeitos do exercício de alongamento passivo estático realizado com um aparato com célula de carga. O protocolo utilizado foi 4 repetições com 1 minuto de duração cada e intervalo de 30 segundos entre as repetições, 3 vezes por semana, durante 3 semanas. Os autores observaram como efeito a redução da área de secção transversa da fibra muscular com o alongamento passivo nas ratas envelhecidas e aumento da ASTFM e sarcomerogênese nas ratas jovens (MASSENZ et al., 2020).

Um estudo utilizando ratos machos envelhecidos verificou as respostas vasculares do músculo esquelético com protocolo de alongamento estático realizado com uma tala que posicionava o tornozelo em dorsiflexão de 30°, durante 30 minutos, 5 dias por semana por 4 semanas. As adaptações crônicas foram vasodilatação o que aumentou a hiperemia induzida pelo exercício, e as

implicações clínicas do estudo foram que o alongamento muscular realizado com uma tala pode fornecer um meio viável de melhorar o fluxo sanguíneo muscular e a função em pacientes idosos que não podem realizar exercícios aeróbios regulares (HOTTA et al., 2018).

Dessa forma, é possível verificar que os efeitos do estímulo mecânico do alongamento em estudos com idosos humanos foram redução da rigidez passiva (efeito agudo) e aumento da amplitude de movimento (efeito agudo e crônico) enquanto em estudos com animais envelhecidos, os efeitos foram remodelação do colágeno intramuscular (efeito agudo), redução da área de secção transversa da fibra muscular (efeito crônico) e melhora do fluxo sanguíneo muscular (efeito crônico). No entanto, nos estudos citados anteriormente, existe muita variabilidade nos parâmetros de prescrição pois os protocolos utilizados eram distintos, o que torna difícil a interpretação dos achados. Por isso, estudo que investigue o efeito do mesmo protocolo em animais jovens e envelhecidos poderá contribuir para a prescrição adequada frente aos efeitos identificados.

2.2 SISTEMA OSTEOMIOARTICULAR: NÍVEL MACROSCÓPICO E MICROSCÓPICO

2.2.1 Músculo esquelético e matriz extracelular do músculo esquelético

O músculo esquelético é um dos tecidos mais dinâmicos e plásticos do corpo humano, com composição e arquitetura projetadas para fornecer a mobilidade e facilitar a função humana. É uma estrutura hierárquica, composta por sarcômeros dispostos em feixes de miofibrilas, fibras e fascículos que juntos formam um músculo completo e são envolvidos por uma matriz de tecido conjuntivo. O tamanho total de um músculo é determinado principalmente pelo número e tamanho das fibras musculares individuais, mas a infiltração de gordura e tecido conjuntivo pode alterar essa relação (FRONTERA; OCHALA, 2015; LIEBER et al., 2017; TIELAND; TROUWBORST; CLARK, 2018).

Os sarcômeros, conjuntos de proteínas de aproximadamente 3 μm de comprimento, são as unidades contráteis do músculo esquelético. O número de sarcômeros em série e em paralelo influencia no comprimento da fibra muscular

e na área de secção transversa, o que por sua vez, afeta a capacidade de geração de força (WISDOM; DELP; KUHL, 2015). Apesar do comprimento do sarcômero ter uma faixa de operação preferida, sabe-se que o músculo esquelético é extremamente plástico, ou seja, pode se adaptar às mudanças crônicas de comprimento, pela alteração nos sarcômeros (TAKAHASHI et al., 2012; LIEBER et al., 2017). As fibras musculares podem ter seu comprimento modificado pelo aumento do comprimento dos sarcômeros ou aumento do número de sarcômeros em série, ou ainda, pelo aumento de ambos (CAIOZZO et al., 2002).

Assim, o músculo esquelético cresce em um padrão transversalmente isotrópico ao longo da direção da fibra em resposta ao alongamento mecânico passivo e ortogonal à direção da fibra em resposta ao estresse mecânico ativo. Na escala macroscópica, um músculo passivamente alongado cresce excêntrica enquanto um músculo estressado ativamente cresce concêntrica. Na escala microscópica, o alongamento passivo induz a sarcomerogênese enquanto o estresse ativo induz a miofibrillogênese, (ZÖLLNER et al., 2012).

A matriz extracelular (MEC) é essencial para o desenvolvimento, manutenção e regeneração do músculo (KULAR; BASU; SHARMA, 2014). A MEC está envolvida na macroestrutura do músculo, organizando fibras em feixes, feixes em fascículos e integrando a estrutura muscular com a aponeurose e tendão. Ainda, a MEC possui um papel essencial na mecanotransdução e transmissão da força da fibra para o tendão e vice-versa, além de contribuir para a resposta elástica do tecido muscular (MEYER; LIEBER, 2011; STEARNS-REIDER et al., 2017).

O tecido conjuntivo do músculo esquelético é subdividido em três compartimentos: o endomísio, localizado em torno das fibras musculares individuais; o perimísio, que envolve grupos de fibras musculares formando os feixes de fibras e o epimísio, que envolve todo o músculo. O tecido conjuntivo muscular é extremamente importante na determinação das propriedades mecânicas gerais de todo o músculo e possui funções que incluem o suporte mecânico para os principais nervos e vasos sanguíneos que atendem o tecido muscular como um todo, bem como suporte para neurônios individuais e

capilares sanguíneos de cada fibra muscular (PURSLOW, 2002; MCLOON et al., 2018).

Os tecidos conjuntivos intramusculares, e particularmente o endomísio, são estruturas importantes para a transmissão de força entre as fibras musculares e o osso. A transmissão de força ao longo do tecido conjuntivo é denominada transmissão epimuscular, por meio da via intermuscular e extramuscular. Na via intermuscular, a força é transmitida entre dois músculos vizinhos através do tecido conjuntivo na interface do ventre muscular, enquanto na via extramuscular, a força é transmitida entre o epimísio de um músculo e uma estrutura não muscular adjacente (MAAS; SANDERCOCK, 2010). A razão da força transmitida entre as vias miotendinosa e epimuscular (inter ou extramuscular) muda devido às propriedades mecânicas alteradas dos tecidos conjuntivos. Essas propriedades mecânicas podem ser alteradas como consequência de lesão muscular, doença, cirurgia ou envelhecimento (BERNABEI; MAAS; VAN DIEËN, 2016).

Em nível molecular, o principal componente do tecido conjuntivo intramuscular é o colágeno, especialmente o colágeno tipo IV presente na membrana basal das fibras musculares, e os colágenos 1 e 3 predominantes no endomísio e perimísio (PURSLOW, 2002; KULAR; BASU; SHARMA, 2014; MCLOON et al., 2018; PEVIANI et al., 2018).

Colágeno 1 e 3 são as isoformas primárias no músculo esquelético, e cada um possui diferentes propriedades mecânicas. O colágeno 1 está associado à rigidez do tecido, ou seja, resistência ao estiramento, enquanto a abundância de colágeno 3 se correlaciona com a complacência tecidual, ou seja, facilidade de ser alongado (MILLER et al., 2001; KUROSE et al., 2006). O colágeno 1 é o principal colágeno tolerante ao estresse no músculo. Possui alta resistência à tração e elasticidade limitada e, portanto, é adequado para transmissão de força. O colágeno 3 possui estrutura e disposição semelhante à do colágeno 1, mas apresenta fibras mais finas e elásticas (MILLER et al., 2001; GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003).

Quantidades iguais de ambos os tipos de colágeno (1 e 3) são encontradas no perimísio. No endomísio, o colágeno 3 é a forma predominante e apenas pequenas quantidades de colágeno 1 são encontradas (GELSE;

PÖSCHL; AIGNER, 2003). Os músculos lentos contêm mais conteúdo de colágeno 1 do que colágeno 3, enquanto a proporção de colágeno 3 é maior nos músculos rápidos (MILLER et al., 2001).

A interação entre os mioblastos e conseqüentemente miotubos e células musculares e os componentes da matriz extracelular é um fator chave no desenvolvimento e crescimento do tecido muscular (PURSLOW, 2002; TAKAHASHI et al., 2012). A homeostase da matriz extracelular requer a regulação constante, isto é, síntese e degradação dos componentes da MEC, com o acúmulo da MEC ocorrendo devido à desregulação entre processos catabólicos e anabólicos nas camadas extracelulares, levando ao aumento na deposição de colágeno típico das condições fibróticas (MARTINEZ-HUENCHULLAN et al., 2017). Assim, a modulação da MEC pode levar à adaptação muscular funcional que está diretamente relacionada à sua própria morfologia (TAKAHASHI et al., 2012).

A regulação da homeostase da MEC é realizada por fatores de crescimento como o fator transformador de crescimento beta ($TGF\beta$) e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF). As isoformas do $TGF-\beta$ ($TGF-\beta$ 1-3) são citocinas envolvidas em uma variedade de processos celulares, incluindo reparo de miofibras e regulação da formação de tecido conjuntivo. O $TGF-\beta$ promove a preservação da MEC por meio do aumento da síntese de proteínas da matriz, promovendo a expressão de genes pro-fibróticos, como o colágeno 1 e CTGF, e suprimindo a atividade das proteínas de degradação da MEC, como as metaloproteases da matriz (MMPs) (MARTINEZ-HUENCHULLAN et al., 2017; ISMAEEL et al., 2019).

É sugerido que o $TGF-\beta$ 1 também desempenhe um papel na fibrose que acompanha o processo de envelhecimento. Durante o envelhecimento normal, as células musculares aumentam os níveis de $TGF-\beta$ 1 e assim promovem a transição para um fenótipo mais fibrótico. A expressão gênica do $TGF-\beta$ 1 no músculo esquelético tem se mostrado mais elevada em idosos que em adultos jovens, que pode ser resultado da inflamação crônica associada à idade que impulsiona a ativação de fibroblastos e também pode ser reflexo da tentativa de reparar o dano tecidual acumulado (MANN et al., 2011; ISMAEEL et al., 2019).

O TGF- β atua na diferenciação de células musculares e na fusão de miofibras, e pode inibir a expressão de várias proteínas específicas do músculo esquelético impedindo assim a ativação de reguladores positivos da diferenciação de células musculares, tais como MyoD e miogenina (KIM; LEE, 2017).

O TGF- β reduz a miogênese induzida pela MyoD por meio da via de transdução de sinal mediada por Smad3. A sinalização inicia com a ligação do TGF β a um receptor de TGF β tipo I ou II. Os receptores de TGF β são receptores serina/treonina quinase, que recrutam um segundo receptor após a ligação inicial de TGF β e catalisam a fosforilação do segundo receptor formando um complexo homodimérico ou heterodimérico. O complexo receptor então fosforila o receptor regulado pelas Smads, que se ligarão a uma Smad colaboradora, Smad4, para formar o complexo Smad. O complexo Smad é translocado para o núcleo, onde se liga a fatores de transcrição e regula a transcrição de genes-alvo (VELLEMAN et al., 2012).

Assim a via TGF β -1/miostatina tem um papel importante na mediação da regulação de massa muscular, bem como nas modificações da MEC. A expressão do gene miostatina (MSTN) restringe o crescimento muscular e a hipertrofia, assim como estimula a rigidez dos colágenos 1 e 3 da MEC, gerando fibrose (FATURU et al., 2016).

2.2.1.2 Músculo esquelético no envelhecimento

O processo de envelhecimento é acompanhado por uma perda progressiva de massa muscular esquelética e função, referida como sarcopenia. A sarcopenia é um distúrbio muscular esquelético progressivo e generalizado que está associado ao aumento da probabilidade de resultados adversos, incluindo quedas, fraturas, incapacidade física e mortalidade. É definida por baixos níveis de força muscular, quantidade/qualidade muscular e desempenho físico, o qual atua como um indicador de gravidade (CRUZ-JENTOFT et al., 2019). Nos seres humanos, a sarcopenia afeta indivíduos a partir da quarta década de vida, com uma diminuição de 30 a 50% na massa e função muscular esquelética até o momento em que os indivíduos atingem aproximadamente 80 anos de idade (MCCORMICK; VASILAKI, 2018).

Mas o envelhecimento fisiológico é um processo altamente individual, caracterizado por uma degeneração progressiva dos tecidos e sistemas orgânicos. Por exemplo, as alterações relacionadas à idade no tecido conjuntivo incluem densificação e fibrose, o que funcionalmente podem modificar as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo e do músculo esquelético, contribuindo para redução relacionadas à idade na força muscular e amplitude de movimento, que não podem ser explicadas unicamente pela perda de massa muscular (ZÜGEL et al., 2018).

Um aumento no tecido adiposo e fibrótico intermuscular é uma manifestação típica do envelhecimento (TROMBETTI et al., 2016), pois o processo de envelhecimento está associado a perda de força muscular, alterações nas propriedades mecânicas dos colágenos e alterações na arquitetura muscular (KARAMANIDIS; ARAMPATZIS, 2005). O aumento do tecido conjuntivo no endomísio e perimísio é responsável pela fibrose do tecido muscular no idoso e pode estar relacionada com o aumento das concentrações de colágeno 1 na matriz extracelular da célula muscular esquelética (ARTHUR; COOLEY, 2012; GILLIES et al., 2012).

A importância do colágeno no envelhecimento é sustentada pela descoberta de que uma reduzida sinalização de IGF-1 aumenta a expressão de colágenos e outros componentes da MEC (FREITAS-RODRÍGUEZ; FOLGUERAS; LÓPEZ-OTÍN, 2017). Com o aumento da idade, os feixes de colágeno ficam mais tensos, causando diminuição da complacência do tecido conjuntivo (STEARNS-REIDER et al., 2017) e acarretando redução da elasticidade de todo o músculo, bem como de apenas algumas fibras, induzindo ao enrijecimento muscular progressivo (FRONTERA; OCHALA, 2015). Isso pode ser devido a aumento no número de pontes cruzadas, mas outros fatores, tais como as mudanças na complacência cruzada e elementos sarcoméricos como a titina, podem contribuir. No envelhecimento, o músculo esquelético demonstra uma morfologia tipicamente fibrótica, em que a orientação bidirecional das fibras de colágeno do perimísio é perdida e substituída por uma rede irregular de fibras com diminuição da formação da crimpagem (KULAR; BASU; SHARMA, 2014; WESSNER et al., 2019).

Portanto, o envelhecimento aumenta o diâmetro das fibras de colágeno, reduzindo assim a extensibilidade (ZAKAS et al., 2005), e as fibras musculares apresentam atrofia e podem ainda estar acompanhadas por inflamação, infiltração por tecido adiposo, fibrose e decréscimo da vascularização (DEMONTIS et al., 2013; NILWIK et al., 2013).

Por meio de análise de tomografia computadorizada realizada com o objetivo de comparar a área de secção transversa do músculo quadríceps de idosos e jovens foi observado que idosos apresentam redução da área inclusive quando expresso como porcentagem da massa corporal. No mesmo estudo, análise imunohistoquímica mostrou redução da área de secção transversa das fibras musculares tipo II em comparação aos jovens, sem diferença visualizada nas fibras tipo I (CALLAHAN et al., 2014).

As duas vias de sinalização principais que controlam o tamanho do músculo esquelético são o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1- fosfatidilinositol 3-quinase-Akt /proteína quinase B - proteína alvo da rapamicina em mamíferos (IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR) e a via miostatina-Smad3. A Akt estimula a síntese de proteínas ativando mTOR e seus efetores, e a mTOR por sua vez, responde aos múltiplos sinais além do Akt, incluindo aminoácidos. Por outro lado, a segunda principal via de sinalização que controla o crescimento do músculo esquelético envolve a miostatina, um membro da superfamília TGF β . A miostatina é produzida pelo próprio músculo esquelético e atua como regulador negativo do crescimento muscular. Os efeitos da miostatina são mediados pelos fatores de transcrição Smad 2 e 3, que também interferem na sinalização da via IGF1-Akt (SCHIAFFINO et al., 2013; ZIAALDINI et al., 2017).

A redução da área de secção transversa decorre de mudanças na expressão de genes relacionados à diferenciação e crescimento muscular (MyoD), regulação de massa muscular (miostatina) e fatores pro-inflamatórios, como proteína kinase ativada por mitógeno (p38MAPK), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (RAMIREZ et al., 2013). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que está associada a modulação da perda do tecido muscular, particularmente em condições patológicas como a caquexia do câncer e sarcopenia (MCMAHON et al., 2019).

A concentração plasmática de TNF- α é significativamente mais elevada em idosos do que em indivíduos de meia-idade, sugerindo que os biomarcadores inflamatórios aumentam gradualmente com a idade (WANG et al., 2017). Acredita-se que a inflamação sistêmica crônica de baixo grau e as respostas inflamatórias prolongadas tanto às infecções quanto às lesões musculares, contribuam para a diminuição da síntese de proteína muscular e capacidade de regeneração muscular em idosos, tendo em vista que concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como IL-6 e TNF- α são associadas à perda de massa muscular (VAN DER POEL et al., 2011). TNF- α estimula a ativação e translocação nuclear de NF- κ B nas células do músculo esquelético, regulando a via da ubiquitina, no processo de atrofia muscular (REID; LI, 2001; MOURKIOTI; ROSENTHAL, 2008).

Assim, o TNF- α tem sido considerado um fator crucial na perda de massa muscular pois pode induzir a perda por meio da degradação e diminuição da síntese de proteínas. A expressão aumentada de TNF- α pode levar à proteólise muscular, que subsequentemente provoca diminuição na massa muscular e eventualmente na sarcopenia. Uma das razões pode ser que o TNF- α induza tanto a apoptose de fibras musculares do tipo I quanto do tipo II (MOURKIOTI; ROSENTHAL, 2008; DALLE; ROSSMEISLOVA; KOPPO, 2017; WANG et al., 2017).

2.2.2 Cartilagem articular

O complexo articular do tornozelo forma a ligação cinética que permite que o membro inferior interaja com o solo, um requisito fundamental para a marcha e outras atividades da vida diária, e dessa forma, a mobilidade da articulação talocrural é vital para a marcha e equilíbrio (LEE et al., 2012). Idade e sexo são fatores que podem alterar a ADM do tornozelo, tendo sido demonstrado que mulheres jovens (20-39 anos) apresentam maior ADM do tornozelo em comparação com os homens da mesma faixa etária e que com o aumento da idade, as mulheres idosas possuem menor ADM de dorsiflexão e maior ADM de flexão plantar em comparação com homens idosos (70-79 anos).

Ainda, independente do sexo, pessoas idosas apresentam menor ADM de tornozelo em comparação aos jovens (BROCKETT; CHAPMAN, 2016).

A articulação é uma estrutura complexa com funções biomecânicas associadas com o movimento. As articulações, especialmente as de suporte de peso, são continuamente submetidas a cargas mecânicas, e para suportar essas demandas cada uma das extremidades ósseas é coberta e protegida pela cartilagem articular (CHEN et al., 2013).

A cartilagem articular é uma camada fina de tecido conjuntivo, especializado, com propriedades viscoelásticas exclusivas (FOX; BEDI; RODEO, 2009). O papel da cartilagem articular é fornecer uma interface entre os ossos com uma superfície livre de fricção para permitir movimentos articulares suaves e para resistir e distribuir as forças tais como força de compressão, tração e cisalhamento de um osso para outro (FOX; BEDI; RODEO, 2009; CAMARERO-ESPINOSA et al., 2016) Dessa forma, a principal função da cartilagem é a absorção e dissipação da carga mecânica, que é permitida pela organização espacial dos componentes da matriz na camada superficial e pelo alto teor de proteoglicanos (HOUARD; GOLDRING; BERENBAUM, 2013)

A cartilagem articular é cartilagem do tipo hialina, e possui entre 2 a 4 mm de espessura. Diferente dos outros tecidos não possui vasos sanguíneos, nervos ou vasos linfáticos, mas é composta por uma matriz extracelular densa com uma distribuição de células altamente especializadas denominadas de condrócitos. A MEC da cartilagem articular é composta principalmente de água, colágeno e proteoglicanos, com outras proteínas não colágenas e glicoproteínas em quantidades menores (FOX; BEDI; RODEO, 2009).

Os condrócitos são células metabolicamente ativas que sintetizam e transformam um grande volume de componentes da MEC, como colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e hialuronano. Os condrócitos mecanossensíveis são os principais contribuintes para a produção da MEC e fornecem a capacidade funcional e mecânica de resistir às forças de compressão, tração e cisalhamento nas articulações diartrodiais (AKKIRAJU; NOHE, 2015).

A cartilagem é dividida em camadas ou zonas distintas que têm sua própria função devido à orientação das fibras de colágeno, distribuição e forma

dos condrócitos e hidratação da cartilagem, e que são importantes para a sua função biomecânica (FOX; BEDI; RODEO, 2009).

A fina zona superficial ou tangencial protege as camadas mais profundas das tensões de cisalhamento e representa aproximadamente 10% a 20% da espessura da cartilagem articular. Consiste em pequenas células alongadas dentro de uma matriz extracelular densa que são orientadas ao longo do eixo principal de movimento e as fibras de colágeno II são orientadas paralelamente à superfície articular (FOX; BEDI; RODEO, 2009; DECKER; KOYAMA; PACIFICI, 2015).

A zona média representa 40% a 60% do volume total da cartilagem e contém proteoglicanos e fibras de colágeno mais espessas. Nesta camada, o colágeno é organizado obliquamente, e os condrócitos são esféricos e de baixa densidade. Funcionalmente, a zona intermediária é a primeira linha de resistência às forças compressivas, e os condrócitos dentro desta zona média produzem, depositam e mantêm todas as moléculas típicas da matriz da cartilagem, incluindo o próprio colágeno II e agrecan, e assim conferindo ao tecido uma resiliência biomecânica chave (FOX; BEDI; RODEO, 2009; DECKER; KOYAMA; PACIFICI, 2015).

A zona profunda é responsável por oferecer maior resistência às forças compressivas, uma vez que as fibras de colágeno estão dispostas perpendicularmente à superfície articular. Os condrócitos nesta zona são menores em tamanho e número. A zona profunda representa aproximadamente 30% do volume da cartilagem articular, resiste a forças de cisalhamento e fornece absorção de choques para o osso subcondral (FOX; BEDI; RODEO, 2009; DECKER; KOYAMA; PACIFICI, 2015).

A zona calcificada difere das três outras zonas no que diz respeito à mineralização de sua matriz extracelular e pela presença de vasos sanguíneos e fibras nervosas que se originam do osso subcondral. A zona calcificada faz interface com a cartilagem não mineralizada, da qual é separada pela *tidemark*, e o osso subcondral (HOUARD; GOLDRING; BERENBAUM, 2013).

Os condrócitos podem responder a uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento, cargas mecânicas, forças piezoelétricas e pressões hidrostáticas. Em situações de estresse, como o exercício físico, a

regulação positiva de genes pró-inflamatórios pode levar à proliferação celular, mas também comprometer a síntese da MEC o que leva à perda da integridade da cartilagem e aos sinais precoces de lesões (SZAFRANSKI et al., 2004).

A resposta à carga imposta sobre a cartilagem ocorre pelo processo de mecanotransdução dos condrócitos, que é iniciada na interface entre a membrana celular e a matriz extracelular, com os processamento desses sinais mecânicos envolvendo mecanorreceptores, como canais iônicos e integrinas (LEONG et al., 2011), com importante papel na manutenção da saúde da articulação e homeostase da cartilagem (ZHAO et al., 2020).

Tanto o desuso quanto o exercício promovem alterações na cartilagem articular. Um estudo utilizando um modelo de imobilização articular do quadril de ratos machos jovens, mostrou redução da espessura da cartilagem articular, do número de condrócitos e da densidade de colágeno 1 após 8 semanas de imobilização, enquanto o grupo que fez exercício em esteira apresentou aumento da espessura da cartilagem, da densidade do colágeno e no volume dos núcleos dos condrócitos (MALDONADO et al., 2013).

Outro estudo também realizado com ratos analisou o efeito do alongamento passivo na cartilagem articular do tornozelo imobilizado por 7 semanas. O alongamento passivo foi realizado manualmente, em 10 repetições de 60 segundos e intervalo de 30 segundos, 7 dias por semanas durante 4 semanas. Os resultados indicaram que a cartilagem articular da pata imobilizada e posteriormente alongada mostrou celularidade aumentada sem mudança na espessura da cartilagem (RENNER et al., 2006).

Diante dos relatos acima, observa-se que os condrócitos são necessários para a homeostase da cartilagem e a perda ou disfunção celular pode ser um fator primário que leva à sua falha e assim as alterações na cartilagem. Por exemplo, o nível de celularidade da cartilagem determina o volume do tecido que está sendo mantido por um único condrócito e parece ter implicações para o reparo da cartilagem (LOTZ; LOESER,2012).

Durante o envelhecimento, a cartilagem articular também sofre alterações em sua estrutura molecular com algumas alterações semelhantes às observadas na degeneração associada à osteoartrite (OA) (ROBERTS et al,2016). Em termos de morfologia, defeitos de cartilagem relacionados à idade

ocorrem primeiro na zona superficial, em que a orientação e a organização das fibras de colágeno mudam e a espessura da cartilagem articular diminui com a idade (REN et al,2017). A densidade celular de condrócitos diminui com o envelhecimento e as células remanescentes expressam certas características da senescência celular, produzem quantidades reduzidas de MEC e aumentam os níveis de enzimas degradantes da matriz extracelular e mediadores inflamatórios (CARAMES et al,2015; MORIYAMA et al,2012). Em relação às propriedades mecânicas, a elasticidade diminui com a idade, e sua resistência à tração diminui significativamente (ROBERTS, et al,2019).

2.2.3 Osso

O osso é um material composto, cuja matriz extracelular consiste em matriz mineral (65%), água (10%), lipídios (1%) e material orgânico (25%). A matriz orgânica é composta predominantemente por colágeno 1 (90%) e por proteínas não colagenosas (10%). As células que produzem, nutrem e remodelam a matriz extracelular mineralizada respondem aos sinais mecânicos que determinam as propriedades morfológicas e funcionais dos ossos, assim, a sua composição relativa varia com a saúde e a doença, localização do tecido e idade (BOSKEY; COLEMAN, 2010).

O osso é organizado em nível macroscópico em estrutura cortical e trabecular; em nível microscópico é composto por células, matriz e minerais, e em nível nanométrico, é formado por cristais individuais e fibrilas de colágeno (BOSKEY; COLEMAN, 2010). Aproximadamente 80% da massa óssea está no compartimento cortical. No compartimento trabecular, 20% do volume é composto de osso, e o espaço restante é preenchido com medula e gordura. O osso trabecular transfere cargas mecânicas da superfície articular para o osso cortical, e portanto, ambos os ossos cortical e trabecular são importantes para a força óssea (OTT, 2018).

As propriedades mecânicas do osso e, portanto, a capacidade dos ossos em resistir as fraturas são definidas pela quantidade, disposição adequada e características de cada um dos componentes ósseos, ou seja, pela quantidade e qualidade. O termo qualidade se refere aos fatores como a composição

(porcentagem de cada componente), mineralização (organização e tamanho do mineral), conteúdo de colágeno e suas ligações cruzadas de colágeno, morfologia, microarquitetura, e a presença de microfissuras (SEEMAN, 2002; OZCIVICI et al., 2010).

São vários os componentes celulares no osso. Os condrócitos, são responsáveis pela deposição da placa de crescimento e sua posterior remodelação enquanto os osteoblastos sintetizam a matriz óssea e facilitam o processo de mineralização e os osteócitos respondem à carga mecânica e regulam a reabsorção e formação óssea (BOSKEY; COLEMAN, 2010; ZHANG et al., 2019).

Portanto, o osso é um órgão dinâmico com capacidade de se adaptar ao seu ambiente mecânico. O processo de adaptação óssea é controlado por osteócitos mecanossensíveis, que detectam sinais mecânicos impostos ao osso e, orquestram a atividade e o recrutamento de osteoblastos e/ou osteoclastos (HEMMATIAN et al., 2017).

A mecanotransdução é o processo pelo qual as forças físicas são convertidas em sinais bioquímicos que promovem respostas celulares e desempenha um papel crucial no reparo e regeneração óssea. A natureza do estímulo mecânico é importante na regulação da remodelação óssea, uma vez que diferentes tipos de estímulos mecânicos resultam em respostas diferentes. (SPYROPOULOU; BASDRA, 2013).

A remodelação óssea inicia com os osteoclastos realizando a reabsorção óssea e produzindo sinais para o início da síntese óssea, que é realizada pelos osteoblastos. Na remodelação óssea, a formação e reabsorção óssea estão intimamente relacionadas e interligadas (SPYROPOULOU; BASDRA, 2013). Tendo em vista que o estímulo local primário para remodelação óssea se origina da resposta dos osteoblastos e osteócitos às cargas mecânicas, essas respostas são geradas dentro da matriz óssea. O estímulo mecânico interage com influências sistêmicas para orquestrar a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, a fim de manter localmente a integridade funcional do osso (GALEA et al., 2017; HEMMATIAN et al., 2017).

A remodelação óssea é um processo estritamente regulado, e amplamente modulado pela aplicação de diferentes estímulos mecânicos ou por

estresse metabólico no osso. A síntese óssea é promovida por aplicação de carga dinâmica e não estática e aplicações de carga em curto prazo são suficientes para o início da resposta adaptativa e levam ao aumento da formação óssea, enquanto redução de carga resulta em diminuição da síntese óssea e aumento da reabsorção. Além disso, a manutenção do mesmo estímulo mecânico resulta em diminuição da resposta (SPYROPOULOU; BASDRA, 2013).

Seja durante o desenvolvimento ou envelhecimento, a forma do osso se modifica em resposta à carga, bem como sinais hormonais e de fatores de crescimento. No indivíduo saudável, a formação e a reabsorção óssea estão em um estado de equilíbrio, com as variações na morfologia óssea ocorrendo como consequência de mudanças no equilíbrio entre a formação óssea e a remodelação óssea (BOSKEY; COLEMAN, 2010; HEMMATIAN et al., 2017).

Declínios relacionados à idade nas propriedades materiais do tecido ósseo são acompanhados por uma redistribuição do osso cortical e trabecular. Especificamente no esqueleto apendicular, essas alterações envolvem reabsorção endosteal dentro do osso combinada com aposição periosteal na superfície externa. Isso leva a um aumento relacionado à idade no diâmetro dos ossos longos, mas a uma diminuição na espessura cortical, no entanto, esse aumento no diâmetro externo ajuda a manter a resistência às cargas de curvamento e torção (MARTIN; CORREA, 2010).

Um estudo verificou as diferenças relacionadas à idade nos parâmetros estruturais corticais e trabeculares da tíbia, por meio da tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT), tendo sido observada a dependência da idade apenas nos parâmetros corticais em homens e mulheres (MILOVANOVIC et al., 2014).

Outro estudo examinou a geometria da tíbia e da fíbula em diferentes faixas etárias, comparando um grupo de homens jovens (23-31 anos) com dois grupos de homens idosos (61-60 anos e 80-91 anos). Foram avaliadas por meio de ressonância magnética a área de secção cortical, medular e total da tíbia e fíbula em todos os cortes, com diferenças significativas na geometria óssea entre as faixas etárias. Na secção proximal, a área cortical da tíbia foi menor tanto nos idosos quanto nos mais velhos em comparação aos jovens, mas foi semelhante

entre idosos e muito idosos. Na fíbula, a área de secção cortical foi semelhante em todos os grupos. A área de secção medular foi maior nos muito idosos do que jovens na tíbia, e maior nos muito idosos em comparação aos jovens e idosos na fíbula. A área de secção total foi semelhante entre as faixas etárias nos dois ossos (MCNEIL et al., 2009).

A morfologia óssea também foi verificada em ratos machos, com idade entre 2 e 30 meses, tendo sido observado que a densidade mineral óssea da metáfise de fêmur, tíbia e úmero decresce com a idade, com as mudanças relacionadas à idade semelhante ao que ocorre com o osso humano. As faixas etárias de 6-21 meses mostraram maior densidade mineral óssea da tíbia e fêmur, decrescendo com o avançar da idade. Foi observado que após 12 meses, a densidade mineral óssea reduziu na tíbia, mas não foi alterada no fêmur. As mudanças relacionadas à idade na densidade mineral óssea de ossos longos são devidas às mudanças na região sub-cortical e não são acompanhadas por decréscimo na densidade cortical e trabecular (LIDA; FUKUDA, 2002).

Outro estudo do mesmo grupo analisou alterações relacionadas à idade na densidade mineral óssea e na área de secção transversal do osso trabecular e cortical e índice de força óssea do fêmur, tíbia, úmero e primeira vértebra lombar em ratos Wistar fêmeas, com idade entre 2-33 meses, examinadas por tomografia computadorizada (pQCT). Foi observado que a densidade mineral óssea das metáfises e diáfises dos ossos longos aumentaram até os 12 meses e diminuíram após os 15 meses na tíbia e fêmur. No entanto, os valores da área de seção transversal do osso trabecular e cortical e índice de força óssea do fêmur dos ossos longos aumentaram independentemente da diminuição da densidade mineral óssea total com a idade, indicando que esse aumento pode ter sido devido a uma característica do padrão de modelagem em ratos. Ainda, os autores indicam que nesta linhagem, os ratos com mais de 12 meses são úteis como modelo animal para experimentos de osteoporose e observação de alterações ósseas senis (FUKUDA; IIDA, 2004).

A atividade física também é um fator importante para a manutenção da massa óssea, pois idosos que são menos ativos fisicamente são mais propensos a desenvolver sarcopenia, osteoporose e aumentar o risco de fraturas (FERRUCCI et al., 2014). O exercício físico pode afetar o osso através de

múltiplos mecanismos, incluindo as forças de contração muscular, carga gravitacional e efeitos endócrinos e parácrinos. Durante a atividade física, o osso é submetido a forças mecânicas exercidas pela contração muscular e carga gravitacional. No nível celular, os osteócitos reconhecem essas forças mecânicas como deformação celular, alterações no fluido extracelular, gradientes de pressão e campos elétricos e se comunicam com osteoblastos e osteoclastos para modular a formação e reabsorção óssea alterando assim geometria óssea e propriedades materiais (CARTER; HINTON, 2014). Por isso, o exercício tem sido proposto como uma estratégia potencial para gerenciar doenças ósseas como a osteoporose, pois o osso responde a cargas mecânicas preferencialmente de alta magnitude, frequência e com sustentação de peso (WATSON et al., 2018).

Sabe-se que o exercício aumenta a densidade mineral óssea, massa óssea, resistência óssea e propriedades mecânicas do osso, atuando direta ou indiretamente sobre quase todos os tipos de células ósseas, afetando muitos aspectos da remodelação óssea (ARAZI; EGHBALI, 2017). Para o treinamento físico desencadear um efeito osteogênico, a carga mecânica aplicada aos ossos deve exceder a encontrada durante as atividades diárias. Exercícios de impacto com peso, como saltos e saltos, e/ou exercício resistido progressivo, isoladamente ou em combinação, podem melhorar a saúde óssea em adultos (HONG; KIM, 2018).

Estudos envolvendo exercícios resistidos para gerenciar a massa óssea são conhecidos e relatam ganhos na DMO (CHODZKO-ZAJKO et al., 2009; WATSON et al., 2018; BASAT; ESMAEILZADEH; ESKIYURT, 2013). Um programa de exercício para prevenir a osteoporose e fraturas não está claramente definido, mas há um crescente corpo de evidências apoiando o papel de programas multimodais que incorporam breves episódios ou diversas atividades com impacto e sustentação de peso, exercícios de resistência progressiva visando músculos biarticulares do quadril e coluna e exercícios funcionais que desafiem o equilíbrio e atividades de mobilidade (DALY et al., 2018).

Os exercícios de alongamento são citados nos estudos realizados com pacientes com osteoporose e integram o período de resfriamento (ANGIN;

ERDEN, 2009; OTERO et al., 2017; WATSON et al., 2018), mas os efeitos osteogênicos desse tipo de exercício são pouco estudados.

O único estudo conhecido sobre o efeito do alongamento no tecido ósseo é um estudo de revisão que se concentrou no uso do sistema de tensão Flexercell como ferramenta para estudar as respostas celulares ao alongamento mecânico em diferentes tipos de células. Os resultados reportados no estudo indicaram que a sinalização do alongamento têm um efeito positivo na proliferação de osteoblastos e o fazem de uma forma dependente da magnitude (YU et al., 2016).

Portanto, a carga mecânica imposta ao osso assim como a idade são determinantes da massa e da geometria óssea. Sendo o alongamento passivo realizado com aplicação de força externa para alongar o músculo, investigar se essa força gera respostas osteogênicas é importante, já que não são conhecidos estudos que tenham avaliado o efeito do alongamento do músculo no osso. Ainda, o estudo com modelo animal envelhecido também é necessário, pois o alongamento muscular é rotineiramente prescrito para idosos incluindo idosos com doenças ósseas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Estudo experimental realizado com *Rattus Norvegicus Wistar* fêmeas com idade de 28 meses e 3 meses, conduzido para avaliar o efeito do alongamento passivo na histomorfometria do músculo sóleo, articulação talocrural e osso tibia. O estudo seguiu as diretrizes do Animal Research reporting of *in vivo* experiments (ARRIVE). As diretrizes ARRIVE foram desenvolvidas para melhorar o desenho, a análise e o manuscrito de investigação com animais maximizando a informação publicadas e minimizando estudos desnecessários (KILKENNY et al., 2010).

A escolha por animais do sexo feminino é imperativa para compreensão dos mecanismos de declínio físico relacionado à idade, porque a expectativa de vida das mulheres é maior que dos homens, um fenômeno mundial e denominado feminização do envelhecimento (OSTAN et al., 2016; HERNANDEZ et al., 2020).

O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (National Research Council, 1996), estando de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2008 e decreto nº 6.899/2009 e com as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle e Experimentação animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (protocolo nº 0992/2015) (Anexo 1) e Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Paraná (protocolo nº1103/2017) (Anexo 2).

3.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Grupo Experimental com Ratas Envelhecidas

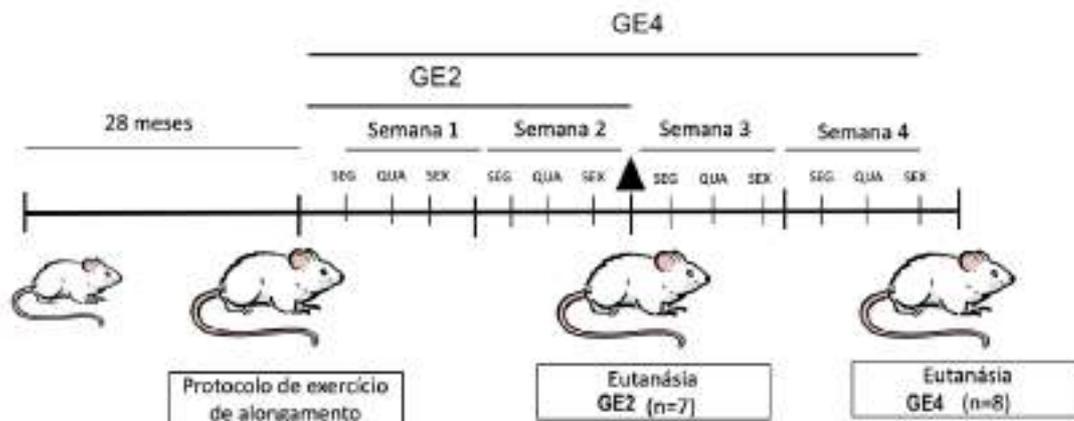
Foram utilizadas 28 *Rattus Norvegicus Wistar* albino fêmeas com 28 meses de idade, com peso corporal de $316,5 \pm 43$ g, obtidos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e mantidos no biotério da

Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico, agrupados em 4 animais por caixa e mantidos em gaiolas plásticas padrão forradas com serragem, sob condições ambientais controladas (luminosidade: ciclo claro/escuro 12/12 horas, temperatura $20 \pm 3^\circ\text{C}$), com livre acesso à ração peletizada e água.

Todos os animais foram submetidos ao protocolo de alongamento 3 vezes por semana. Foi registrada a perda amostral de 9 animais até o 12º dia do experimento (final da 2ª semana de protocolo), restando assim 19 animais, que randomicamente foram divididos em grupo ratas envelhecidas 2 semanas e grupo ratas envelhecidas 4 semanas, que foram alongadas por 6 ou 12 sessões, respectivamente. Os animais que foram selecionados para o grupo 2 semanas foram eutanasiados 24 horas após a última sessão de alongamento, ou seja, no 13º dia do experimento. Os motivos das perdas amostrais foram depressão respiratória seguida de parada respiratória e cardíaca.

Para a randomização, todos os animais foram numerados de 1 a 19 e utilizando uma tabela de números aleatórios, sete animais foram selecionados para o grupo 2 semanas e o restante foi alocado no grupo 4 semanas (THOMAS; NELSON; SILVERMAN, 2005). Sendo assim, o estudo foi composto por grupo ratas envelhecidas 2 semanas (GE2; $n=7$; $307,2 \pm 48,3\text{g}$) e grupo ratas envelhecidas 4 semanas (GE4; $n=12$; $309 \pm 28,2\text{g}$). Ao final das 4 semanas, 26º dia de experimento, o grupo 4 semanas teve perda amostral de 4 animais, por depressão respiratória seguida de parada respiratória e cardíaca durante a anestesia, totalizando 8 animais (GE4; $n=8$; $297,1 \pm 24,7\text{g}$) (Figura 1). A eutanásia do grupo 2 semanas ocorreu no 13º dia do experimento enquanto a eutanásia do grupo 4 semanas foi realizada no 27º dia do experimento, também 24 horas após o último alongamento.

FIGURA 1- LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO COM RATAS ENVELHECIDAS



As ratas foram submetidas a um protocolo de exercício de alongamento durante 2 (GE2) e 4 semanas (GE4), realizado em 3 sessões semanais (segundas, quartas e sextas). Cabeça de seta: momento da randomização (12º dia do experimento).

3.2.2 Grupo Experimental com Ratas Adultas

No experimento realizado com ratas adultas, com duração de 27 dias, foram utilizadas 25 *Rattus Norvegicus Wistar* albino fêmeas com 3 meses de idade, com peso corporal de $263,64 \pm 17,6$ g, obtidos do Biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR-PR) e mantidos no Biotério da mesma instituição, Campus Politécnico. Os animais foram agrupados em 4 animais por caixa e mantidos em gaiolas plásticas padrão forradas com serragem, sob condições ambientais controladas (luminosidade: ciclo claro/escuro 12/12 horas, temperatura $20 \pm 3^\circ\text{C}$), com livre acesso à ração peletizada e água. O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (National Research Council, 1996), estando de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2008 e decreto nº 6.899/2009 e com as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle e Experimentação animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (protocolo nº 0992/2015).

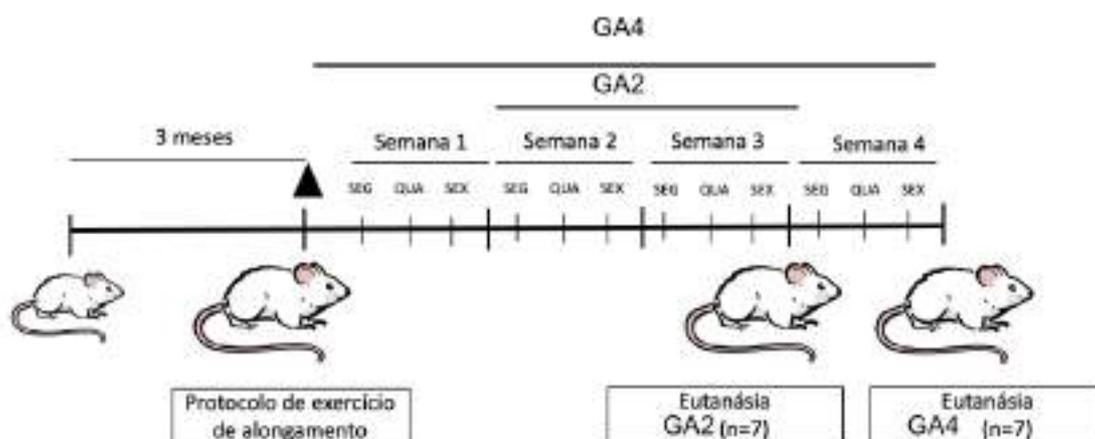
Os animais foram randomizados em dois grupos, grupo ratas adultas 2 semanas (GA2; n=13) e grupo ratas adultas 4 semanas (GA4, n=12). Para a randomização, os animais foram numerados de 1 a 25 e utilizando uma tabela de números aleatórios, 12 animais foram selecionados para o grupo 4 semanas e o restante foi alocado no grupo 2 semanas (THOMAS; NELSON; SILVERMAN,

2005). Sendo assim, o estudo inicialmente foi composto por grupo 2 semanas com 13 animais ($265 \pm 20,8g$) e grupo 4 semanas, com 12 animais ($262,1 \pm 14,1g$).

Os animais do grupo adultos 2 semanas foram submetidos à 6 sessões de exercício de alongamento passivo mecânico estático, com início no 8º dia do experimento. Ao final das 6 sessões, ou seja, 19º dia do experimento, foi registrada perda amostral de 6 animais, por depressão respiratória seguida de parada respiratória e cardíaca durante a anestesia, totalizando 7 animais (GA2; $n=7$, $254,4 \pm 18,5g$). A eutanásia do grupo 2 semanas ocorreu 24 horas a última sessão de alongamento, ou seja, no 20º dia do experimento.

Os animais do grupo jovem 4 semanas foram submetidos à 12 sessões de exercício de alongamento passivo mecânico estático, iniciando no 1º dia do experimento. Ao final das 12 sessões, ou seja, 26º dia do experimento, foi registrada perda amostral de 5 animais, por parada respiratória e cardíaca durante a anestesia, totalizando 7 animais (GA4; $n=7$, $251,2 \pm 16,7g$). A eutanásia do grupo 4 semanas ocorreu 24 horas a última sessão de alongamento, ou seja, no 27º dia do experimento (Figura 2).

FIGURA 2- LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO COM RATAS ADULTAS

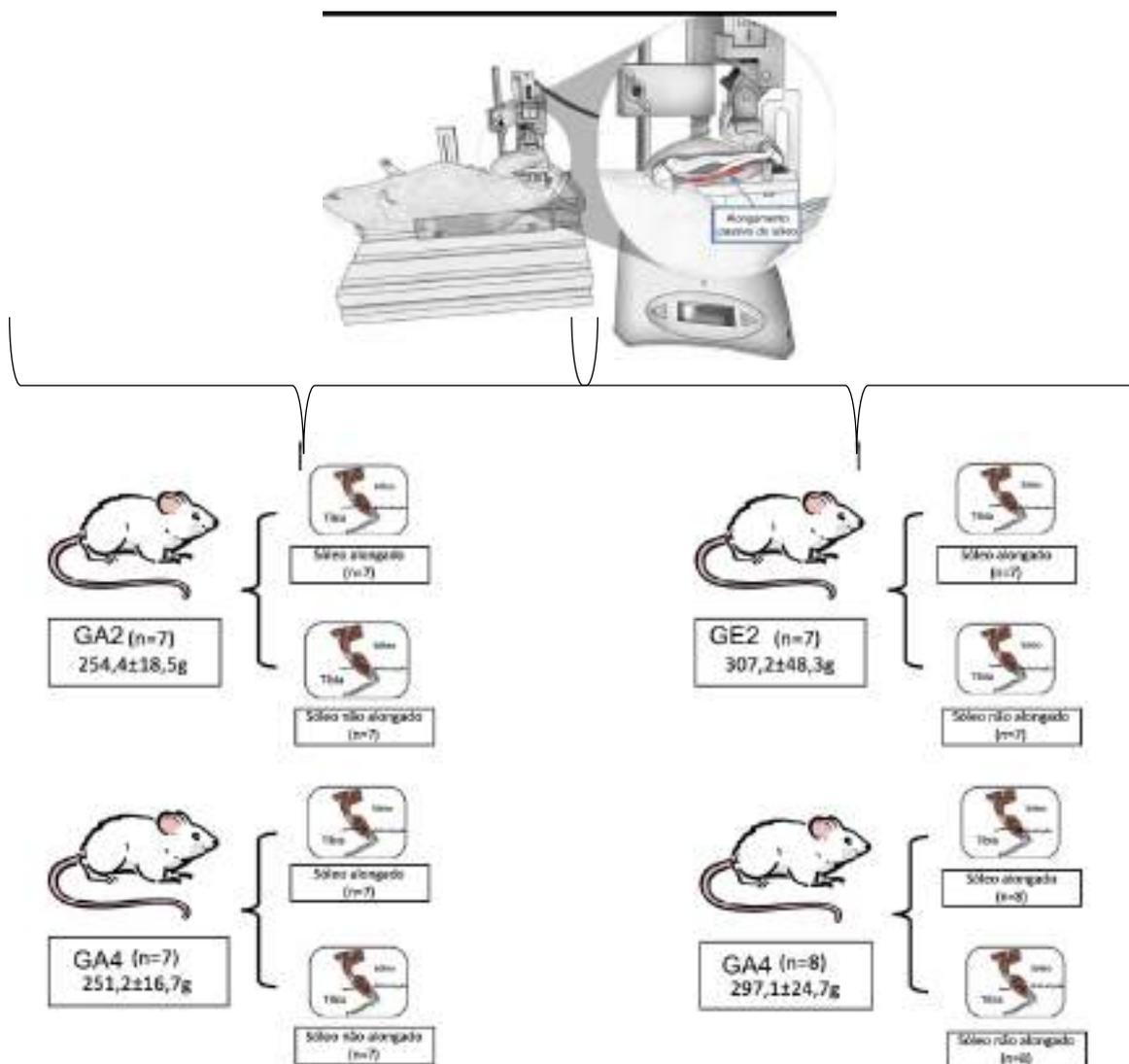


As ratas foram submetidas a um protocolo de exercício de alongamento durante 2 (GA2) e 4 semanas (GA4), realizado em 3 sessões semanais (segundas, quartas e sextas). Cabeça de seta: Momento da randomização (1º dia do experimento).

Todos os grupos foram submetidos ao protocolo de alongamento no membro pélvico esquerdo com o objetivo de promover o alongamento do músculo sóleo esquerdo, enquanto o membro pélvico contralateral não foi submetido a nenhum tipo de procedimento e assim, o músculo sóleo não

alongado (direito) foi avaliado para comparação, isto é, como controle não alongado. Ainda, os membros pélvicos direito e esquerdo também foram dissecados para análise histomorfométrica da articulação talocrural e da tíbia (Figura 3).

FIGURA 3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS



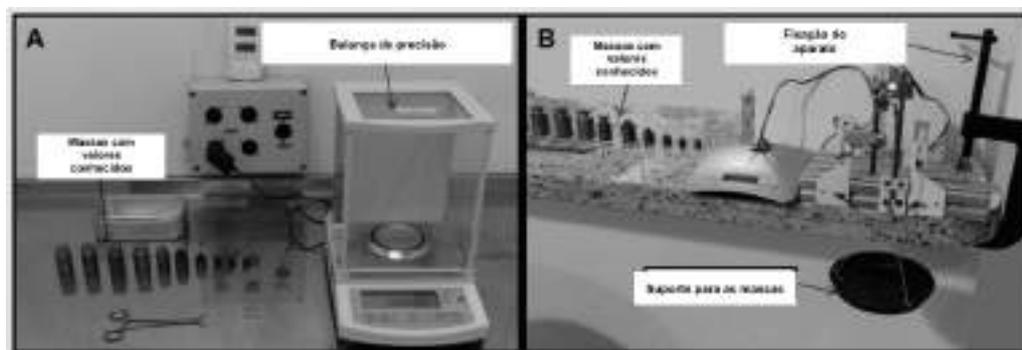
GA2: Grupo adultos 2 semanas. GA4: Grupo adultos 4 semanas. GE2: grupo envelhecidas 2 semanas. GE4: grupo envelhecidas 4 semanas.

3.3 PROTOCOLO DE ALONGAMENTO

A célula de carga usada para medir a força aplicada para alongar o músculo foi calibrada previamente conforme (ZOTZ et al., 2019). A célula de

carga faz a leitura em gramas, com valor máximo da leitura de 1.090 gramas e para o procedimento da sua calibração foram utilizadas massas cuja grandeza era conhecida. Inicialmente, as massas foram aferidas sete vezes em balança de precisão (Denver Instrument XL410), e foi realizado cálculo da média para verificar a fidedignidade da leitura da célula de carga do aparato. Por a célula de carga estar em pêndulo, foi colocado um recipiente pendurado para que as massas pudessem ser aferidas e o aparato foi fixado na bancada para garantir sua estabilidade durante a aferição. Uma massa por vez foi adicionada no recipiente, e o valor de leitura da célula de carga foi registrado a cada inserção até que todas as massas fossem incluídas no recipiente, a partir disso, estas foram retiradas, também uma por vez, da última para a primeira e, igualmente foram anotados os valores de leitura da célula de carga. O procedimento foi repetido cinco vezes e os equipamentos utilizados para tal estão apresentados na figura 4.

FIGURA 4 - CALIBRAÇÃO DA CÉLULA DE CARGA DO APARATO

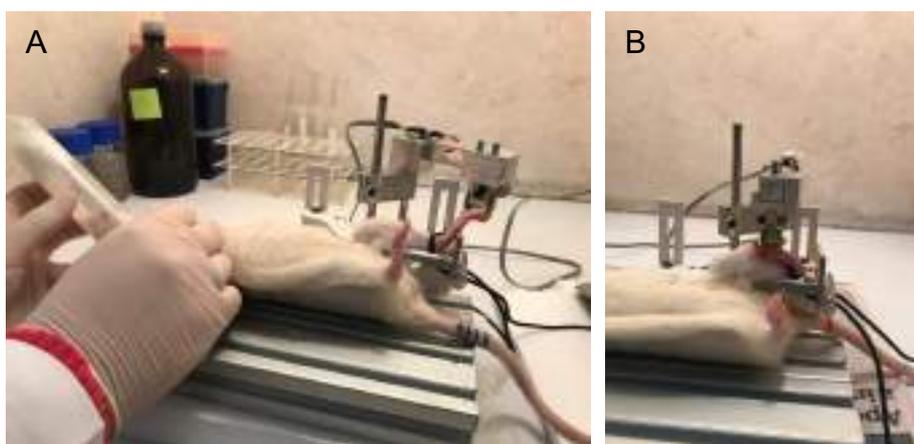


A: Calibração das massas com balança de precisão. B: Calibração da célula de carga do aparato. Traduzido de ZOTZ et al (2019).

Para alongamento passivo mecânico do músculo sóleo esquerdo, o animal foi previamente pesado (utilizando balança Mettler/Toledo, Curitiba, Paraná) e anestesiado por via inalatória (Halotano para indução e para manutenção (Figura 5-A). Após o procedimento de alongamento, o animal foi posicionado em bolsa de água aquecida para restauração e recuperação da temperatura corporal. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em um laboratório com ar-condicionado, dentro da capela de exaustão, sempre pela manhã.

O animal foi posicionado no aparato de alongamento (ZOTZ et al., 2019) com a articulação do joelho a 90° de flexão e articulação talocrural em flexão dorsal máxima para alongamento do músculo sóleo esquerdo (Figura 5-B). A força aplicada durante o alongamento passivo mecânico estático foi monitorada por uma célula de carga, acoplada ao aparato de alongamento, e registrada em newtons.

FIGURA 5 - PROTOCOLO DE ALONGAMENTO UTILIZANDO O APARATO



A: Procedimento anestésico inalatório. B: Posicionamento da rata no aparato para realização do alongamento passivo estático mecânico do músculo sóleo. Fonte: Autores (2020)

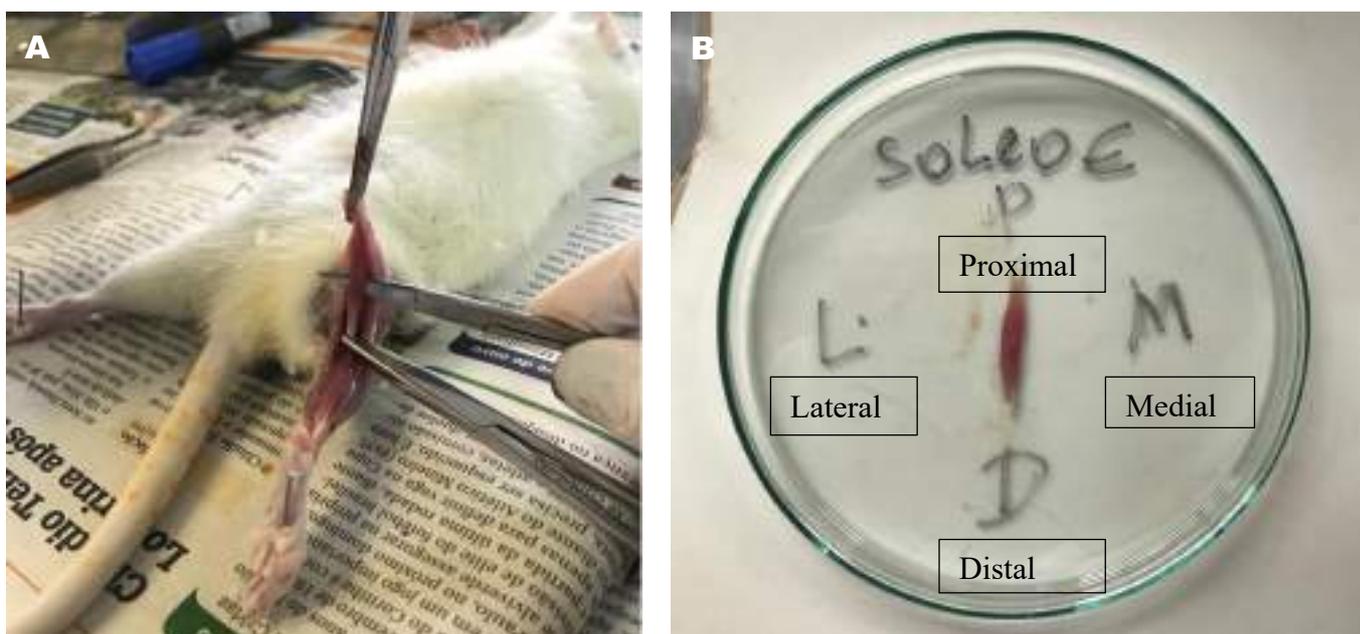
O músculo sóleo foi escolhido por ser um músculo postural e por cruzar apenas a articulação talocrural de maneira a reduzir vieses em outras articulações não investigadas no presente estudo. Além disso, os cortes histológicos foram retirados do ventre médio do músculo, por conter todos os tipos de fibras musculares (BROWN; FISHER; SALSICH, 1999; GOMES et al., 2007).

O protocolo de alongamento consistiu em uma série de 4 repetições (KERRIGAN et al., 2003; GALLON et al., 2011) de 60 segundos cada (FELAND et al., 2001), com um intervalo de 30 segundos entre cada repetição (STAUBER; WILLEMS, 2002; KERRIGAN et al., 2003), controlado por um cronômetro (*Technos*®), totalizando volume de 240 segundos de alongamento por sessão. O protocolo de alongamento foi realizado uma vez ao dia pela manhã, três vezes por semana, com um dia de intervalo entre cada sessão de alongamento, por um período de duas ou quatro semanas.

3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E DISSECAÇÃO MUSCULAR E ÓSSEA

Vinte e quatro horas após a última sessão do alongamento, os animais foram anestesiados com ketamina (95mg/kg) e xylazina (12mg/kg) para a retirada dos músculos sóleos de ambas as patas. Após uma incisão longitudinal ampla da pele do membro pélvico, a mesma foi rebatida a fim de expor o músculo gastrocnêmio. Em seguida, o tendão calcâneo foi seccionado e o músculo gastrocnêmio rebatido para acesso ao músculo sóleo (Figura 6-A). Na sequência, o músculo sóleo foi coletado (Figura 6-B), pesado e mensurado longitudinalmente, utilizando um paquímetro (Vonder®). Após a dissecação, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica.

FIGURA 6 - DISSECAÇÃO DO MÚSCULO SÓLEO

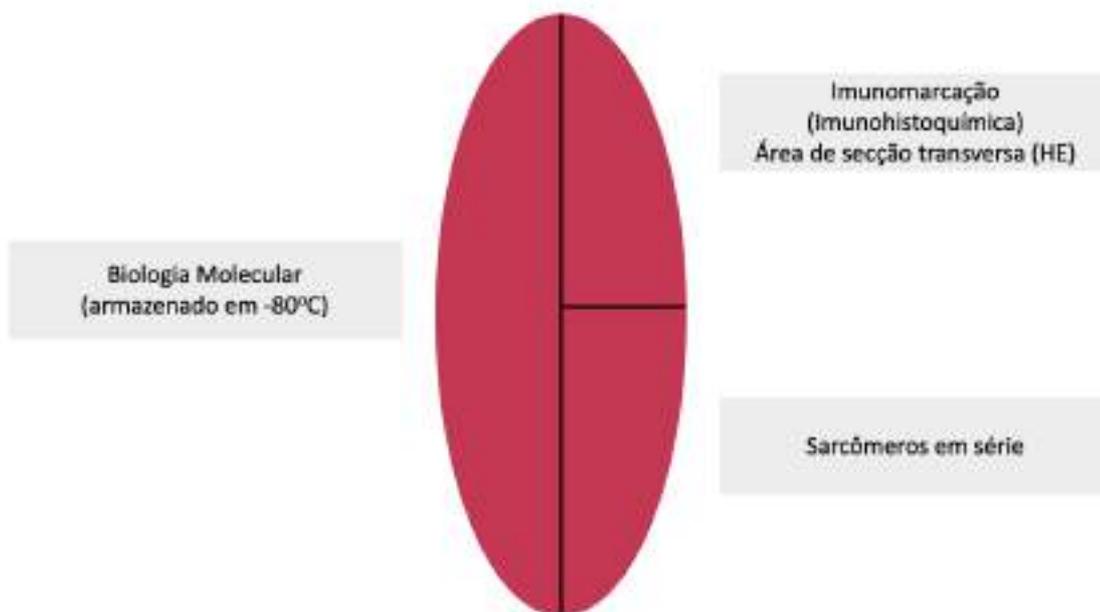


A: Acesso ao músculo sóleo direito. B: Músculo sóleo esquerdo dissecado. Fonte: Autores (2020)

Em seguida, o músculo sóleo foi dividido longitudinalmente com lâmina (Feather) ao meio, sendo que a metade da sua porção medial foi dividida em duas porções (proximal e distal) (Figura 7). A porção proximal foi destinada para análise da área de secção transversa da fibra muscular e imunohistoquímica e a porção distal foi fixada em glutaraldeído (2,5%) e em seguida submetida aos procedimentos de rotina para avaliação do número de sarcômeros em série. A

porção lateral foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80° para posterior análise molecular.

FIGURA 7 - DESENHO ESQUEMÁTICO DAS SECÇÕES REALIZADAS NO MÚSCULO SÓLEO



Para cada porção do músculo sóleo esquerdo seccionado, está descrito ao lado o tipo de processamento realizado. Imunohistoquímica e área de secção transversa das fibras musculares: os mesmos cortes histológicos processados para imunohistoquímica foram utilizados para a mensuração da AST das fibras musculares; Sarcômeros em série: porção destinada ao processamento para a contagem do número de sarcômeros em série; Biologia Molecular: porção destinada à avaliação da expressão gênica foi armazenada em freezer -80°C. Fonte: Autores (2020)

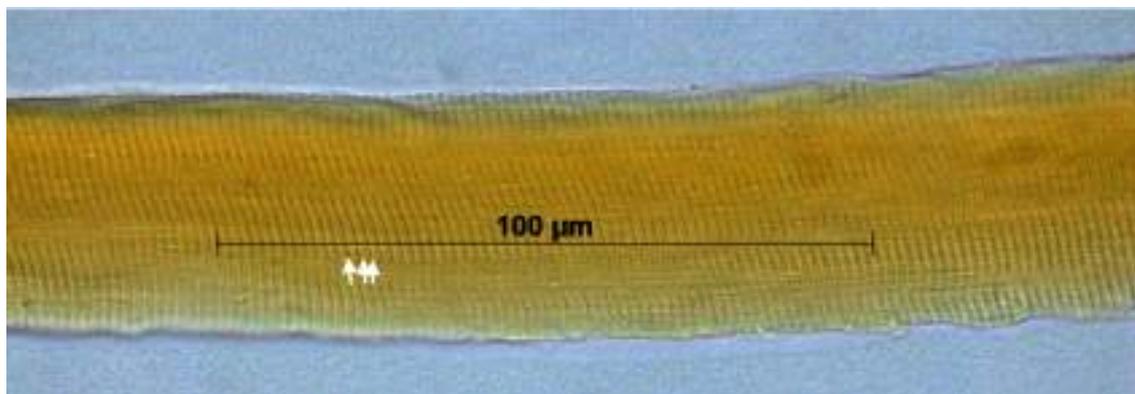
Os membros pélvicos direito e esquerdo foram então dissecados e fixados em formol 10% para análise da articulação talocrural e da tíbia. Todos os procedimentos realizados nesse estudo estão descritos na sequência.

3.5 PROCEDIMENTOS PARA IDENTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE

Após a dissecação, o tecido muscular ficou submerso em glutaraldeído 2,5% por 3 horas, removido e imerso em ácido nítrico 30% por 2 dias e armazenado em glicerol 50%. Os fragmentos musculares estocados em glicerol a 50% foram colocados em placa de Petri e, com auxílio de lupa e utilizando fibras ultrafinas (Roney), 10 fibras musculares foram individualizadas e fixadas em lâminas histológicas e protegidas por uma lamínula para posterior observação em

microscópio de luz (Scope A.1 Carl Zeiss), em objetiva de 100X com óleo de imersão (Merck). Com o software AxionVision, Zeiss, sob a objetiva de imersão 100X e com a régua de calibração de 100 μm , foram realizadas 3 fotos de cada fibra para totalizar 300 μm , tendo sido utilizadas 5 fibras por animal, considerando as fibras de melhor qualidade, isto é, com menor número de artefatos e que permitissem a visualização para contagem dos sarcômeros em série. Na sequência, foram contabilizados o número estriações presentes em uma distância de 100 μm (Figura 8) nas mesmas 5 fibras musculares de cada preparação, para obtenção do número de sarcômeros em série no intervalo de 300 μm por animal. Portanto, 3 distâncias de 100 μm foram contabilizadas, para totalizar 300 μm . Para estimativa do número de sarcômeros em série em todo o comprimento muscular foi realizado o cálculo considerando o comprimento total mensurado no momento da dissecação com o paquímetro digital (Vonder) (WILLIAMS; GOLDSPIK, 1971).

FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA (100X EM IMERSÃO) DE FIBRA ISOLADA DE MÚSCULO SÓLEO DE RATA, PREPARADA PARA CONTAGEM DO NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE.



Traçado preto representa 100 μm , indicando a região na qual foram contados os sarcômeros em série. Seta indica a unidade que foi contada, considerada como sarcômero. Fonte: Autores (2020)

3.6 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As lâminas confeccionadas com corte histológico transversal do músculo sóleo e coradas com hematoxilina- eosina foram confeccionadas no Laboratório de Patologia da PUCPR e seguiram o protocolo do laboratório.

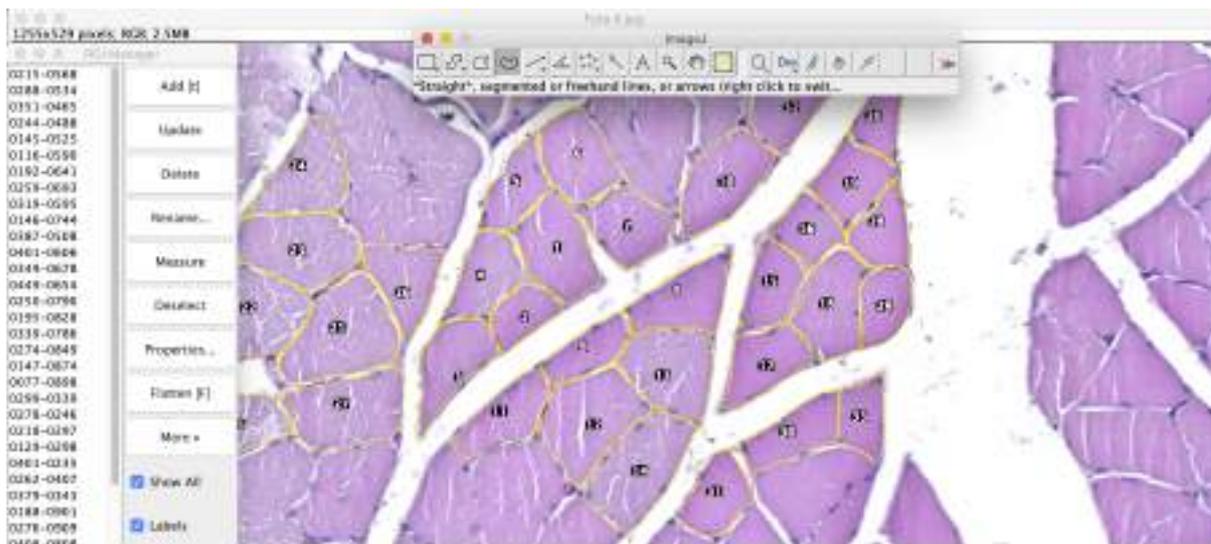
A porção medial do músculo sóleo foi fixada em formalina 10% durante 72h. Posteriormente, os fragmentos musculares foram clivados transversalmente, identificados e colocados em cassete histológico. Os fragmentos foram desidratados e diafanizados, seguindo o protocolo: álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100% e 100% por 1h em cada concentração do álcool; e xilol (I, II e III) por 1 hora cada. Na sequência, foram banhados em parafina líquida I, II e III por 1 hora cada. Todos os procedimentos foram realizados automaticamente pelo aparelho Leica TP 1020. Após esse processo, o material foi emblocado em parafina utilizando o inclusor Leica EG 1160. Finalizada a inclusão de parafina, o material foi seccionado transversalmente em micrótomo (Leica RM 2145), a 4 µm, e os cortes foram posteriormente transferidos para lâminas histológicas (Starfrost®Sakura 76 X26 mm).

As lâminas, contendo os cortes transversais do músculo sóleo, foram desparafinizadas por 3 vezes, em solução de xilol 100 % durante o tempo de 5 minutos cada. Foram então mergulhadas em álcool absoluto, 3 vezes por 1 minuto cada. Após foram mergulhadas em água de torneira por 5 minutos. As lâminas foram deixadas por 8 minutos na Hematoxilina de Harris (Biotec) e em seguida lavadas em água de torneira. Na sequência, foram imersas em água por 5 minutos e em seguida mantidas por 5 min na eosina (0,25 g de eosina amarela em pó diluída em 100 ml de água destilada). Na sequência, as lâminas foram lavadas em água de torneira e deixadas por 1 min em álcool 95%. Após isso, as lâminas passaram por 3 ciclos de álcool absoluto com duração de 1 minuto cada ciclo. Em seguida as lâminas passaram por 3 ciclos de xilol com duração de 1 min cada ciclo. Ao término das etapas descritas anteriormente, foram adicionadas lamínulas (Solidor, 24 X 6 mm) às lâminas, fixadas com Entellan (Merck).

As lâminas histológicas com cortes transversais corados com HE foram escaneadas pelo scanner automatizado de slides para microscopia de campo claro (Axio Scan.Z1®, Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany). Posteriormente, por meio do software de edição Zen 2.3 Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany), o corte selecionado foi focalizado em objetiva de 10X e desmembrado em imagens. Posteriormente, as imagens foram transferidas para um computador, onde 100 fibras foram selecionadas de modo

aleatório (Figura 9), na região central da secção histológica e a área de secção transversa de cada fibra foi mensurada através do Software ImageJ (VERSÃO 1.51, USA) (ZOTZ et al., 2016).

FIGURA 9 - CORTE HISTOLÓGICO TRANSVERSAL DO MÚSCULO SÓLEO EM OBJETIVA DE 10X CORADO COM HE PARA ANÁLISE DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DA FIBRA MUSCULAR (ASTFM)



Mensuração da área de secção transversa da fibra muscular utilizando o software *ImageJ* (Versão 1.51, USA). A imagem apresenta a visão do avaliador ao utilizar o Software *ImageJ* para mensuração da ASTFM. A janela aberta é referente a janela de ferramentas do Software. Os números indicam as fibras musculares que manualmente foram selecionadas pelo recurso *freehand* do software. RGB: Red, Green, Blue. MB: Megabyte. Fonte: Autores (2020)

3.7 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas de imunohistoquímica confeccionadas com corte histológico transversal do músculo sóleo foram confeccionadas no Laboratório de Patologia da PUCPR e seguiram o protocolo do laboratório.

Os anticorpos primários específicos para a reação imunohistoquímica foram: Rabbit Polyclonal Anti-Human Transforming Growth Factor beta1 (1:100), Spring Science, Pleasanton, California, EUA; Rabbit Polyclonal Collagen Type I, AB34710 (1:200), Abcam, Cambridge, MA, USA; Rabbit Polyclonal Collagen Type III, AB7778 (1:200), Abcam, Cambridge, MA, USA; e Mouse Monoclonal Antibody TNF α , sc-52252 (1:100), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany. Os controles positivos e negativos foram realizados por omissão de anticorpo primário.

A técnica imunohistoquímica empregada foi o sistema de detecção livre de biotina (REVEAL). Os cortes de tecido com 4 μ foram desparafinizados em xilol em temperatura ambiente (2 x 10 min); álcool etílico absoluto (3 x 1 min); álcool etílico 80% (1 x 1 min). Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 5% e lavado na sequência em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com o recuperador Imuno Retrifer (Dako®) em cuba de banho-maria à 99° C por 25 min. Após retiradas da etapa de banho maria, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente, lavadas com água destilada e em seguida a área do corte foi delimitada com a caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®).

As lâminas permaneceram em tampão TBS (tampão fosfato-salino) Tris pH 7.3, até que as alíquotas de anticorpo fossem gotejadas, evitando a secagem do corte. Os anticorpos primários foram diluídos conforme a diluição ótima, gotejados sobre os cortes e incubados em câmara úmida entre 2 e 8° em geladeira, overnight. Após esse período os cortes foram novamente lavados em TBS Tris pH 7,3, secas e então administrado o Kit de revelação *Spring® Reveal Polyvalent HRP*, que consiste em aplicar o *Spring Reveal Complement* o qual é incubado por 10 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em tampão e após isso, foi aplicado o *Spring Reveal Conjugate*, por 15 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, após nova lavagem com tampão, o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB líquido 1:1) foi adicionado às lâminas até a visualização da cor castanha. A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem em água destilada, seguidas de contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Os cortes passaram pela bateria crescente de álcool e por xilol e foram montados em resina Histolan®.

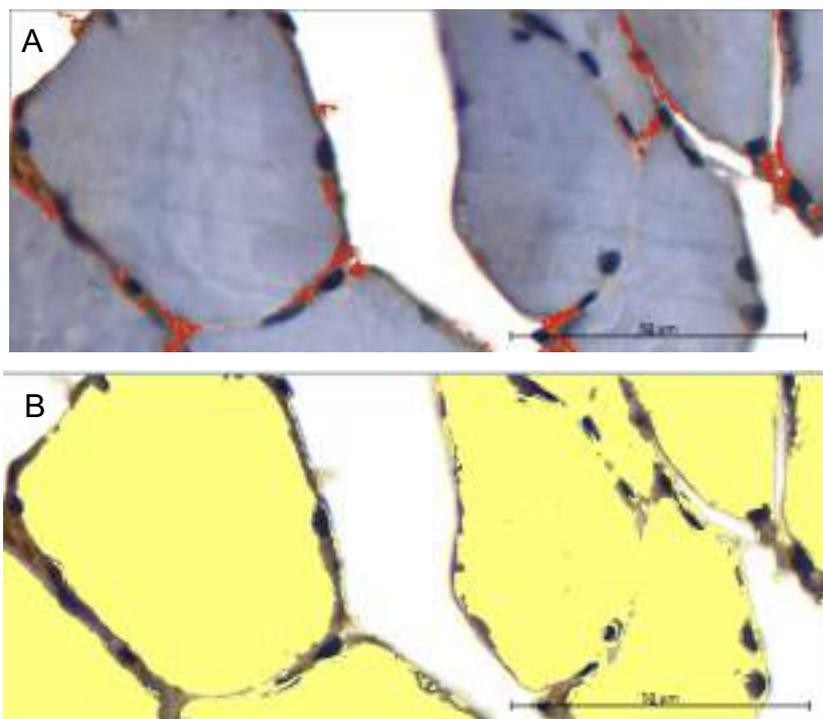
Após a marcação dos quatro anticorpos em cada grupo, as lâminas foram escaneadas pelo scanner automatizado de slides para microscopia de campo claro (Axio Scan.Z1®, Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany). Posteriormente, por meio do software de edição Zen 2.3 blue edition (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany), o corte selecionado foi focalizado em objetiva de 40X e desmembrado em imagens. Cinco imagens que continham menos artefatos e uma quantidade maior de fibras foram então selecionadas. As imagens foram analisadas pelo método morfométrico quantitativo utilizando o

software Image Pro Plus® (versão 4.5, Rockville, EUA). O observador forneceu uma amostra da coloração castanha considerada positiva para o programa, para assim permitir a quantificação do colágeno I, colágeno III, TGFβ-1 e TNF-α. Esta fotomicrografia passou a ser a “máscara”. A “máscara” foi sobreposta em cada lâmina histológica fotografada, e o programa automaticamente quantificou a totalidade da área imuno-positiva, identificando o grau de coloração castanha previamente padronizado. Ainda, com o programa Image Pro Plus®, foi determinada a área da fibra muscular e assim, identificada a porcentagem de imunomarcação por área de fibra muscular total (ZOTZ et al., 2016).

Em uma planilha do programa Excel, a porcentagem de imunomarcação foi obtida por meio da fórmula: % de imunomarcação = Área imuno-positiva/tecido total (área imuno-positiva+área imuno-negativa) x 100 (ZOTZ et al., 2016) (Figura 10).

Para excluir qualquer influência da área das fibras musculares, foi calculada a área total de fibras musculares de cada campo para cada amostra usando o programa *Image Pro Plus*, e assim, na análise foi considerada a porcentagem de imunomarcação pelo colágeno 1, colágeno 3, TGFβ-1 e TNFα (ZOTZ et al., 2016).

FIGURA 10 - AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE IMUNOMARCAÇÃO POR ÁREA DE FIBRA MUSCULAR



Corte transversal do músculo sóleo. Técnica de imunohistoquímica. A: Máscara para análise da imunomarcação em que a cor vermelha demonstra a imunopositividade. B: Máscara para mensuração da área da fibra muscular em que a cor amarela demonstra a área total de tecido muscular.

3.8 ANÁLISE DO TECIDO NÃO CONTRÁTIL INTRAMUSCULAR

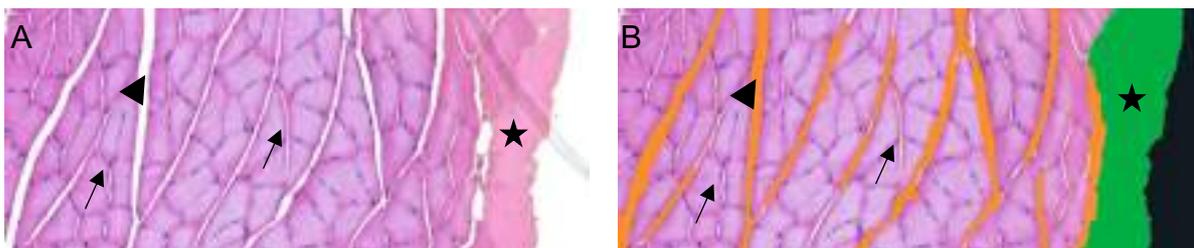
Para a mensuração do tecido não contrátil intramuscular foi utilizada a porção proximal e medial do músculo sóleo para avaliação. O músculo foi fixado em solução de formalina a 10%, embocado em parafina, e seccionado transversalmente (4µm) em micrótomo (Olympus) e corada com hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas histológicas com cortes transversais corados com HE foram escaneadas pelo scanner automatizado de slides para microscopia de campo claro (Axio Scan.Z1®, Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany). Posteriormente, por meio do software de edição Zen 2.3 Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany), o corte selecionado foi focalizado em objetiva de 10X e desmembrado em imagens. Foram considerados os seguintes critérios para escolha das imagens: aquelas que incluíram epímísio, perímísio e

endomísio; campos livres de artefatos, dobras, fissuras, como descrito por Kurose et al. (2006) e Massenz et al (2020).

A coloração das estruturas de epimísio e perimísio foi realizada utilizando o software Phothoshop CS6 Portable (versão 13.0, BRA) (MASSENZ et al.,2020) Figura 11-A. As estruturas do epimísio e perimísio foram coradas com diferentes cores (pantones verde 354C e laranja 715C, respectivamente) Figura 11-B. O endomísio, tecido conjuntivo que envolve cada unidade de fibra muscular como descrito por Kurose et al. (2006) e Murphy & Ohlendieck (2016), não foi marcado manualmente. A cor branca de fundo da fotomicrografia foi usada para criar a máscara para mensuração da área do endomísio (Figura 11B) (MASSENZ et al.,2020). A mensuração da área delimitada por cada cor na imagem foi realizada no Software Image Pro Plus 4.5.

FIGURA 11 - PORCENTAGEM DE TECIDO NÃO CONTRÁTIL EM RELAÇÃO À ÁREA DA FIBRA MUSCULAR



Fotomicrografia de corte transversal do músculo sóleo, corado com hematoxilina e eosina (HE), objetiva 10x. (A) Fotomicrografia antes da edição. (B) Fotomicrografia após marcação do epimísio e perimísio (pantones verde 354C e laranja 715C, respectivamente) e coloração de fundo preto. Epimísio (estrela); perimísio (cabeça de seta); endomísio (setas).

3.9 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO DO TORNOZELO

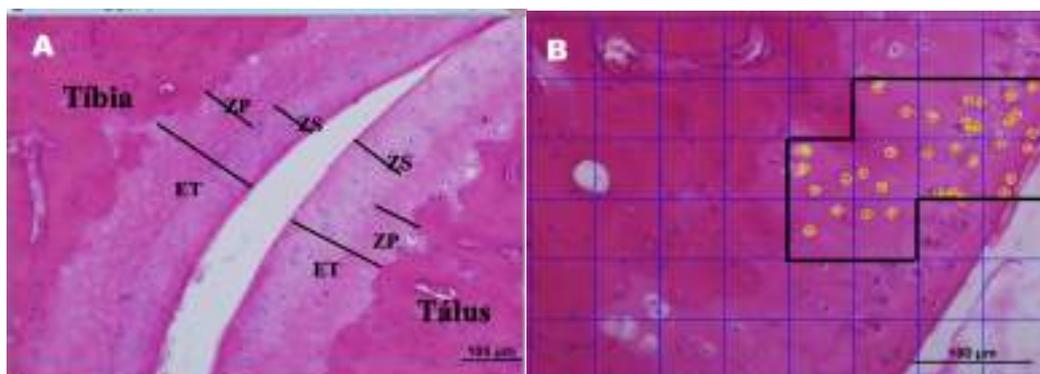
Os procedimentos realizados para preparo do material e análise histomorfométrica da cartilagem foram realizados conforme (KUNZ et al., 2015; SIMAS et al., 2015)

As articulações talocrurais do membro pélvico alongado e não alongado, foram lavadas em água destilada e descalcificadas em ácido tricloroacético (TCA) a 5% por aproximadamente 5 dias. As amostras foram desidratadas por 1 hora e meia nos álcoois 70,80 e 90% e no 95%, overnight. No dia seguinte, as amostras foram banhadas em álcool 100%.

Na sequência, o material foi diafanizado e incluído em parafina para posteriormente ser realizado a microtomia com cortes de 7 μm em micrótomo Olympus CUT 4055, e a coloração das lâminas em hematoxilina e eosina (H/E), para análise morfológica geral do tecido e análise da cartilagem articular. O protocolo de mensuração da espessura da cartilagem articular e do número de condrócitos foi baseado no estudo de Kunz et al (2015). Foram identificados três campos de interesse na cartilagem articular na extremidade da tíbia e do tálus: P1 correspondente à extremidade articular anterior (próxima as falanges); P2, correspondente à região média da articulação e P3, correspondente à extremidade articular posterior. Essas áreas de interesse foram fotomicrografadas em aumento de 200 vezes e com o programa Image Pro Plus 6.0, foi mensurada a espessura total da cartilagem nos três pontos. Também, foi mensurada a espessura da zona superficial e zona profunda da cartilagem articular (Figura 12-A)

Para contagem do número de condrócitos foi escolhida uma área de interesse (retângulo de 100 μm de profundidade por 200 μm de comprimento), que foi sobreposta aos 3 pontos de análise (Figura 12-B).

FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIA DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL



A: Imagem mostrando a mensuração da espessura total (ET), zona profunda (ZP) e zona superficial (ZS) da cartilagem articular da tíbia e tálus. B: Contagem manual de condrócitos (CO). Corte sagital, coloração HE.

3.10 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA TÍBIA

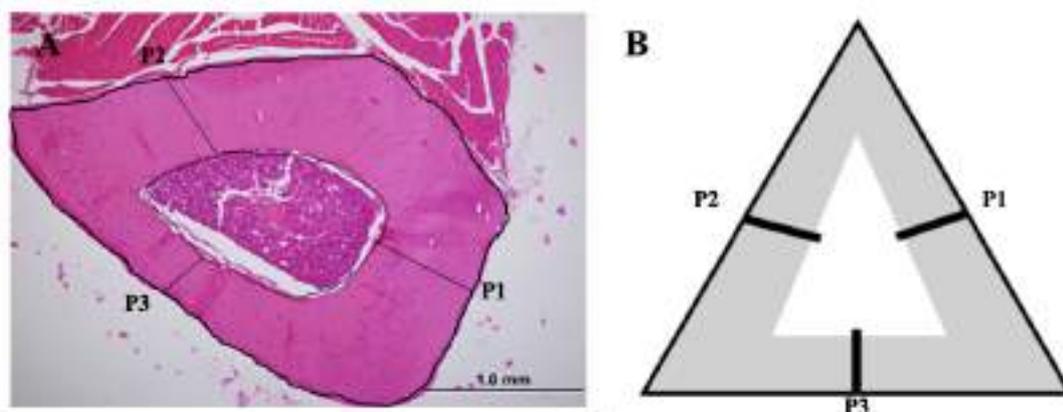
Os procedimentos realizados para preparo do material e análise histomorfométrica do osso foram realizados conforme Carvalho et al., (2010) e Reis et al. (2016).

Após a fixação em formol 10%, os ossos passaram pela descalcificação em ácido tricloroacético 5% (TCA) por sete dias. Na sequência, os ossos foram submetidos ao processamento histológico de rotina para a inclusão em parafina, seccionados transversalmente na espessura de 7 µm em micrótomo (Olympus CUT 4055), sendo por fim corados com hematoxilina e eosina (HE).

As secções histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio (Olympus BX60), e as imagens digitalizadas avaliadas no programa Image-Pro Plus 6.0 ®. Para análise da espessura do osso cortical e da área da cavidade medular, foram utilizadas as fotomicrografias das tíbias, com aumento final de 40X.

A mensuração da espessura do osso cortical foi realizada em 3 medições equidistantes em cada corte histológico, desde a superfície periosteal até a superfície endosteal, priorizando as regiões superior, inferior e lateral de cada corte (CARVALHO et al., 2010) (Figura 13 A-B). A análise da área do canal medular foi delimitada automaticamente pelo sistema de análise de imagens, contornando o perímetro da superfície endosteal (Figura 13-A).

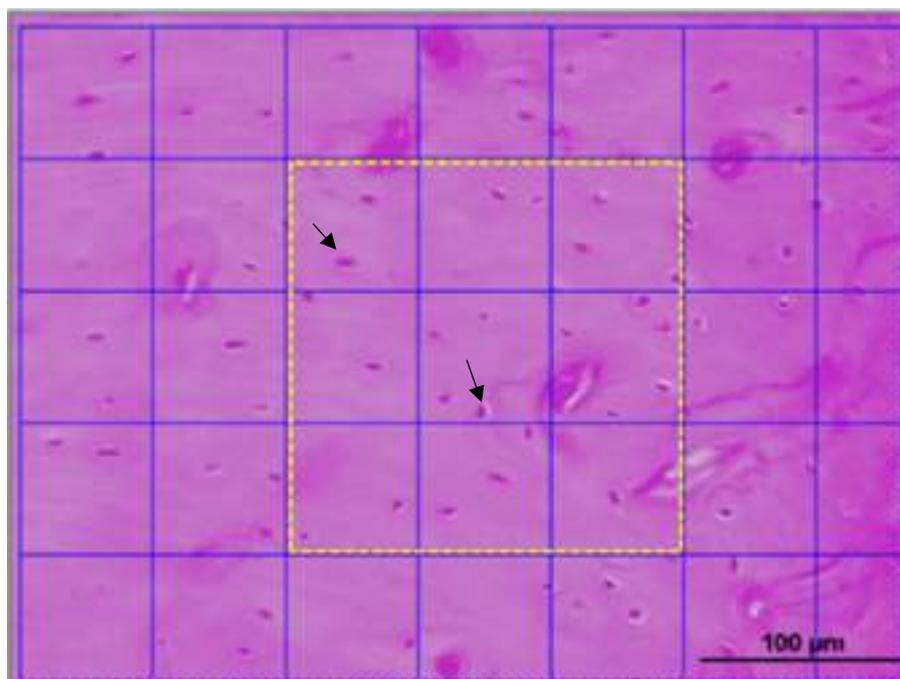
FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA DA TÍBIA



A: Fotomicrografia da diáfise da tíbia em corte transversal, coloração HE. B: Esquema da diáfise da tíbia em corte transversal. As linhas pretas representam as regiões P1, P2 e P3 para as mensurações de espessura do osso cortical e o círculo preto margeando a cavidade medular para mensurar a área do canal medular (CARVALHO et al., 2010; REIS et al., 2016).

Para analisar o número de osteócitos, lacunas cheias e vazias utilizou-se a função de linhas de grade (Grid Mask), do programa Image Pro Plus 6.0®, em configuração padrão de 300x300 *pixels*. A contagem foi realizada dentro de uma área de 9 quadrantes padronizados, do campo visual, considerando como bordas de exclusão (margens superior e direita), e bordas de inclusão (margens inferior e esquerda) (Figura 14).

FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DA CONTAGEM DO NÚMERO DE OSTEÓCITOS



Procedimento de contagem manual de osteócitos no programa *image pro-plus 6.0*®. Flecha: Osteócito e lacuna cheia.

3.11 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL

Para as análises morfológicas da articulação foi realizada uma sondagem por varredura nas lâminas, em diferentes aumentos, dos cortes histológicos corados em HE utilizando microscópio de luz binocular Olympus BX 60® (Tóquio, Japão), sendo observado o aspecto tecidual da cartilagem articular da tíbia e do tálus e suas características morfológicas. O protocolo de análise seguiu o descrito por Kunz et al. (2014), em que foram definidas as áreas de interessa da região articular anterior, média e posterior. Para tanto, foram

investigados os seguintes parâmetros: na superfície articular se estava com aspecto liso ou com floculações; na MEC a presença de fissuras, distribuição dos condrócitos e presença de clones celulares; disposição da *tidemark*; degradação da cartilagem articular e presença de *pannus*. No osso subcondral foi analisado sua distribuição, invaginação e exposição. Na membrana sinovial, foi analisado a constituição da íntima e da subíntima, distribuição dos sinovióticos, presença de angiogênese, tecido conjuntivo, congestão vascular e infiltrado inflamatório (VIEIRA et al., 2017). Ainda foi analisado a presença de células inflamatórias na cavidade articular. Posteriormente, para a interpretação e visualização dos resultados obtidos, foram realizadas fotomicrografias em aumentos distintos e os resultados apresentados em forma de pranchas morfológicas.

3.12 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA DA TÍBIA

Para análise morfológica do corte transversal da diáfise tibial, foi realizada uma sondagem microscópica, em diferentes aumentos, dos cortes corados em HE, utilizando microscópio de luz binocular Olympus BX 60® (Tóquio, Japão). Para tanto, foram investigados os seguintes parâmetros: formato geral e configuração do osso cortical e do canal medular; constituição celular e formato do osteócito, da matriz cortical e da medula óssea; configuração das margens cortical, endosteal e periosteal (regular ou irregular); constituição celular dos envoltórios conjuntivos ao osso cortical (periósteo e endósteo); morfologia e distribuição das lacunas ósseas e se estavam ocupadas ou não; presença ou não de remodelação óssea em diferentes pontos, e irregularidades da matriz mineralizada cortical. Ainda foi analisado a morfologia geral dos tecidos adjacentes como o muscular e vasos sanguíneos e investigado a presença de infiltrado infamatórios. Posteriormente, para a interpretação e visualização dos resultados obtidos, foram realizadas fotomicrografias em aumentos distintos e os resultados apresentados em forma de pranchas morfológicas.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro Wilk. Para caracterização da amostra e comparação da força total aplicada para promover o alongamento entre os grupos jovens e idosos foi utilizado o teste Kruskal Wallis ou Análise de variância de 1 via (ANOVA one way) com post hoc Tukey, de acordo com a normalidade avaliada. Para dados paramétricos foi utilizado a análise de variância de 1 via e para dados não paramétricos o Kruskal Wallis. Para comparação da força aplicada para promover o alongamento, por sessão, comparando ratas envelhecidas das ratas adultas, foi utilizado o Anova de duas vias e para comparar a força aplicada para alongar em cada sessão foi utilizado o teste Anova de medidas repetidas.

Para as variáveis massa muscular, massa muscular relativa, comprimento muscular, número de sarcômeros em série, comprimento do sarcômero, área de secção transversa da fibra muscular, área do osso tíbia, área do canal medular da tíbia, a espessura da tíbia, número de osteócitos, número de lacunas cheias e lacunas vazias, espessura total da cartilagem da tíbia, espessura da zona superficial da tíbia, espessura da zona profunda da tíbia, número de condrócitos da tíbia, espessura total da cartilagem do tálus, espessura da zona superficial do tálus, espessura da zona profunda do tálus, número de condrócitos do tálus, porcentagem de imunomarcagem por área da fibra muscular do colágeno 1, colágeno 3, TGF- β e TNF- α , foi realizado o teste análise de variância de 3 vias (Anova three-way) com os fatores idade (adultas, envelhecidas), número de sessões (6 sessões e 12 sessões) e condição experimental (membro alongado e não alongado). Quando interação significativa foi observada para o ANOVA o teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi realizado. Todas as análises estatísticas realizadas foram conduzidas utilizando o Software SPSS Statistics 25; IBM, Tokyo, Japão).

A análise descritiva está apresentada como média e desvio padrão. O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$. O tamanho do efeito foi estimado usando g de Hedges com ajuste para amostras pequenas. A classificação do tamanho do efeito adotada foi: $>0,2$ efeito trivial; $>0,5$ efeito médio; $>0,8$ efeito grande;

>1,3 efeito muito grande (COHEN,1987; HEDGES, 1981). Essas análises foram conduzidas utilizando o Software SPSS Statistics 25; IBM, Tokyo, Japão).

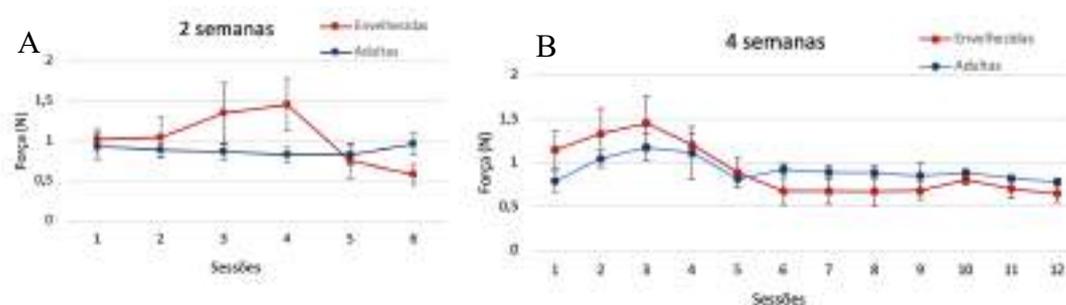
4 RESULTADOS

Os resultados dos efeitos do alongamento para cada desfecho avaliado estão apresentados abaixo e ao final da seção resultados é apresentado um resumo (figuras 39 a 44).

4.1 INTENSIDADE DO ALONGAMENTO

A força aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo foi avaliada por meio de um aparato contendo célula de carga e foi registrada em Newton. Não foi observada diferença significativa entre os grupos na força total aplicada ao longo das 6 (Figura 15-A) ou 12 sessões (Figura 15-B) ($p=0,094$; Kruskal Wallis). A força média aplicada para alongar o músculo sóleo no GE2 foi de $1,03\pm 0,33$ N; no GE4 foi de $1,11\pm 0,28$ N; $0,89\pm 0,04$ N no GA2 e $0,97\pm 0,15$ N no GA4.

FIGURA 15 - FORÇA APLICADA PARA PROMOVER O ALONGAMENTO EM RATAS ENVELHECIDAS E ADULTAS



A: Seis sessões. B:12 sessões

A anova de medidas repetidas mostrou que existe efeito do fator sessão sobre a força necessária para aplicar o alongamento nas ratas envelhecidas no experimento de 6 sessões ($F=11,13$, $p=0,000$). O post-hoc de Bonferroni mostrou que as sessões 1, 3 e 4 diferem da sessão 6 ($p=0,043$; $p=0,009$ e $p=0,008$), representando que maior força foi necessária para alongar o músculo na 1^a, 3^a e 4^a sessão, em comparação a última. Por outro lado, não existe efeito do fator sessão sobre a força necessária para aplicar o alongamento nas ratas adultas no experimento de 6 sessões ($F=1,40$ $p=0,251$).

A anova de duas vias mostrou interação entre a idade do animal e a força necessária para alongar o músculo com diferença entre as ratas adultas e envelhecidas nas sessões 3 ($p=0,006$), 4 ($p=0,000$) e 6 ($p=0,000$, respectivamente), representando que maior força foi necessária para alongar o músculo das ratas envelhecidas na 3ª e 4ª sessão e menor força na 6ª em comparação à força necessária para alongar o músculo das ratas adultas.

A anova de medidas repetidas mostrou que existe efeito do fator sessão sobre a força necessária para aplicar o alongamento nas ratas envelhecidas no experimento de 12 sessões ($F=21,91$, $p=0,000$). O post-hoc de Bonferroni mostrou que as sessões 6, 7, 8 e 11 diferem da sessão 1 ($p=0,073$; $p=0,018$; $p=0,043$ e $p=0,007$, respectivamente). Da mesma forma, a sessão 2 diferiu das sessões 6,7,9,11 e 12 ($p=0,032$; $p=0,046$; $p=0,012$; $p=0,012$ e $p=0,010$, respectivamente). A sessão 3 diferiu das sessões 6,9,11 e 12 ($p=0,036$; $p=0,013$; $p=0,030$ e $p=0,015$, respectivamente). A sessão 4 foi diferente das sessões 6,7,8,9,10,11 e 12 ($p=0,032$; $p=0,040$; $p=0,005$; $p=0,018$; $p=0,011$; $p=0,020$ e $p=0,003$). Todos esses resultados indicam que maior força foi necessária para alongar o músculo envelhecido nas primeiras 4 sessões em comparação as 6,7,8,9,10,11 e 12.

Nas ratas adultas, a anova de medidas repetidas mostrou que existe efeito do fator sessão sobre a força necessária para aplicar o alongamento no experimento de 12 sessões ($F=7,59$; $p=0,000$). O post-hoc de Bonferroni mostrou que a sessão 2 foi diferente da sessão 5 ($p=0,022$) e 12 ($p=0,022$), a sessão 3 foi diferente da sessão 11 ($p=0,048$), e a 10 foi diferente da 12 ($p=0,036$). Esses resultados demonstram que maior força foi necessária para alongar o músculo nas sessões iniciais em comparação às finais.

A anova de duas vias mostrou interação entre a idade do animal e a força necessária para alongar o músculo com diferença observada entre as ratas adultas e envelhecidas nas sessões 1 ($p=0,002$), 2 ($p=0,029$), 6 ($p=0,002$), 7 ($p=0,004$), 8 ($p=0,010$), 9 ($p=0,023$), 10 ($p=0,007$), 11 ($p=0,019$) e 12 ($p=0,006$), respectivamente, representando que maior força foi necessária para alongar o músculo das ratas envelhecidas na 1ª e 2ª sessão e menor força na 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 10ª, 11ª e 12ª em comparação à força necessária para alongar o músculo das

ratas adultas. Os valores estão expressos em média e desvio padrão na tabela

1.

TABELA 1- FORÇA APLICADA PARA PROMOVER O ALONGAMENTO DO MÚSCULO SÓLEO (N)

6 SESSÕES			12 SESSÕES		
Sessão	Ratas Envelhecidas	Ratas Adultas	Sessão	Ratas Envelhecidas	Ratas Adultas
1	1,01±0,13	0,92 ±0,16	1	1,14±0,2*	0,79 ±0,12
2	1,03±0,10	0,88±0,08	2	1,33±0,28*	1,04±0,10
3	1,35±0,38*	0,86±0,09	3	1,45±0,31	1,17±0,15
4	1,45±0,33*	0,82 ±0,09	4	1,20±0,13	1,11±0,29
5	0,75±0,21	0,92±0,12	5	0,88±0,17	0,81±0,10
6	0,58±0,13	0,96±0,13 [#]	6	0,67±0,15	0,92±0,05 [#]
			7	0,67±0,14	0,89 ±0,75 [#]
			8	0,67±0,17	0,88±0,08 [#]
			9	0,68±0,09	0,85±0,15 [#]
			10	0,80±0,06	0,88 ±0,23 [#]
			11	0,70±0,11	0,82±0,03 [#]
			12	0,64±0,09	0,78±0,04 [#]

Força necessária para alongar o músculo. *p<0,05 representando que a força aplicada para alongar o músculo sóleo das ratas idosas foi maior que para as ratas jovens. #p<0,05 representando que a força aplicada para alongar o músculo sóleo das ratas jovens foi maior que para as ratas idosas. Anova de duas vias.

4.2 MASSA CORPORAL E MASSA MUSCULAR

Os resultados da massa corporal inicial e final apresentaram distribuição não paramétrica e dessa forma foram analisados pelo teste Kruskal Wallis (p=0,009; p=0,005, Shapiro Wilk, respectivamente). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos tanto para massa corporal inicial (p=0,000; Kruskal Wallis) quanto final (p=0,001; Kruskal-Wallis). Na massa corporal inicial, a diferença encontrada foi entre o GE2 e GA4 (p=0,016, Kruskal-Wallis), GE4 e GA4 (p=0,005, Kruskal-Wallis), GE2 e GA2 (p=0,04, Kruskal-Wallis) e GE4 e GA2 (p=0,015, Kruskal-Wallis). Na massa corporal final, a diferença foi encontrada entre GA4 e GE4 (p=0,017, Kruskal-Wallis), GE2 e GA4

($p=0,019$, Kruskal-Wallis), GE4 e GA2 ($p=0,039$, Kruskal-Wallis) e GE2 e GA2 ($p=0,042$, Kruskal-Wallis) (Tabela 2)

Quando comparadas a massa corporal inicial e final em cada grupo, foi observada redução na massa corporal no GE2 ($p=0,028$; Wilcoxon) e GE4 ($p=0,017$, Wilcoxon) e não houve mudança estatisticamente significativa nos grupos GA2 ($p=0,023$, Wilcoxon) e GA4 ($p=0,062$, Wilcoxon). Na análise da porcentagem de perda ou ganho de massa corporal, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,182$, ANOVA one way).

Diferença estatisticamente significativa foi observada entre o GE4 e GA4 na massa muscular do sóleo não alongado ($p=0,018$, ANOVA three way), enquanto não foi observada diferença entre os grupos na massa muscular do sóleo alongado. Na análise da massa muscular relativa à massa corporal, foi observada diferença estatisticamente significativa entre GE2 e GA2 apenas no sóleo não alongado ($p=0,007$, ANOVA three way).

TABELA 2- COMPARAÇÃO DA MASSA CORPORAL INICIAL E FINAL E MASSA MUSCULAR ABSOLUTA E RELATIVA

Grupo	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Porcentagem de redução da massa corporal (%)	Massa muscular final (g)		Massa muscular relativa a massa corporal	
				Alongado	Não alongado	Alongado	Não alongado
GE2	324,14±53,8 ^{a,c} (274,37-373,91)	307,28±48,35 (262,56-352,0)	5,0±2,74 [*] (2,49-7,57)	0.10±0.02	0.11±0.01	0.035±0.00	0.036±0.00 [£]
GA2	261,42±17,22 ^c (245,5-277,35)	254,42±18,52 ^{f,g} (237,29-271,56)	2,54±6,19 (-3,18-8,27)	0.10±0.13	0.11±0.02	0.039±0.0	0.044±0.0 [£]
GE4	319,0±34,48 ^{b,d} (290,17-347,82)	297,12±24,70 ^g (276,47-317,77)	6,60±4,03 [#] (3,23-9,98)	0.10±0.00	0.11±0.00 [¥]	0.034±0.00	0.039±0.00
GA4	257,71±15,01 ^{a,b} (243,82-271,60)	251,76±16,78 ^{e,f} (235,76-266,80)	2,50±3,08 (0,1-4,90)	0.09±0.01	0.09±0.00 [¥]	0.038±0.00	0.038±0.00

GE2: grupo envelhecidas 2 semanas. GA2: Grupo adultas 2 semanas GE4: Grupo envelhecidas 4 semanas. GA4: Grupo adultas 4 semanas. Valores apresentados em média e desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. ^{a,b,c,d,e,f,g}Kruskal-Wallis; ^{*},[#]Wilcoxon. [¥] Comparação idade*protocolo*membro para massa muscular (ANOVA three-way). [£] Comparação idade*protocolo*membro para massa muscular (ANOVA three-way)

4.3 HISTOMORFOMETRIA MUSCULAR

4.3.1 Comprimento muscular, número de sarcômeros em série e comprimento dos sarcomêros

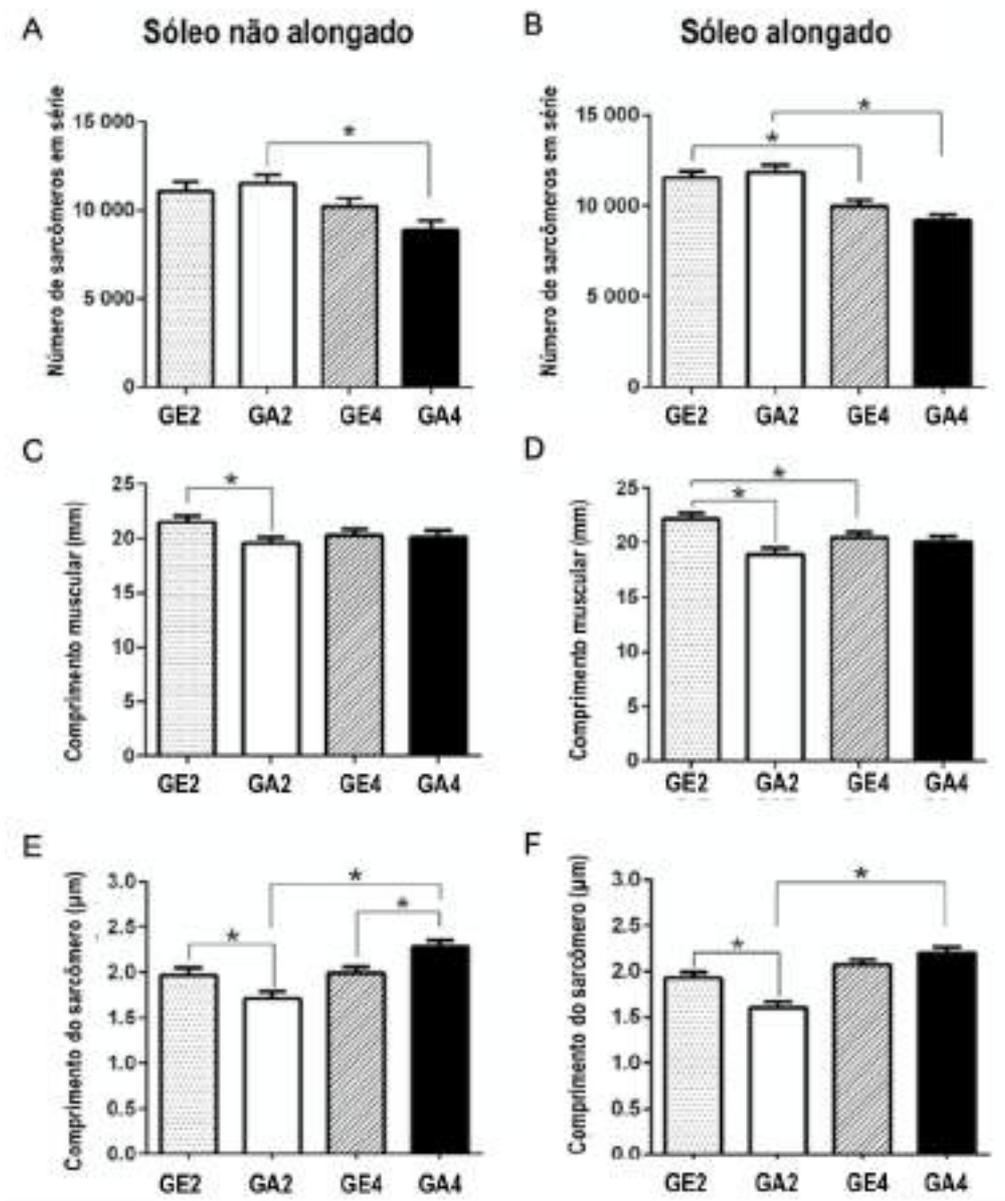
O efeito do exercício de alongamento passivo no crescimento longitudinal do músculo sóleo foi investigado pela comparação do número de sarcômeros em série no músculo sóleo, alongado e não alongado, por 6 ou 12 sessões. O número total de sarcômeros e o comprimento dos sarcômeros em cada fibra muscular isolada foram estimados pela correlação entre o número de sarcômeros identificados ao longo de 300 μ m da fibra e o comprimento total do músculo, e dessa forma, esses desfechos também foram investigados.

Foram observadas diferenças entre os grupos para o número de sarcômeros em série, comprimento muscular e comprimento do sarcômero, mas não houve diferença significativa entre o sóleo alongado e não alongado em nenhum dos grupos.

No sóleo não alongado, o número de sarcômeros em série foi menor no GA4 em comparação ao GA2 ($p < 0,001$, ANOVA three way) (Figura 16-A), o comprimento muscular foi menor no GA2 em comparação ao GE2 ($p = 0,016$, ANOVA three way) (Figura 16-C) e o comprimento do sarcômero foi menor no GA2 em comparação ao GE2 ($p = 0,009$; ANOVA three way) e em comparação ao GA4 ($p < 0,001$, ANOVA three way). O comprimento do sarcômero também se mostrou menor no GE4 em comparação ao GA4 ($p = 0,004$, ANOVA three way) (Figura 16-E).

No sóleo alongado, o número de sarcômeros em série foi menor no GA4 em comparação ao GA2 ($p < 0,001$, ANOVA three way) e menor no GE4 em comparação ao GE2 ($p = 0,012$, ANOVA three way) (Figura 16-B). O comprimento muscular foi maior no GE2 em comparação ao GE4 ($p = 0,027$; ANOVA three way) foi menor no GA2 em comparação ao GE2 ($p < 0,001$, ANOVA three way) (Figura 16-D), da mesma forma que o comprimento do sarcômero também se mostrou menor no GA2 em comparação ao GE2 ($p = 0,001$, ANOVA three way) e em comparação ao GA4 ($p < 0,001$, ANOVA three way) (Figura 16-F).

FIGURA 16 - EFEITO DO ALONGAMENTO NO COMPRIMENTO MUSCULAR, NÚMERO DE SARCÔMEROS EM SÉRIE E COMPRIMENTO DOS SARCÔMEROS



Comparação idade*protocolo*membro para número de sarcômeros em série, comprimento muscular e comprimento do sarcômero; *P<0,05; comparação grupos; a- Comparação do número de sarcômeros em série no sóleo não alongado. b- Comparação do número de sarcômeros em série no sóleo alongado. c- Comparação do comprimento muscular em milímetros do sóleo não alongado. d- Comparação do comprimento muscular em milímetros do sóleo alongado. e- Comparação do comprimento do sarcômero em μm do sóleo não alongado. f- Comparação do comprimento do sarcômero em μm do sóleo alongado.

4.3.2 Área de secção transversa da fibra muscular

Com o objetivo de verificar o efeito do exercício de alongamento passivo no crescimento radial do músculo sóleo, a área de secção transversa da fibra

muscular (ASTFM) foi avaliada. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos.

Quando comparados condição experimental (sóleo alongado) e controle (sóleo não alongado), foi observado menor ASTFM do sóleo alongado no GE2 ($p < 0,001$; ANOVA Three way; ES 0,66), no GA2 ($p < 0,001$; ANOVA Three Way; ES 0,24) e no GE4 ($p = 0,005$, ANOVA three way; ES 0,42), o que indica redução da ASTFM de 26,49% no GE2, de 8,02% no GA2 e de 16,88% no GE4. No GA4 houve aumento de 2,11% na ASTFM, mas não foi significativa.

Foi observado menor ASTFM do sóleo não alongado do GA2 em comparação ao GE2 ($p < 0,001$; ANOVA three way) e GA4 ($p < 0,001$; ANOVA three way) do GE2 em comparação ao GI4 ($p < 0,001$, ANOVA three way) e do GA4 em comparação ao GE4 ($p < 0,001$, ANOVA three way).

No sóleo alongado, foi observado menor ASTFM no GA2 em comparação ao GE2 ($p < 0,001$, ANOVA three way) e GA4 ($p < 0,001$, ANOVA three way), e do GE2 em comparação ao GE4 ($p < 0,001$, ANOVA three way). Esses resultados estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3- ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DA FIBRA MUSCULAR (ASTFM) DO MÚSCULO SÓLEO

Grupo	ASTFM (μm^2)	ASTFM (μm^2)	% de Mudança
	Alongado	Não alongado	
GE2	5573,99 \pm 2445,15 ^{a,h,j}	7582,71 \pm 3544,27 ^{a,d,f}	↓26.49
GA2	4854,69 \pm 1780,05 ^{b,h,i}	5278,30 \pm 1714,30 ^{b,d,e}	↓8.02
GE4	7183,93 \pm 3105,95 ^{c,j}	8643,52 \pm 3743,93 ^{c,f,g}	↓16.88
GA4	7453,74 \pm 2728,64 ⁱ	7295,82 \pm 2474,75 ^{e,g}	↑2.11

GE2: grupo envelhecidas 2 semanas. GA2: Grupo adultas 2 semanas GE4: Grupo envelhecidas 4 semanas. GA4: Grupo adultas 4 semanas. ^a $p < 0,001$; ANOVA Three way. ^b $p < 0,001$; ANOVA Three way. ^c $p < 0,001$; ANOVA three way; ^d $p < 0,001$; ANOVA three way; ^e $p < 0,001$; ANOVA three way; ^f $p < 0,001$; ANOVA three way; ^g $p < 0,001$; ANOVA three way. ^h $p < 0,001$; ANOVA three way. ⁱ $p < 0,001$; ANOVA three way. ^j $p < 0,001$; ANOVA three way

4.3.3 Imunomarcação da matriz extracelular do músculo sóleo

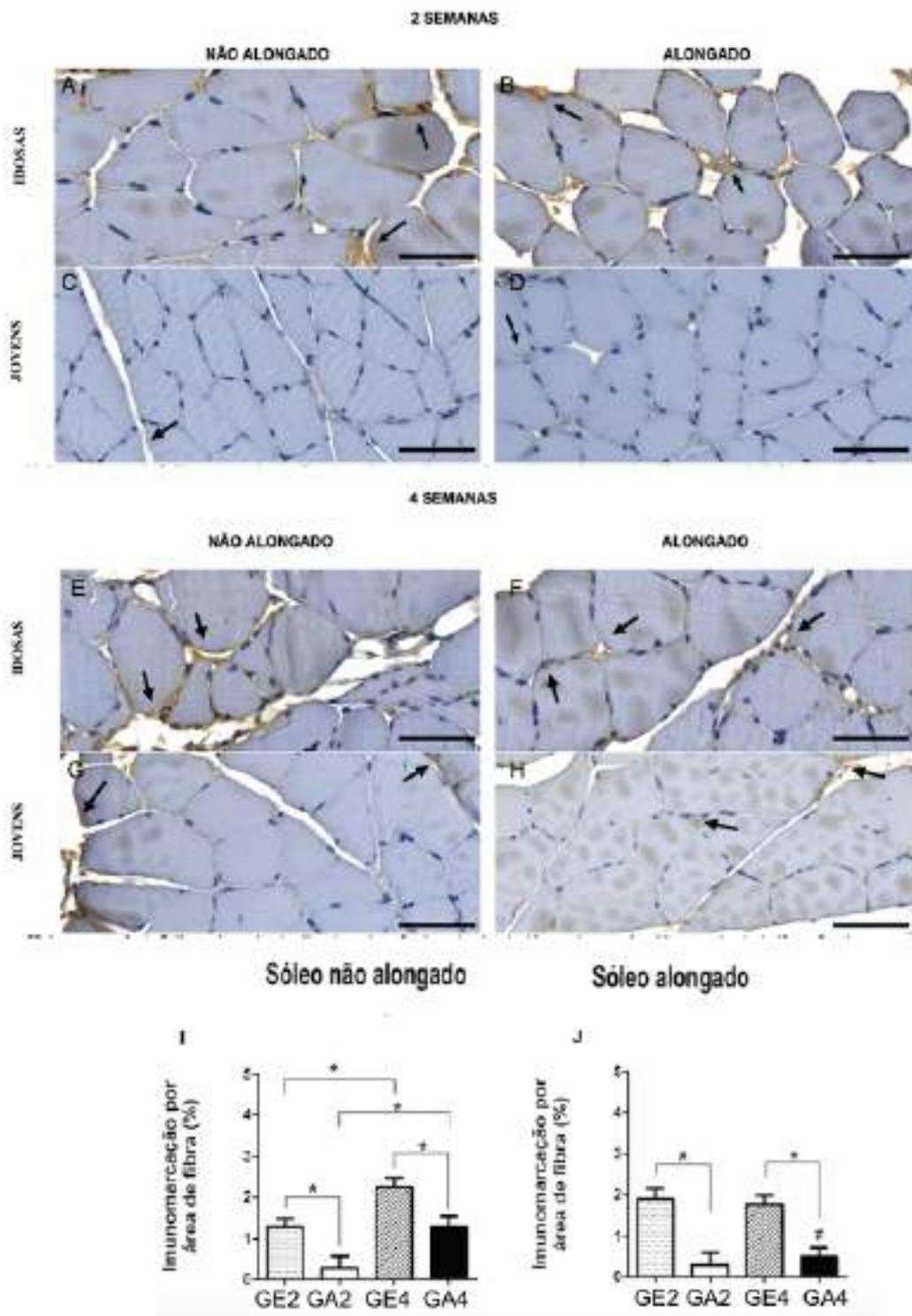
Com o objetivo de verificar o efeito do exercício de alongamento passivo nos componentes da matriz extracelular do músculo sóleo, a presença e

localização das proteínas Colágeno 1 e colágeno 3 no tecido conjuntivo intramuscular, foi investigada por meio da técnica de imunohistoquímica.

Para o colágeno 1, menor imunomarcção no sóleo alongado foi observado em comparação ao sóleo não alongado no GA4 ($p=0,020$, ANOVA three way; ES 0,41).

No sóleo não alongado (Figura 17 C,I), o GA2 mostrou menor imunomarcção que os grupos GE2 ($p=0,007$, ANOVA three way) e GA4 ($p=0,003$, ANOVA three way). O GA4 mostrou menor imunomarcção em comparação ao GE4 ($p<0,001$, ANOVA three way). O GE2 apresentou menor porcentagem de imunomarcção de colágeno 1 que o GE4 ($p=0,003$, ANOVA three way). No sóleo alongado, o GA2 apresentou menor imunomarcção que o GI2 ($p=0,007$, ANOVA three way) e o GA4 menor imunomarcção que o GE4 ($p<0,001$, ANOVA three way).

FIGURA 17 - IMUNOMARCAÇÃO DO COLÁGENO 1



A: Sóleo não alongado do GE2. B: Sóleo alongado do GE2. C: Sóleo não alongado do GA2. D: Sóleo alongado do GA2. E: Sóleo não alongado do GE4. F: Sóleo alongado do GE4. G: Sóleo não alongado do GA4. H: Sóleo alongado do GA4. Imunomarcacão detectada (seta).

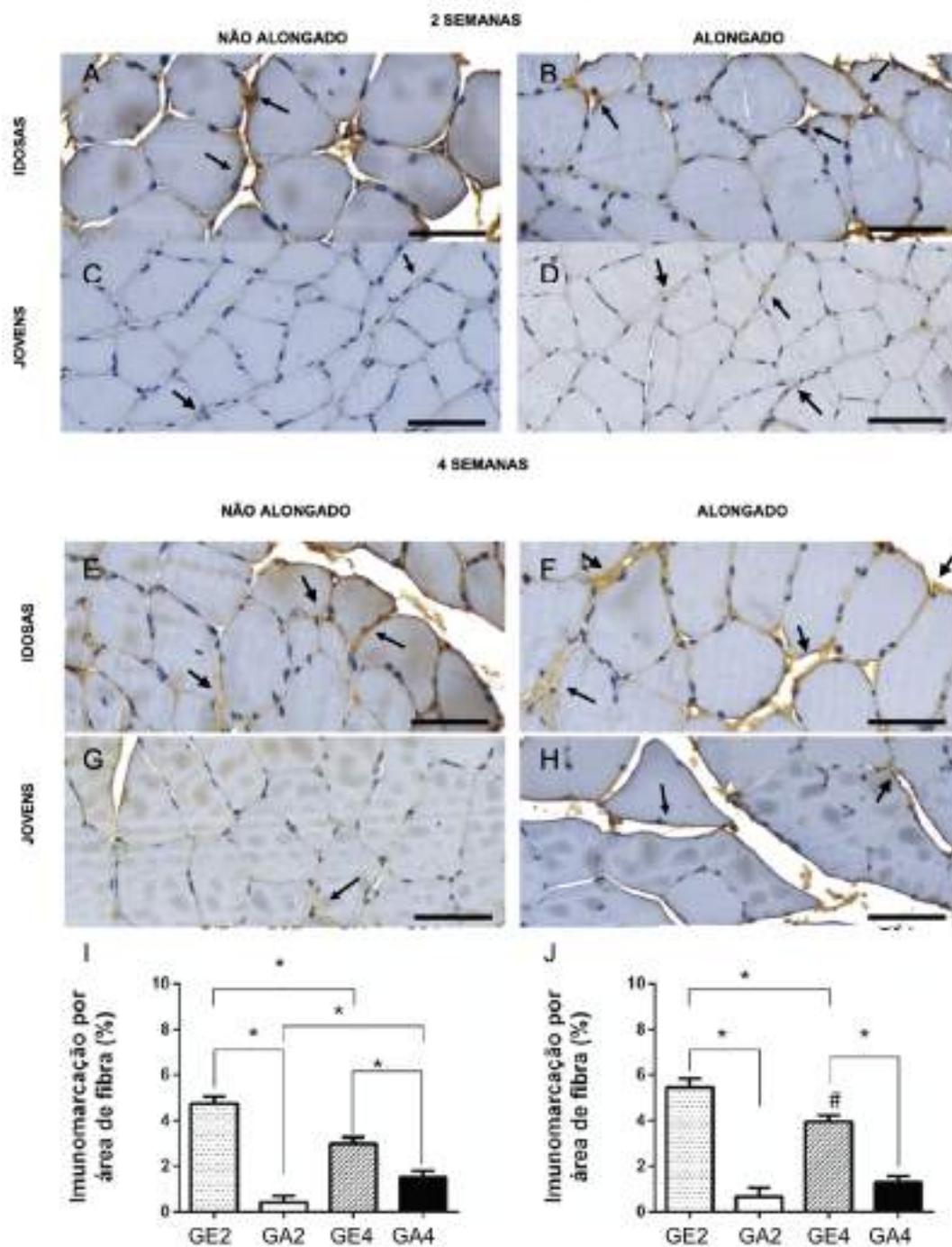
Ampliação original 20X. Scale bar: 50µm. Comparação da idade*protocolo*membro para porcentagem de imunomarcacão do colágeno 1; *p<0,05; comparação grupos; # p<0,05 comparação entre membro alongado e não alongado. I: Porcentagem de imunomarcacão no sóleo não alongado. J: Porcentagem de imunomarcacão no sóleo alongado.

Para o colágeno 3, houve diferença estatisticamente significativa entre o sóleo alongado e não alongado no GE4 (Figura 18), demonstrando maior imunomarcação no sóleo alongado ($p=0,013$; ANOVA Three way; ES 0,41).

No sóleo não alongado (Figura 18-A), o GA2 mostrou menor imunomarcação que os grupos GE2 ($p<0,001$, ANOVA Three way) e GA4 ($p=0,005$, ANOVA Three way). O GA4 mostrou menor imunomarcação em comparação ao GE4 ($p<0,001$, ANOVA Three way). O GE2 apresentou maior porcentagem de imunomarcação que o GE4 ($p<0,001$, ANOVA Three way).

No sóleo alongado, o GA2 apresentou menor imunomarcação que o GE2 ($p<0,001$, ANOVA Three way) e o GA4 menor imunomarcação que o GE4 ($p<0,001$, ANOVA Three way). O GE2 demonstrou maior porcentagem de imunomarcação em comparação ao GE4 ($p=0,002$, ANOVA Three way) e o GE4 maior porcentagem em comparação ao GA4 ($p<0,001$, ANOVA Three way).

FIGURA 18 - IMUNOMARCAÇÃO DO COLÁGENO 3



A: Sóleo não alongado do GE2. B: Sóleo alongado do GE2. C: Sóleo não alongado do GA2. D: Sóleo alongado do GA2. E: Sóleo não alongado do GE4. F: Sóleo alongado do GE4. G: Sóleo não alongado do GA4. H: Sóleo alongado do GA4. Imunomarcacão detectada (seta). Ampliação original 20X. Scale bar: 50µm. Comparação da idade*protocolo*membro para porcentagem de imunomarcacão do colágeno 3; *p<0,05; comparação grupos; # p<0,05 comparação entre membro alongado e não alongado. I: Porcentagem de imunomarcacão no sóleo não alongado. J: Porcentagem de imunomarcacão no alongado.

Foi realizada a análise da relação Colágeno 1/Colágeno 3, e não foi encontrada diferença significativa entre sóleo alongado e não alongado em

nenhum dos grupos, mas foi observada diferença no sóleo não alongado entre o GE2 e GA2 ($p=0,009$; ANOVA three way).

TABELA 4- RELAÇÃO COLÁGENO1/COLÁGENO 3

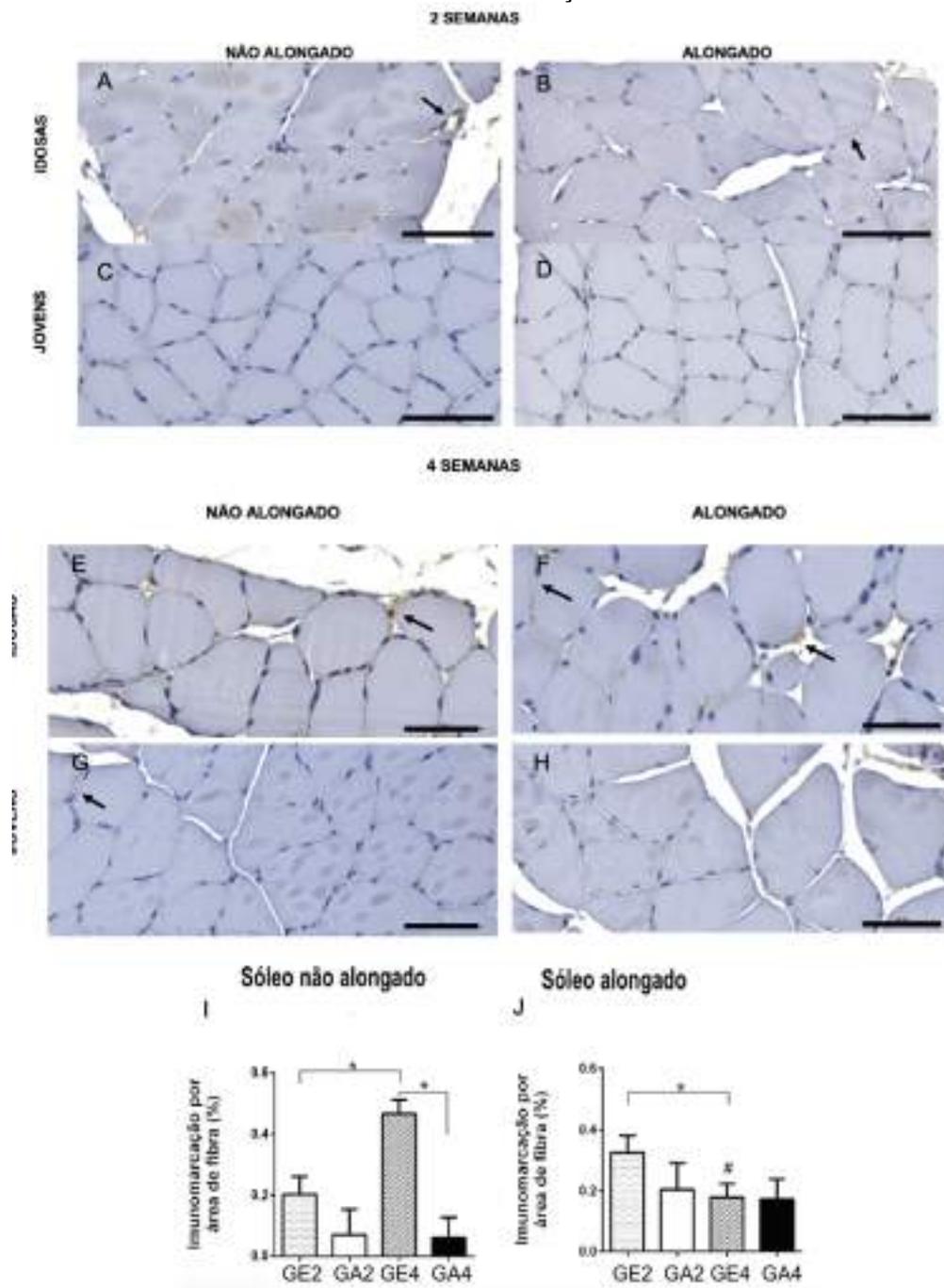
Grupo	Porcentagem de Colágeno 1 %	Porcentagem de colágeno 3 %	Relação Col 1/Col3
GE2 sóleo alongado	1,89±1,98	5,27±3,69	0,95±1,21
GE2 não alongado	1,27±1,08	4,73±3,29	0,63±0,87*
GA2 sóleo alongado	0,20±0,32	0,48±0,79	1,28±2,65
GA2 não alongado	0,10±0,34	0,36±0,53	1,11±2,79
GE4 sóleo alongado	1,73±1,88	3,95±2,12	1,06±3,05
GE4 não alongado	1,88±2,39	2,97±2,68	1,66±3,24
GA4 sóleo alongado	0,42±0,75	1,27±1,25	0,82±1,97
GA4 não alongado	1,09±2,34	1,47±1,61	1,02±3,10

GE2: grupo envelhecidas 2 semanas. GA2: Grupo adultas 2 semanas GE4: Grupo envelhecidas 4 semanas. GA4: Grupo adultas 4 semanas. Valores apresentados em média e desvio padrão

Ainda com objetivo de avaliar a síntese de colágeno, a porcentagem de imunomarcaçã, por meio da imunohistoquímica, do fator de crescimento TGF β -1, um mediador essencial da síntese de colágeno induzida mecanicamente, foi analisada (Figura 19). Diferença estatisticamente significativa entre o sóleo alongado e não alongado no GE4 ($p<0,001$; ANOVA three way ES 0,62) foi encontrada, demonstrando menor imunomarcaçã no sóleo alongado.

No sóleo não alongado (Figura 19-A), o GE2 mostrou menor imunomarcaçã que o grupo GE4 ($p<0,001$, ANOVA three way), que por sua vez, apresentou maior imunomarcaçã que O GA4 ($p<0,001$, ANOVA three way). No sóleo alongado, o GE2 apresentou maior imunomarcaçã que o GE4 ($p=0,043$, ANOVA three way).

FIGURA 19 - IMUNOMARCAÇÃO DO TGF-B1



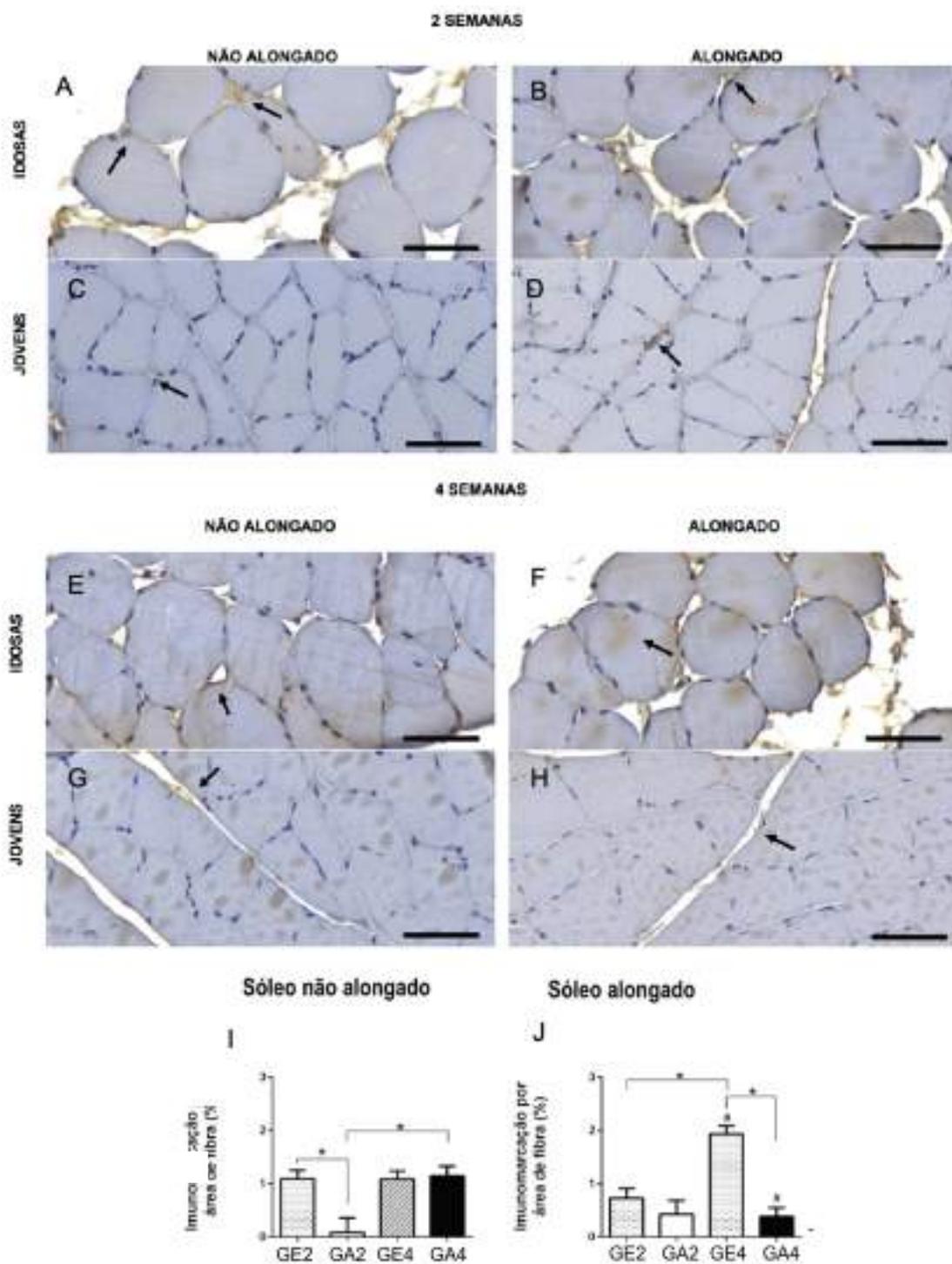
A: Sóleo não alongado do GE2. B: Sóleo alongado do GE2. C: Sóleo não alongado do GA2. D: Sóleo alongado do GA2. E: Sóleo não alongado do GE4. F: Sóleo alongado do GE4. G: Sóleo não alongado do GA4. H: Sóleo alongado do GA4. Imunomarcacão detectada (seta).

Ampliação original 20X. Scale bar: 50 μ m. Comparação da idade*protocolo*membro para porcentagem de imunomarcacão do TGF β -1; *p<0,05; comparação grupos; # p<0,05 comparação entre membro alongado e não alongado. I: Porcentagem de imunomarcacão no sóleo não alongado. J: Porcentagem de imunomarcacão no alongado

Com o objetivo de investigar a ação mediadora do TNF- α após estímulo mecânico, também foi analisada a porcentagem de imunomarcção na fibra muscular dessa citocina, por meio da imunohistoquímica (Figura 20).

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o sóleo alongado e não alongado no GA4 ($p=0,003$; ANOVA three way ES 0,70), demonstrando menor imunomarcção no sóleo alongado, e diferença estatisticamente significativa entre o sóleo alongado e não alongado no GE4 ($p<0,001$; ANOVA three way ES 0,49), demonstrando maior imunomarcção no sóleo alongado.

No sóleo não alongado (Figura 20-A), o GI2 mostrou maior imunomarcção que o grupo GA2 ($p=0,002$, ANOVA three way), que por sua vez, apresentou menor imunomarcção que o GA4 ($p=0,002$, ANOVA three way). No sóleo alongado, o GE2 apresentou menor imunomarcção que o GE4 ($p<0,001$, ANOVA three way), que por sua vez, apresentou maior imunomarcção que o GA4 ($p<0,001$, ANOVA three way).

FIGURA 20 - IMUNOMARCAÇÃO DO TNF- α 

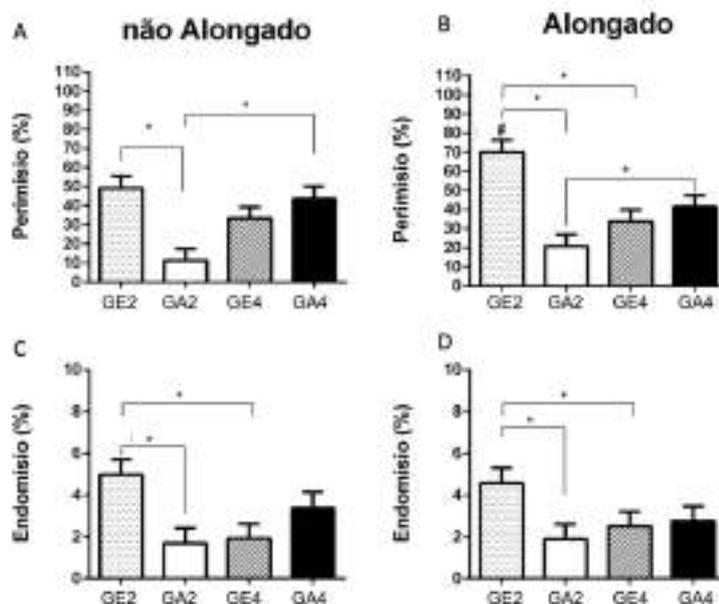
A: Sóleo não alongado do GE2. B: Sóleo alongado do GE2. C: Sóleo não alongado do GA2. D: Sóleo alongado do GA2. E: Sóleo não alongado do GE4. F: Sóleo alongado do GE4. G: Sóleo não alongado do GA4. H: Sóleo alongado do GA4. Imunomarcção detectada (seta). Ampliação original 20X. Scale bar: 50 μ m. Comparação da idade*protocolo*membro para porcentagem de imunomarcção do TNF- α ; *p<0,05; comparação grupos; # p<0,05 comparação entre membro alongado e não alongado. I: Porcentagem de imunomarcção no sóleo não alongado. J: Porcentagem de imunomarcção no alongado

4.3.4 Tecido não contrátil intramuscular

A quantidade de perímio e endomíio está expressa em porcentagem em relação à área da fibra muscular por corte. Como efeito do alongamento, foi encontrada diferença significativa apenas no GE2, com aumento da porcentagem de perímio ($p=0,021$, ANOVA three way; ES 0,53) (Figura 21-AB). Como efeito da idade, foi observada diferença significativa na porcentagem de área do perímio entre GE2 e GA2 ($p<0,001$, ANOVA three way) no sóleo não alongado e alongado. Em relação ao período do protocolo, a diferença foi encontrada entre as ratas adultas (GA2 vs GA4; $p<0,001$, ANOVA three way) no sóleo não alongado (Figura 21-A) e entre as ratas envelhecidas (GE2 vs GE4; $p=0,019$, ANOVA three way) e ratas adultas (GA2 vs GA4, $p<0,001$, ANOVA three way) no sóleo alongado (Figura 21-B).

Na porcentagem de área do endomíio, a diferença observada foi entre GE2 e GA2 ($p=0,002$, ANOVA three way) e GE2 e GE4 ($p=0,003$, ANOVA three way) no sóleo não alongado (Figura 22 C) e entre GA2 e GA2 ($p=0,010$, ANOVA three way) e GE2 e GE4 ($p=0,043$, ANOVA three way) no sóleo alongado (Figura 21 D).

FIGURA 21 - ÁREA DE TECIDO NÃO CONTRÁTIL



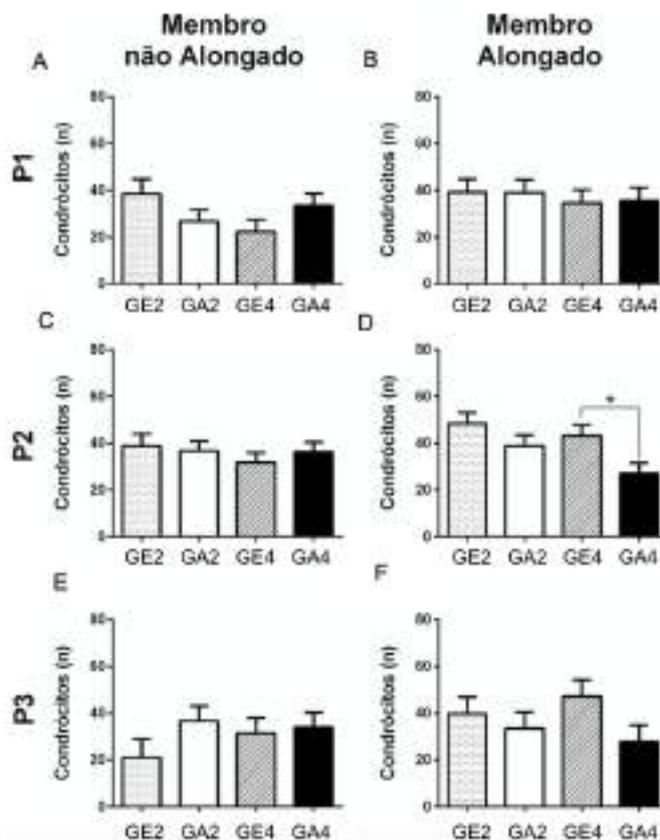
Comparação idade*protocolo*membro para porcentagem de área de perímio e endomíio; * $p<0,05$; comparação grupos; # $p<0,05$ comparação entre membro alongado e não alongado.

4.4 HISTOMORFOMETRIA DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL

Para investigar os efeitos do alongamento na articulação talocrural, a cartilagem articular da tíbia e do tálus foram analisadas. Foram avaliadas a espessura total (ET) e a espessura total na região anterior (ET1), região média (ET2) e região posterior (ET3), a espessura total da zona profunda (ZP) nas regiões anterior (ZP1), média (ZP2) e posterior (ZP3), a espessura total da zona superficial (ZS) nas regiões anterior (ZS1), média (ZS2) e posterior (ZS3), e o número de condrócitos (CO) nas regiões anterior (COP1), média (COP2) e posterior (COP3).

Foi observada diferença significativa entre o GE4 e GA4 no número de condrócitos da região média da cartilagem articular da tíbia do membro alongado, com as ratas adultas apresentando menor número de condrócitos em comparação às ratas envelhecidas ($p=0,017$, ANOVA three way) (Figura 22-D).

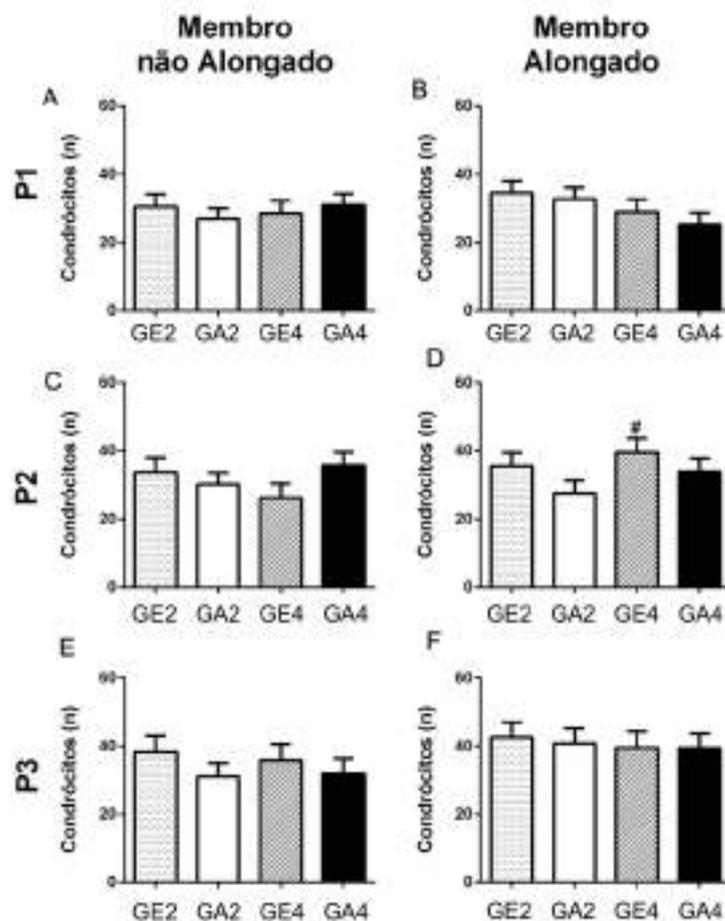
FIGURA 22 - NÚMERO DE CONDRÓCITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA



Comparação idade*protocolo*membro para número de condrócitos da região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3) da cartilagem articular da tíbia. Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p<0,05$; comparação grupos.

Foi observada diferença significativa no número de condrócitos da região média da cartilagem articular do tálus entre membro alongado e não alongado no GE4, com maior número de condrócitos no membro alongado em comparação ao não alongado ($p=0,034$, ANOVA three way) (Figura 23).

FIGURA 23 - NÚMERO DE CONDRÓCITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS

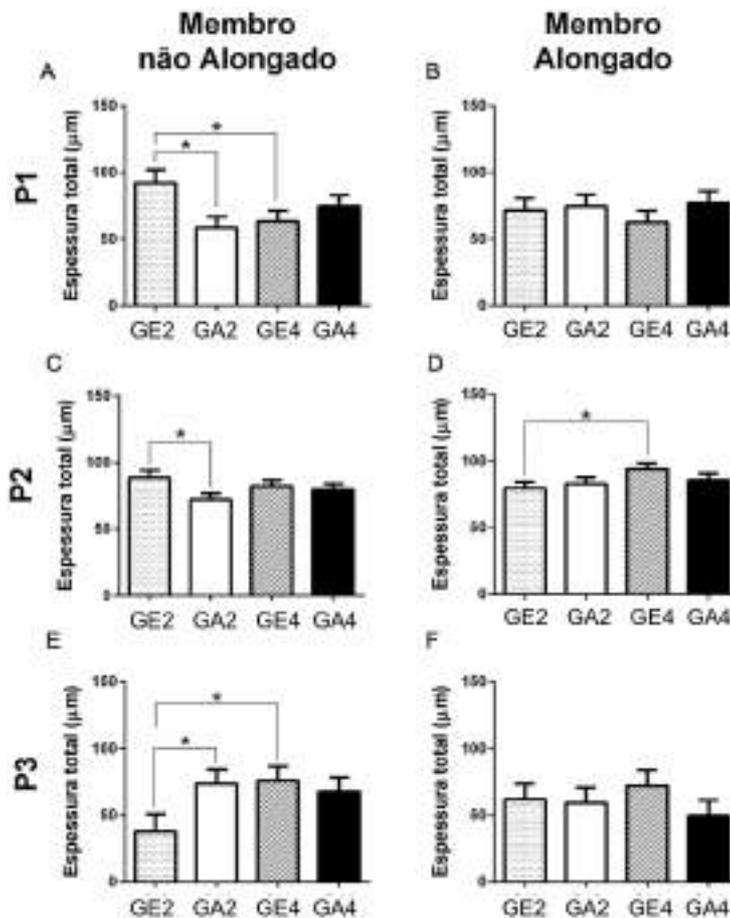


Comparação idade*protocolo*membro para número de condrócitos da região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3) da cartilagem articular do tálus. Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p<0,05$; comparação grupos. # $p<0,05$ comparação entre membro alongado e não alongado.

Na espessura total da cartilagem articular da tibia do membro não alongado (Figura 24), foi encontrada diferença na espessura da porção anterior entre os grupos GE2 e GA2 ($p=0,014$, ANOVA three way) e GE2 e GA4 ($p=0,034$, ANOVA three way). Na porção média, o GE2 apresentou maior espessura em comparação ao GA2 ($p=0,026$; ANOVA three way) e na porção posterior, o GE2 mostrou menor espessura em comparação ao GA2 ($p=0,042$, ANOVA three way) e menor que GE4 ($p=0,031$, ANOVA three way ES 0,98). No membro alongado

(Fig 24-D), o GE2 também mostrou menor espessura em comparação ao GE4 ($p=0,047$, ANOVA three way).

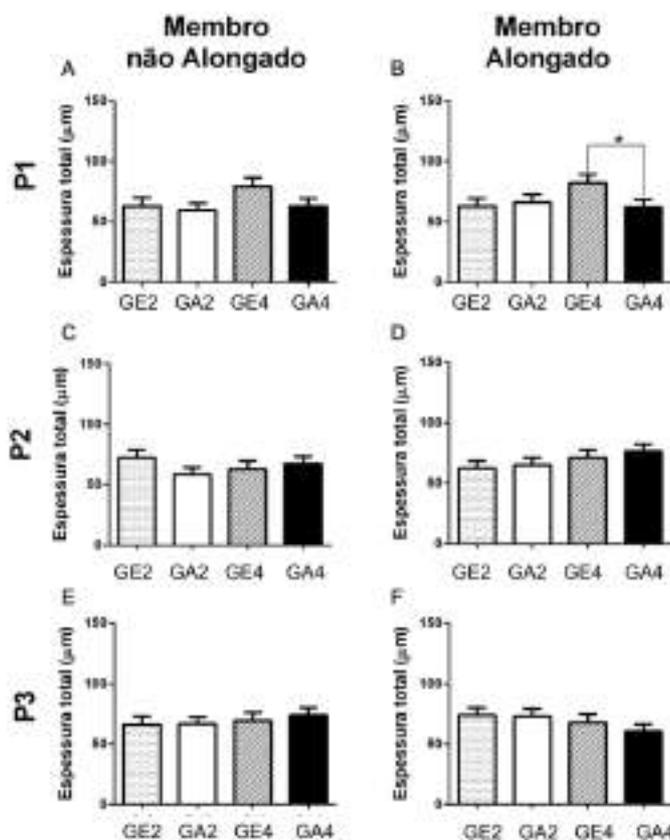
FIGURA 24 - ESPESSURA TOTAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA



Comparação idade*protocolo*membro para espessura total da cartilagem articular da tibia na região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3). Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p < 0,05$; comparação grupos.

Na espessura total da cartilagem articular do tálus (Figura 25), foi encontrada diferença apenas na espessura da porção anterior entre os grupos GE4 e GA4 ($p=0,047$, ANOVA three way) no membro alongado.

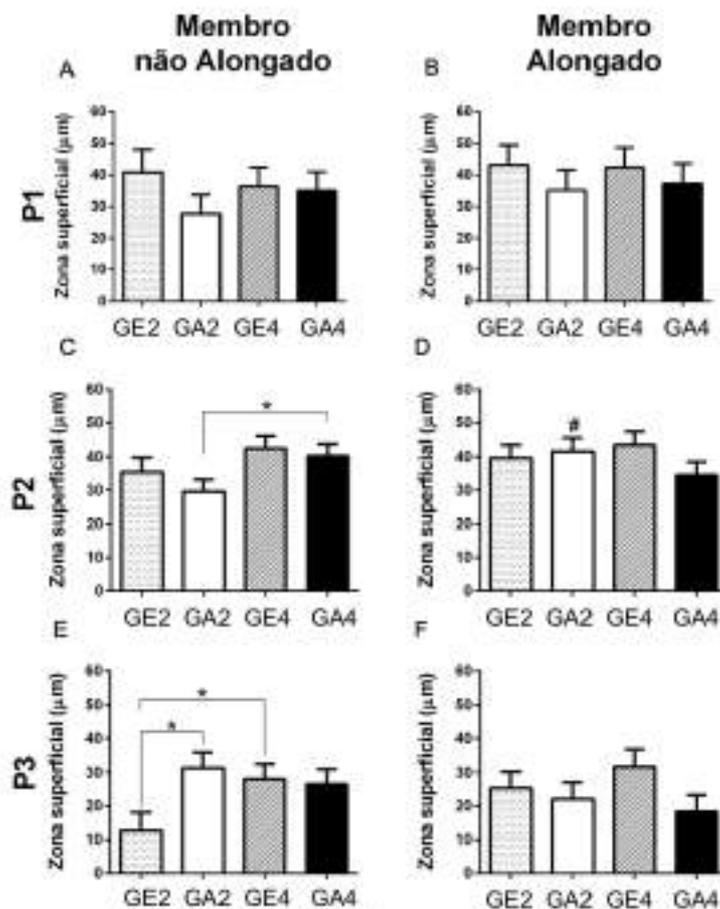
FIGURA 25 - ESPESSURA TOTAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS



Comparação idade*protocolo*membro para espessura total da cartilagem articular do tálus na região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3). Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p < 0,05$; comparação grupos.

Na análise da espessura da zona superficial da cartilagem articular da tibia (Figura 26), foi encontrada diferença entre o GA2 e GA4 ($p = 0,042$, ANOVA three way) na porção média e entre GE2 e GA2 ($p = 0,013$, ANOVA three way) e entre GE2 e GE4 ($p = 0,038$, ANOVA three way) no membro não alongado. Quando comparado o membro alongado e não alongado, o GA2 mostrou maior espessura da região média no membro alongado em comparação ao não alongado ($p = 0,030$, ANOVA three way; ES 1,37).

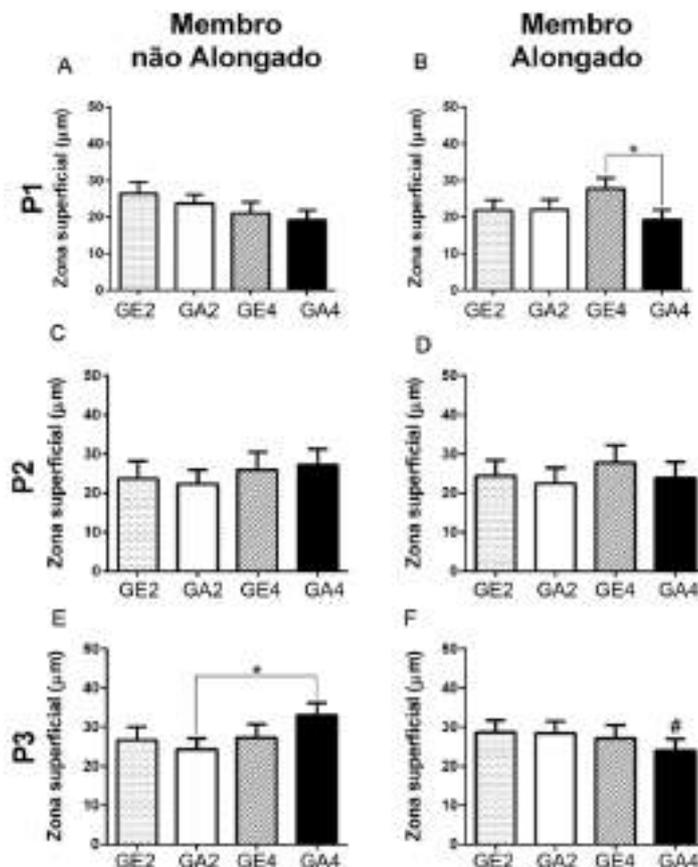
FIGURA 26 - ESPESSURA DA ZONA SUPERFICIAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA



Comparação idade*protocolo*membro para espessura da zona superficial da cartilagem articular da tibia na região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3). Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p < 0,05$; comparação grupos.

Na análise da espessura da zona superficial da cartilagem articular do tálus (Figura 27), foi encontrada diferença entre o GE4 e GA4 ($p = 0,049$, ANOVA three way) na porção anterior do membro alongado e entre GA2 e GA4 ($p = 0,044$, ANOVA three way) na porção posterior no membro não alongado. Quando comparado o membro alongado e não alongado, o GA4 mostrou menor espessura da região posterior no membro alongado em comparação ao não alongado ($p = 0,045$, ANOVA three way; ES 1,05).

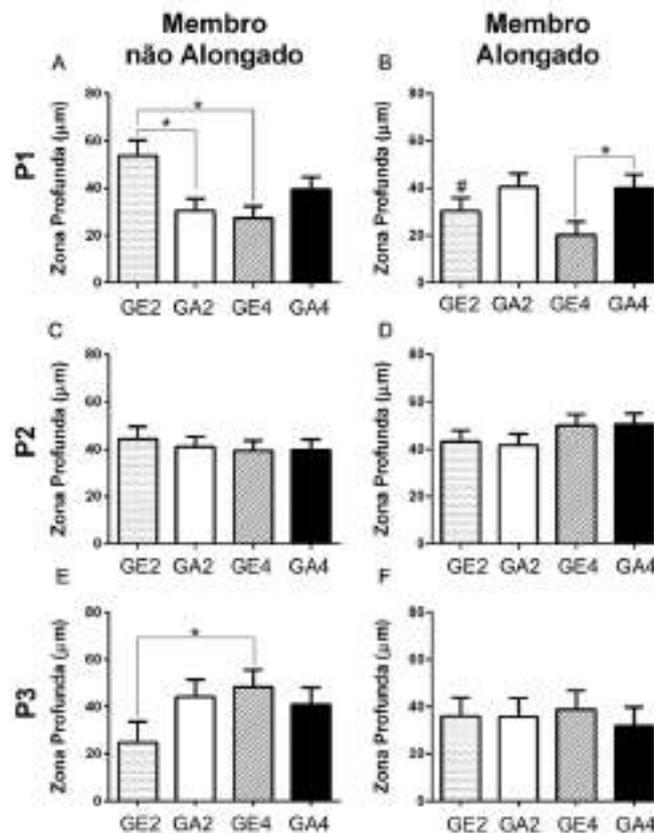
FIGURA 27 - ESPESSURA DA ZONA SUPERFICIAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS



Comparação idade*protocolo*membro para espessura da zona superficial da cartilagem articular do tálus na região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3). Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p < 0,05$; comparação grupos. # $p < 0,05$ comparação entre membro alongado e não alongado.

Na zona profunda da cartilagem articular da tíbia (Figura 28) foi observada diferença na região anterior entre GE2 e GA2 ($p=0,007$, ANOVA three way) e entre GE2 e GE4 ($p=0,002$, ANOVA three way) no membro não alongado e diferença entre GE4 e GA4 ($p=0,018$, ANOVA three way) no membro alongado. Na região posterior, a diferença observada foi apenas entre GE2 e GE4 ($p=0,048$, ANOVA three way) também no membro não alongado. Comparando a espessura da zona profunda do membro alongado e não alongado, a diferença foi observada no GE2, com menor espessura na região anterior no membro alongado em comparação ao não alongado ($p=0,009$, ANOVA three way; ES 1,04).

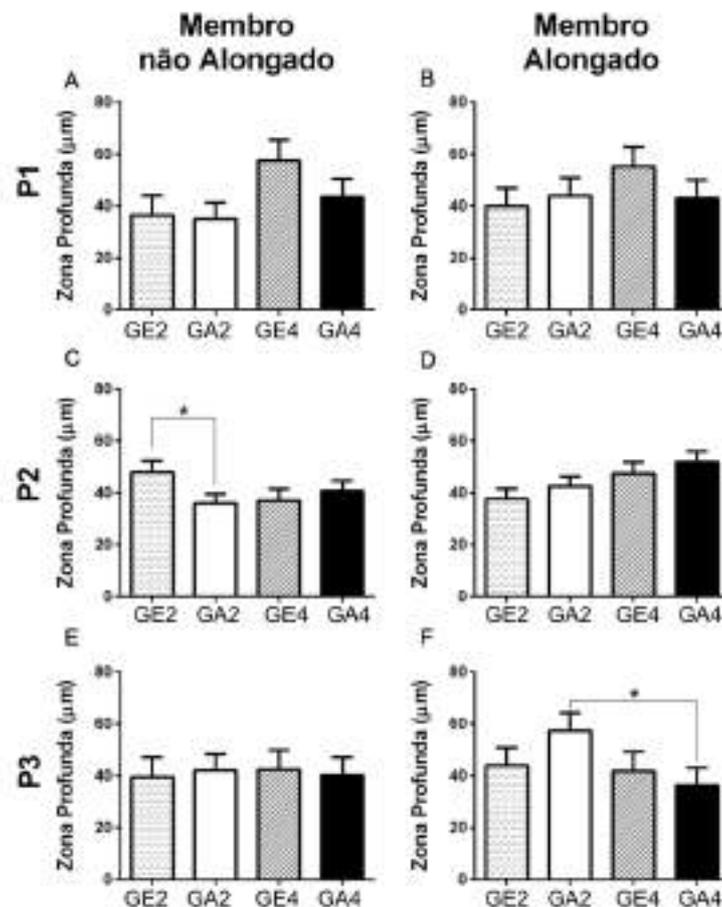
FIGURA 28 - ESPESSURA DA ZONA PROFUNDA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA TÍBIA



Comparação idade*protocolo*membro para espessura da zona profunda da cartilagem articular da tibia na região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3). Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p < 0,05$; comparação grupos. # $p < 0,05$ comparação entre membro alongado e não alongado.

Na análise da zona profunda da cartilagem articular do tálus (Figura 29) a diferença observada na espessura foi na região média entre GE2 e GA2 ($p = 0,042$, ANOVA three way) no membro não alongado e entre GA2 e GA4 no membro alongado ($p = 0,037$, ANOVA three way).

FIGURA 29 - ESPESSURA DA ZONA PROFUNDA DA CARTILAGEM ARTICULAR DO TÁLUS



Comparação idade*protocolo*membro para espessura da zona profunda da cartilagem articular do tálus na região anterior (P1), média (P2) e posterior (P3). Região anterior (A-B), região média (C-D) e região posterior (E-F); * $p < 0,05$; comparação grupos.

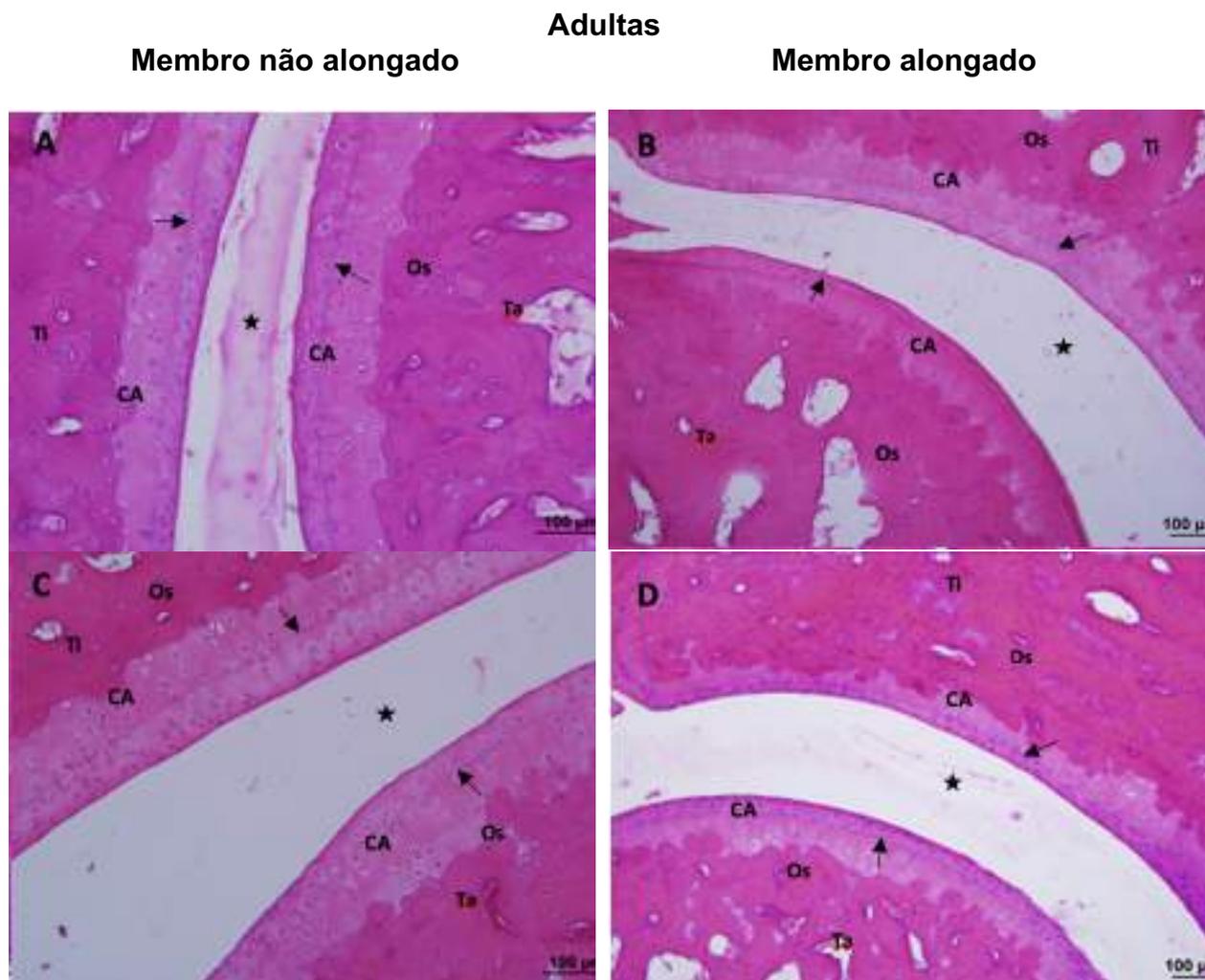
4.4.1 Análise morfológica da cartilagem da articulação talocrural

As articulações dos grupos de ratas adultas 2 e 4 semanas, alongados e não alongadas, demonstraram morfologia normal na tíbia e no tálus, com a cartilagem articular apresentando superfície lisa e os condrócitos organizados nas quatro camadas celulares normais.

Na camada superficial foi observado densidade celular maior, com os condrócitos dispostos em aglomerados horizontais, de formato achatado. Na camada de transição, assumiram formato arredondado e dispuseram-se isoladas ou em grupos isógenos. Em seguida, estavam organizados em lacunas, correspondendo à camada profunda, separada da zona calcificada pela

tidemark. A matriz extracelular também se apresentava com aspecto normal, sem a presença de floculações ou fissuras (Fig. 30 A-D).

FIGURA 30 - FOTOMICROGRAFIAS DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ADULTAS

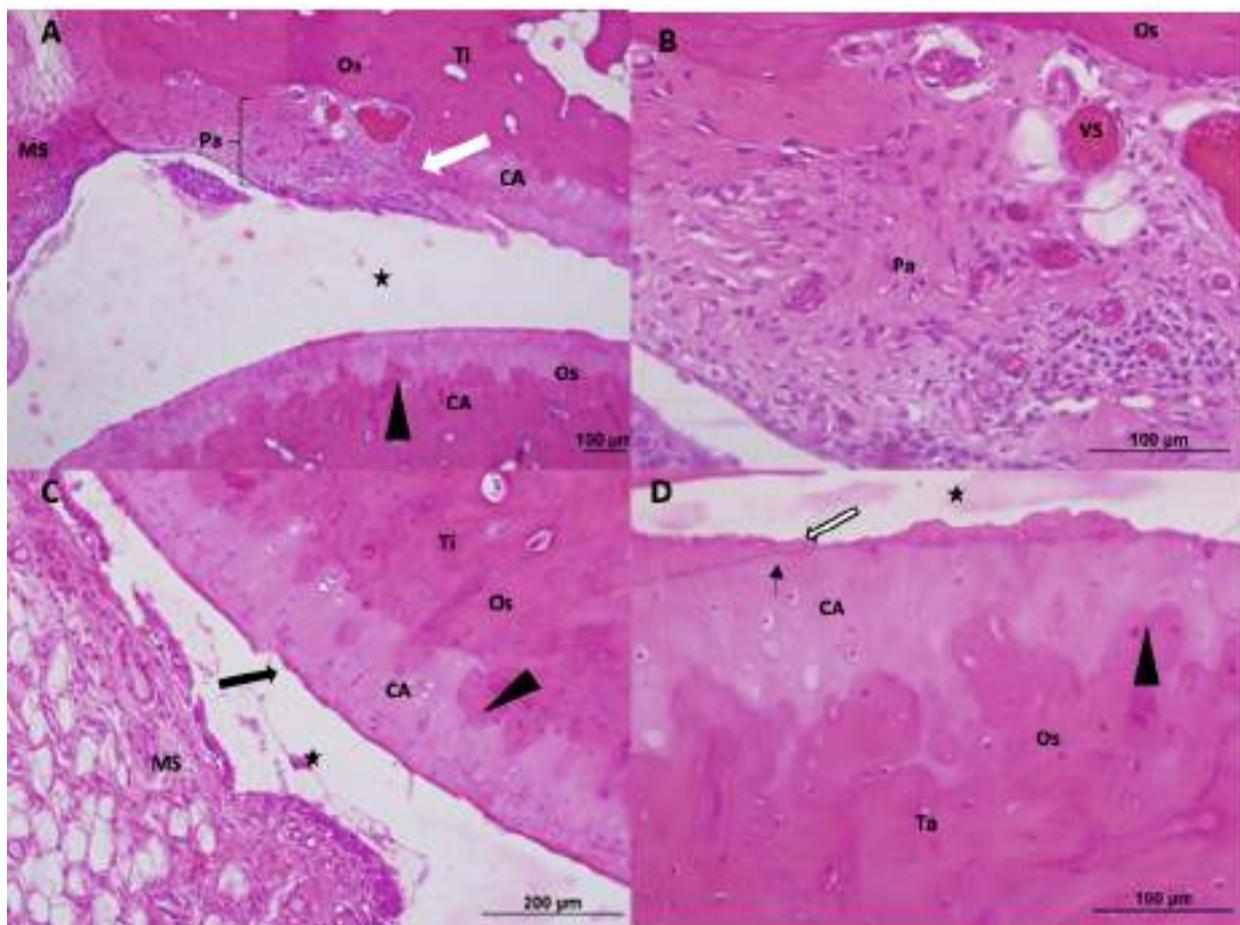


Corte sagital e coloração hematoxilina e eosina. **A**, Grupo Adultas 2 semanas – membro não alongado (GA2); **B**, Grupo Adultas 2 semanas – membro alongado (GA2); **C**, Grupo Adultas 4 semanas – membro não alongado (GA4); **D**, Grupo Adultas 4 semanas- Membro Alongado(GA4). Cartilagem articular (CA) da tíbia (Ti) e do tálus (Ta) com superfície lisa e condrócitos dispostos em camadas; *tidemark* (seta preta) e osso subcondral (Os) íntegros; Ampliação original 10X. Scale bar: 100µm.

Nos grupos de ratas envelhecidas de 2 e 4 semanas, nas articulações que não foram alongadas, a cartilagem articular se mostrou heterogênea quanto a sua morfologia, com animais apresentando as cartilagens da tíbia e do tálus com características semelhantes às ratas adultas (Figura 31) mas alguns animais mostraram alterações, pois 2 animais do GE2 e 2 do GA4 apresentaram

degradação da região articular posterior (P3) da tíbia e presença de *pannus* (Fig. 31A-B), floculação na superfície articular e invaginação do osso subcondral (Fig. 31-C). No tálus, principalmente na região articular média (P2), se verificou a invaginação do osso sucondral, clones de condrócitos, descontinuidade da *tidemark*, floculação da superfície articular e degradação na zona superficial (Fig. 31-D).

FIGURA 31 - FOTOMICROGRAFIAS DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ENVELHECIDAS- MEMBRO NÃO ALONGADO

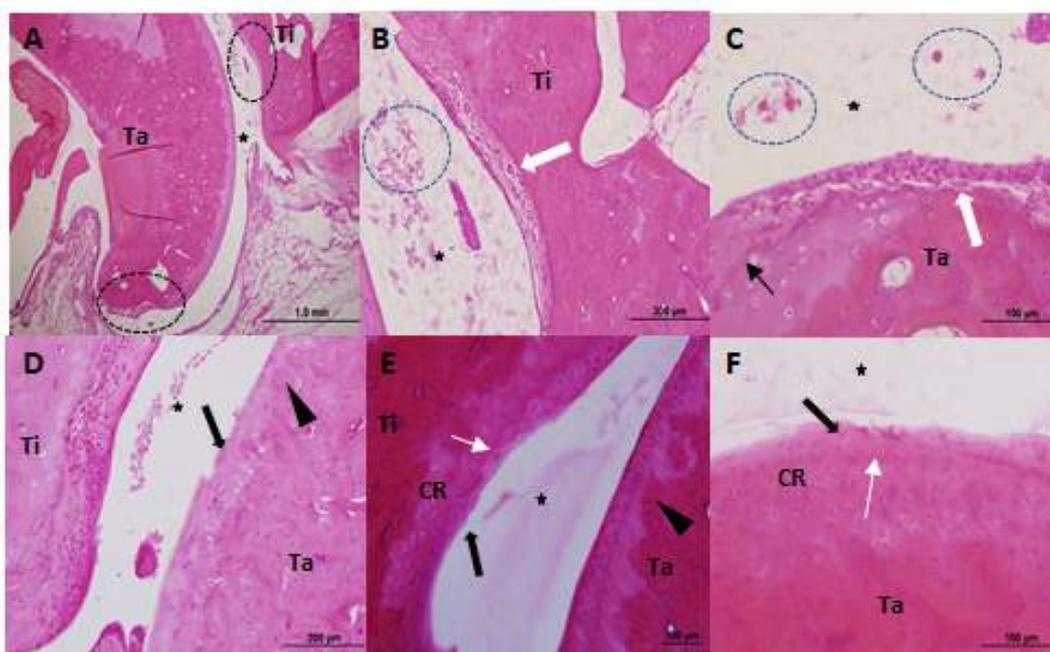


Corte sagital, coloração hematoxilina e eosina. A-B, Grupo envelhecido 2 semanas-membro não alongado (GE2). A: degradação da cartilagem articular na região articular posterior (P3) (seta branca), recoberta por *pannus* (Pa), invaginação do osso subcondral (ponta de seta); B: em detalhe o *pannus*, com intensa vascularização (Vs); C-D, Grupo envelhecido 4 semanas-membro não alongado (GE4), C: evidenciando invaginação do osso subcondral (ponta de seta), floculação da superfície articular (seta preta) e D: descontinuidade da *tidemark* (seta fina) e degradação da zona superficial da região articular média (P2) do Tálus. Ampliação original 10X. Scale bar: 100µm

Nos grupos envelhecidos de 2 e 4 semanas alongados (GE2 E GE4), a cartilagem também se mostrava com aspecto morfológico heterogêneo e não

foram encontrados animais com degradação da cartilagem na região P3 da tíbia, mas apresentavam desorganização das camadas de condrócitos. No entanto, 01 animal do grupo GE4 apresentou degradação da cartilagem na região articular anterior (P1) da Tíbia e do Tálus, sendo o osso subcondral recoberto pelo *pannus* (Fig. 32 A-C), e na região articular P3 da Tíbia e P2 do Tálus, hiper celularidade, desorganização das camadas de condrócitos, descontinuidade da *tidemark*, invaginação do osso subcondral e floculação da superfície articular (Fig. 32 D-F). Na cavidade articular foi visualizado células inflamatórias (Fig. 32 B-C).

FIGURA 32 - FOTOMICROGRAFIAS DA CARTILAGEM DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ENVELHECIDAS - MEMBRO LONGADO



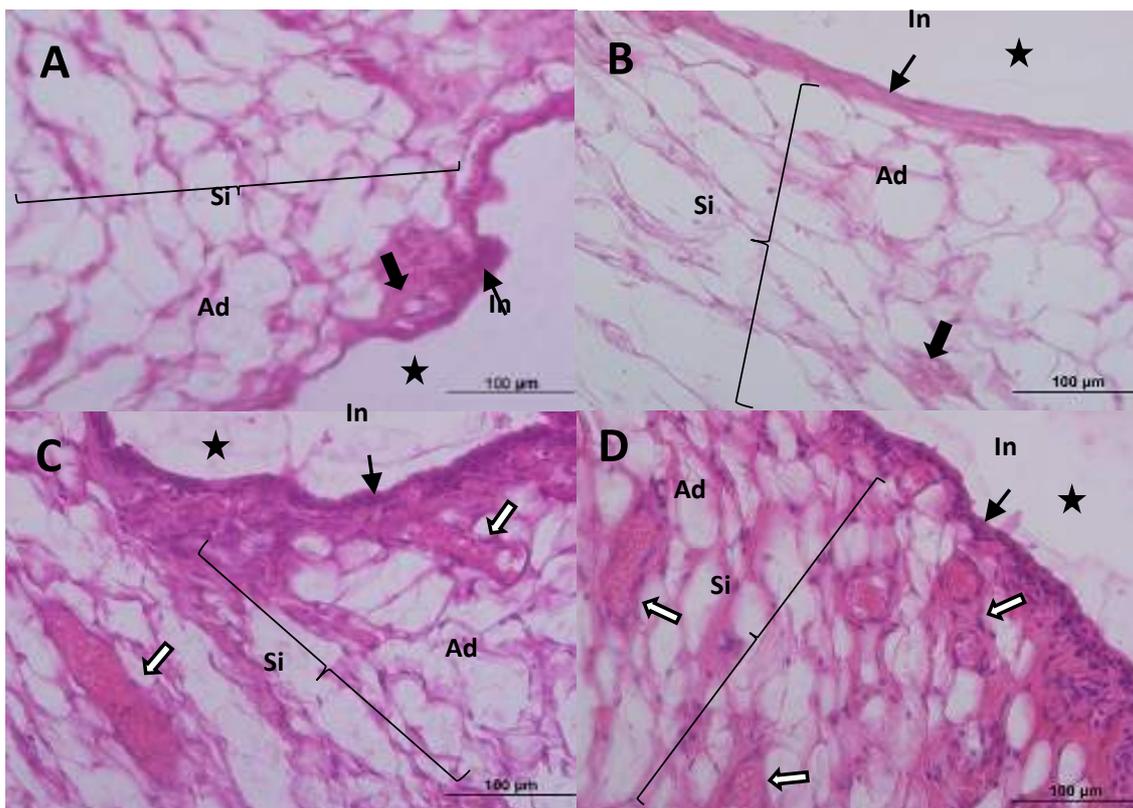
Corte sagital, coloração hematoxilina e eosina. A, B e C, Grupo envelhecidas 4 semanas – membro alongado (GE4) mostrando degradação da cartilagem articular na região articular posterior (P1) da Tíbia (Ti) e do Tálus (Ta) (círculo preto e seta branca), recoberta por *pannus* (Pa). D, E e F, Grupo envelhecidas 2 semanas (GE2) hiper celularidade de condrócitos (Hc), invaginação do osso subcondral (ponta de seta), floculação da superfície articular (seta preta), descontinuidade da *tidemark* (seta branca) e cavidade articular (estrela), com células inflamatórias (círculo azul). Ampliação original 10X. Scale bar: 100µm.

4.4.2 Análise morfológica da membrana sinovial

A membrana sinovial do membro não alongados dos grupos adultos 2 e 4 semanas (GA2 e GA4) se apresentou com características normais, com duas ou três camadas de sinoviócitos do tipo A e B na íntima e subíntima, com

predominância de células adiposas e vasos sanguíneos dentro da normalidade (Fig.33 A-B). Nas ratas adultas que foram alongadas (GA2 e GA4), a íntima e subíntima sinovial estavam semelhantes ao grupo não alongado, mas com intensa angiogênese e congestão vascular (Fig.33 C-D).

FIGURA 33 - FOTOMICROGRAFIAS DA MEMBRANA SINOVIAL DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ADULTAS

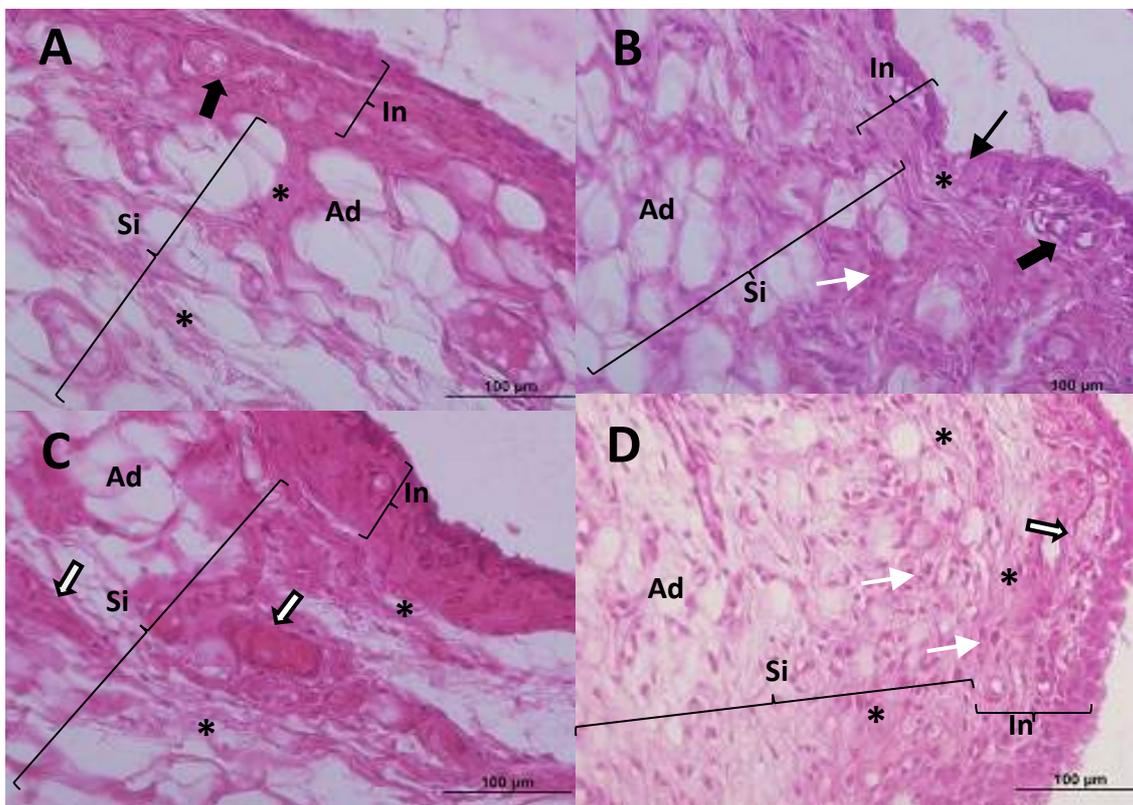


Corte sagital, coloração em hematoxilina e eosina. **A**, Grupo adulto 2 semanas GA2 (membro não alongado); **B**, Grupo adulto 4 semanas GA4 (membro não alongado); **C**, Grupo adulto 2 semanas GA2 (membro alongado); **D**, Grupo adulto 4 semanas GA4 (membro alongado). Em **A** e **B**, membrana com os sinoviócitos na íntima sinovial (In) e a subíntima (Si) com predominância de células adiposas (Ad) e capilares dentro da normalidade (seta preta). Em **C** e **D**, notar a intensa angiogênese com congestão vascular (seta vazada). Cavidade articular (estrela). Ampliação original 10X. Scale bar: 100μm.

Já no grupo das ratas envelhecidas, tanto as alongadas por 2 e 4 semanas (GE2 e GE4), quanto as não alongadas, verificou-se espessamento e aumento do número de sinoviócitos na íntima, diminuição do número de células adiposas e aumento de tecido conjuntivo na subíntima (Fig. 34 A-B). Ainda, o grupo alongado, apresentou angiogênese com congestão vascular e intenso processo

inflamatório nas camadas celulares e na cavidade articular caracterizando sinovite (Fig. 34 C-D).

FIGURA 34 - FOTOMICROGRAFIAS DA MEMBRANA SINOVIAL DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DAS RATAS ENVELHECIDAS



Corte sagital, coloração em hematoxilina e eosina. **A**, Grupo ratas envelhecidas 2 semanas- membro não alongado (GE2); **B**, Grupo ratas envelhecidas 4 semanas – membro não alongado (GE4); **C**, Grupo ratas envelhecidas 2 semanas – membro alongado (GE2); **D**, Grupo ratas envelhecidas 4 semanas- membro alongado (GE4). Em **A** e **B**, membrana com aumento do número de sinoviócitos e espessamento da íntima sinovial (In) e a subíntima (Si) com diminuição de células adiposas (Ad) e aumento de tecido conjuntivo (asterístico), capilares dentro da normalidade (seta preta). Em **C** e **D**, notar a intensa angiogênese com congestão vascular (seta vazada) e infiltrado inflamatório (seta branca).

4.5 TÍBIA

Para analisar os efeitos do alongamento no tecido ósseo, a área do osso, a área do canal medular, a espessura, o número de osteócitos e o número de lacunas cheias e lacunas vazias foram avaliadas.

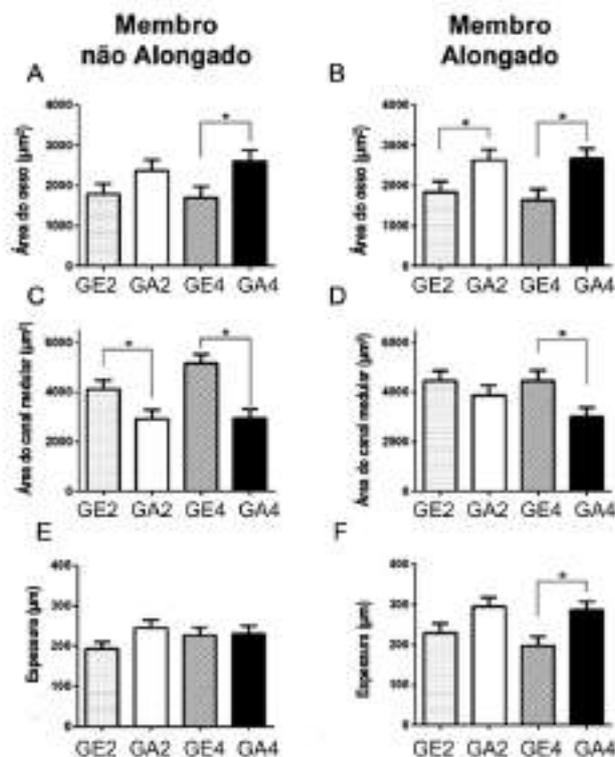
Não foi observada diferença significativa na área do osso, área do canal medular e espessura da tíbia do membro alongado em comparação ao membro não alongado em nenhum dos grupos (Figura 35)

A área do osso tíbia do membro não alongado foi menor no GE4 em comparação ao GA4 ($p=0,021$, ANOVA three way) (Figura 43-A), e no membro alongado, a área se mostrou menor em comparação aos grupos **adultos** nos grupos 2 semanas ($p=0,042$, ANOVA three way) e 4 semanas ($p=0,007$, ANOVA three way) (Figura 35-B).

Foi observada maior área do canal medular nos grupos **envelhecidos** em comparação aos grupos **adultos** nos grupos 2 semanas ($p=0,030$, ANOVA three way) e 4 semanas ($p=0,001$, ANOVA three way) no membro não alongado (Figura 35-C) e maior área do canal medular no GI4 em comparação ao GA4 na tíbia do membro alongado ($p=0,009$, ANOVA three way) (Figura 35-D).

Na espessura do osso, foi observada diferença significativa entre os grupos apenas na tíbia do membro alongado, entre os grupos GE4 e GA4 ($p=0,004$, ANOVA three way) (Figura 35-F).

FIGURA 35 - ÁREA DO OSSO E CANAL MEDULAR E ESPESSURA DA TÍBIA

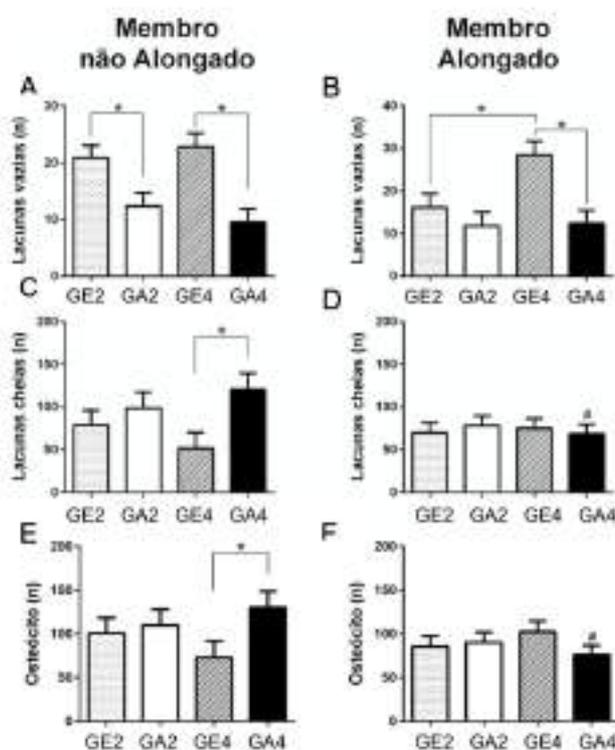


Comparação idade*protocolo*membro para área do osso(A-B), área do canal medular (C-D) e espessura (E-F); * $p<0,05$; comparação grupos; # $p<0,05$ comparação entre membro alongado e não alongado.

Na tíbia do membro não alongado foi observado maior número de lacunas vazias nos animais envelhecidos em comparação aos animais adultos, nos grupos 2 semanas ($p=0,034$, ANOVA three way) e 4 semanas ($p=0,002$, ANOVA three way). No membro alongado, foi observado maior número de lacunas vazias no GE4 em comparação ao GE2 ($p=0,004$, ANOVA three way) e GA4 ($p=0,001$, ANOVA three way).

Na tíbia do membro alongado foi observado maior número de lacunas cheias no GA4 em comparação ao GE4 ($p=0,003$, ANOVA three way). E como efeito do alongamento houve redução no número de lacunas cheias no GA4 ($p=0,020$; ANOVA three way; ES 0,95). Para o número de osteócitos, os mesmos resultados foram encontrados, com maior número de osteócitos no GA4 em comparação ao GE4 ($p=0,014$, ANOVA three way) e menor número de osteócitos na tíbia do membro alongado em comparação ao não alongado no GA4 ($p=0,015$, ANOVA three way; ES 0,99) (Figura 36).

FIGURA 36 - LACUNAS VAZIAS, LACUNAS CHEIAS E ÓSTEÓCITOS



Comparação idade*protocolo*membro para número de lacunas vazias (A-B), número de lacunas cheias (C-D) e número de osteócitos (E-F); * $p<0,05$; comparação grupos; # $p<0,05$ comparação entre membro alongado e não alongado.

4.5.1 Análise morfológica da tíbia

As análises dos cortes transversais das diáfises das tíbias das ratas envelhecidas, de ambos os grupos (GE2 e GE4) e de ambos os membros (alongado e membro não alongado), apresentaram morfologia tecidual alterada, o que diferiu muito da configuração padrão observada nas ratas adultas, o que evidencia os efeitos do envelhecimento no tecido ósseo.

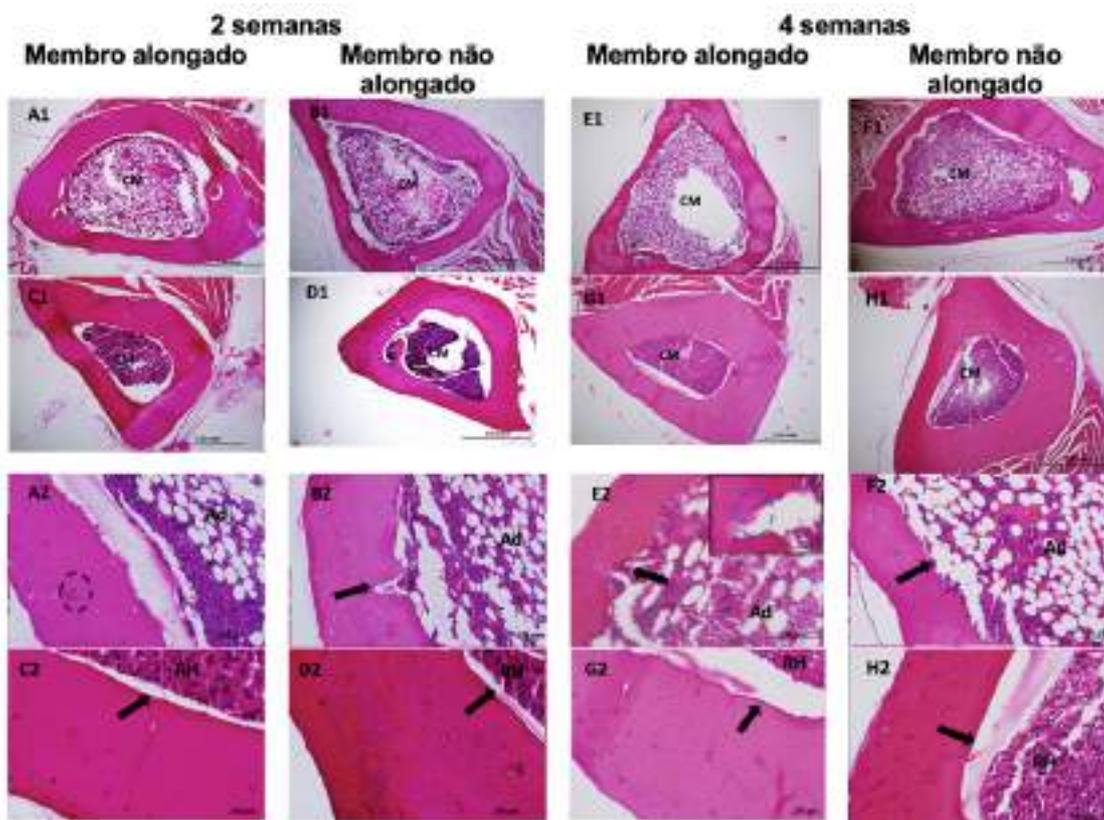
O canal medular apresentou -se com formato alterado em que a medula óssea exibia predominância de tecido adiposo unilocular e presença reduzida de tecido conjuntivo reticular mielóide e de megacariócitos (Fig. 37 A1, B1, E1 e F1). A margem endosteal apresentava visíveis irregularidades, com presença de reentrâncias reabsortivas perfurantes na zona cortical interna (CI), que estava com espessura reduzida, onde foram encontrados osteoclastos denotando reabsorção óssea (Fig 37 A2, B2, E2 e F2).

Na matriz extracelular (MEC), nas zonas cortical externa (CE) adjacente à superfície periosteal e cortical média (CM), foram observadas alterações na organização das camadas lamelares, pois apresentavam-se distribuídas de forma irregular. Foram observadas diferenças morfológicas nas lacunas ósseas, destacando-se o aumento de lacunas vazias e hipertrofiadas, distribuídas aleatoriamente dentre as regiões corticais. Ainda, o sistema harvesiano mostrou-se com área aumentada e congestão sanguínea no seu interior (Figura. 39 A3, B3, E3 e F3). Na margem periosteal visualizou-se linhas basofílicas marcantes e o perióstio com notáveis alterações, onde a camada osteogênica se mostrava pouco delimitada e desorganizada e a camada fibrilar eosinofílica espessa, rica em fibras colágenas (Figura.38 A4, B4, E4 e F4).

Por outro lado, os cortes transversais das tíbias de todos os animais adultos (GA2 e GA4), alongados e não alongados, apresentaram morfologia dentro da normalidade de configuração tecidual. A diáfise em corte transversal apresentou-se com delimitação precisa, diâmetro e formato do canal medular íntegro (Figura. 37 C1, D1, G1 e H1). A margem endosteal mostrou-se de aspecto liso, contendo a medula óssea com predominância de tecido conjuntivo reticular hematopoiético (Fig. 37 C2, D2, G2 e H2). O osso cortical compacto preservado, com espessura e distribuição da (MEC) com aspecto regular e as

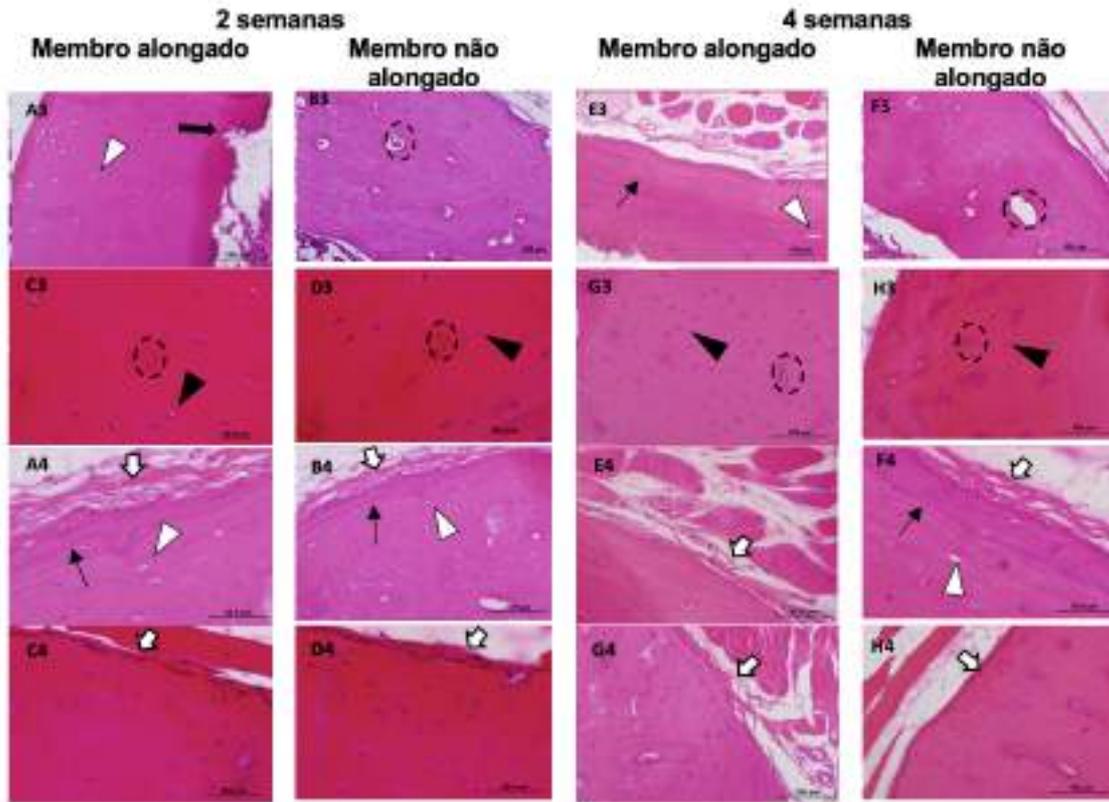
zonas em organização padrão, visivelmente com maior espessura que os animais dos grupos idosos. As lacunas mostraram estar dispostas em padrão definido e a maioria, com osteócitos no seu interior (Fig. 38 C3, D3, G3 e H3). A margem periosteal e as camadas multicelulares que revestem externamente o osso cortical estavam com a camada osteogênica e de tecido conjuntivo denso modelado inalteradas e hegemonicamente delimitados (Fig. 38 C4, D4, G4 e H4).

FIGURA 37 - FOTOMICROGRAFIA DA SECÇÃO TRANSVERSAL DA DÍAFISE DA TÍBIA



Coloração em hematoxilina e eosina. GE2 membro alongado (A1-A2); GE2 membro não alongado (B1-B2); GA2 membro alongado (C1-C2); GA2 membro não alongado (D1-D2); G4; membro alongado (E1-E2); GE4 membro não alongado (F1-F2); GA4 membro alongado (G1-G2); GA4 membro não alongado (H1-H2). Canal medular (CM), medula óssea com predominância de tecido adiposo (Ad) e conjuntivo reticular hematopoiético (RH), margem e camada endosteal (seta preta). No detalhe da E2, osteoclasto realizando a reabsorção óssea na margem endosteal (círculo azul).

FIGURA 38 - FOTOMICROGRAFIA DA SECÇÃO TRANSVERSA DA DIÁFISE DA TÍBIA



Coloração em hematoxilina e eosina. GE2 membro alongado (A3-A4); GE2 membro não alongado (B3-B4); GA2 membro alongado (C3-C4); GA2 membro não alongado (D3-D4); GE4; membro alongado (E3-E4); GE4 membro não alongado (F3-F4); GA4 membro alongado (G3-G4); GA4 membro não alongado (H3-H4). Margem e camada endosteal (seta preta), margem periosteal e periosteio (setas brancas), com suas camadas osteogênica (interna) e de tecido conjuntivo denso modelado (externa) lacunas ósseas vazias (ponta de seta branca), lacunas ósseas com osteócito (ponta de seta preta), canais harvesiano (circulo tracejado), linhas basofílicas (seta fina).

4.6 SÍNTESE DOS RESULTADOS

FIGURA 39 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS

Resumo dos efeitos do alongamento passivo sobre a histomorfometria muscular	Desfechos	GE2 membro alongado vs não alongado	GA2 membro alongado vs não alongado	GE4 membro alongado vs não alongado	GA4 membro alongado vs não alongado
	Massa muscular	↔	↔	↔	↔
	Massa muscular relativa à massa corporal	↔	↔	↔	↔
	ASTFM	ES 0,66 p=0,001 ↓	ES 0,24 p=0,001 ↓	ES 0,42 p=0,005 ↓	↔
	Comprimento muscular (mm)	↔	↔	↔	↔
	Número de sarcômeros em série	↔	↔	↔	↔
	Comprimento do sarcômero	↔	↔	↔	↔
	Imunomarcagem de Colágeno 1	↔	↔	↔	ES 0,41 p=0,010 ↓
	Imunomarcagem de Colágeno 3	↔	↔	ES 0,41 p=0,013 ↑	↔
	Imunomarcagem de TGF-β1	↔	↔	ES 0,62 p=0,001 ↓	↔
	Imunomarcagem de TNF-α	↔	↔	ES 0,45 p=0,001 ↑	ES 0,78 p=0,003 ↓

Flecha roxa: Menor em comparação ao sóleo contralateral. Flecha verde: Maior em comparação ao sóleo contralateral. Flecha bidirecional preta: Sem diferença. ES: *Effect size*.

FIGURA 40 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NO NÚMERO DE CONDRÓCITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS

Resumo dos efeitos do alongamento passivo sobre a histomorfometria da cartilagem articular	Desfechos	GE2 membro alongado vs não alongado	GA2 membro alongado vs não alongado	GE4 membro alongado vs não alongado	GA4 membro alongado vs não alongado
	Condrócitos da região anterior (P1) cartilagem da tibia	↔	↔	↔	↔
	Condrócitos da região média (P2) cartilagem da tibia	↔	↔	↔	↔
	Condrócitos da região posterior (P3) cartilagem da tibia	↔	↔	↔	↔
	Condrócitos da região anterior (P1) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔
	Condrócitos da região média (P2) cartilagem do tálus	↔	↔	ES 1,11 p=0,034 ↑	↔
	Condrócitos da região posterior (P3) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔

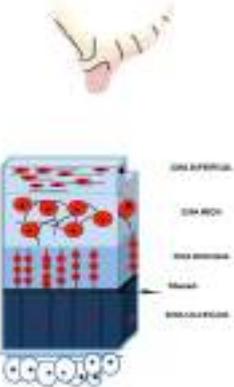
Flecha verde: Maior em comparação ao músculo contralateral. Flecha bidirecional preta: Sem diferença. ES: *Effect size*.

FIGURA 41 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA ESPESSURA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS

Resumo dos efeitos do alongamento passivo sobre a histomorfometria da cartilagem articular	Desfechos	GE2 membro alongado vs não alongado	GA2 membro alongado vs não alongado	GE4 membro alongado vs não alongado	GA4 membro alongado vs não alongado
	Espessura total da região anterior (P1) cartilagem da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Espessura total da região média (P2) cartilagem da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Espessura total da região posterior (P3) cartilagem da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Espessura total da região anterior (P1) cartilagem da tálus	↔	↔	↔	↔
	Espessura total da região média (P2) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔
	Espessura total da região posterior (P3) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔

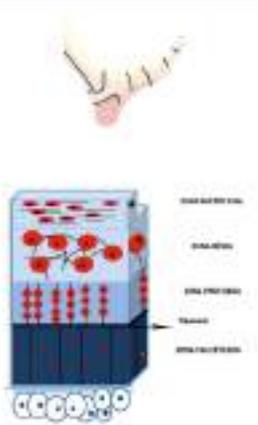
Flecha bidirecional preta: Sem diferença.

FIGURA 42 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA ESPESSURA DA ZONA SUPERFICIAL DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS

Resumo dos efeitos do alongamento passivo sobre a histomorfometria da cartilagem articular	Desfechos	GE2 membro alongado vs não alongado	GA2 membro alongado vs não alongado	GE4 membro alongado vs não alongado	GA4 membro alongado vs não alongado
	Espessura Zona superficial da região anterior (P1) cartilagem da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona superficial da região média (P2) cartilagem da tíbia	↔	ES 1,37 P=0,028 ↑	↔	↔
	Espessura Zona superficial da região posterior (P3) cartilagem da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona superficial da região anterior (P1) cartilagem da tálus	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona superficial da região média (P2) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona superficial da região posterior (P3) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	ES 1,85 P=0,045 ↓

Flecha roxa: Menor em comparação ao membro contralateral. Flecha verde: Maior em comparação ao membro contralateral. Flecha bidirecional preta: Sem diferença. ES: *Effect size*.

FIGURA 43 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA ESPESSURA DA ZONA PROFUNDA DA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATAS ADULTAS E ENVELHECIDAS

Resumo dos efeitos do alongamento passivo sobre a histomorfometria da cartilagem articular	Desfechos	GE2 membro alongado vs não alongado	GA2 membro alongado vs não alongado	GE4 membro alongado vs não alongado	GA4 membro alongado vs não alongado
	Espessura Zona profunda da região anterior (P1) cartilagem da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona profunda da região média (P2) cartilagem da tíbia	↔	ES 1,04 P=0,003 ↓	↔	↔
	Espessura Zona profunda da região posterior (P3) cartilagem da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona profunda da região anterior (P1) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona profunda da região média (P2) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔
	Espessura Zona profunda da região posterior (P3) cartilagem do tálus	↔	↔	↔	↔

Flecha roxa: Menor em comparação ao membro contralateral. Flecha bidirecional preta: Sem diferença. ES: *Effect size*.

FIGURA 44 - EFEITOS DO ALONGAMENTO PASSIVO NA HISTOMORFOMETRIA DA TÍBIA

Resumo dos efeitos do alongamento passivo sobre a histomorfometria da tíbia	Desfechos	GE2 membro alongado vs não alongado	GA2 membro alongado vs não alongado	GE4 membro alongado vs não alongado	GA4 membro alongado vs não alongado
	Área da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Área do canal medular	↔	↔	↔	↔
	Espessura da tíbia	↔	↔	↔	↔
	Número de osteócitos	↔	↔	↔	ES 0,99 P=0,0015 ↓
	Número de lacunas cheias	↔	↔	↔	ES 0,95 P=0,0020 ↓
	Número de lacunas vazias	↔	↔	↔	↔

Flecha roxa: Menor em comparação ao membro contralateral. Flecha bidirecional preta: Sem diferença. ES: *Effect size*.

5 . DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de 6 e 12 sessões de alongamento passivo estático na histomorfometria do músculo sóleo, articulação talocrural e tíbia de ratas fêmeas adultas e envelhecidas. Para isso, as ratas foram submetidas à 3 sessões semanais de alongamento passivo, durante 2 e 4 semanas.

As ratas envelhecidas (GE2 e GE4) apresentaram maior massa corporal inicial e final em comparação às adultas (GA2 e GA4) e redução da massa corporal foi observada apenas nas ratas envelhecidas (GE2 e GE4) ao final do experimento. É relatado que tanto roedores quanto humanos exibem aumento linear da massa corporal com a idade. No ambiente de laboratório, camundongos alimentados *ad libitum* normalmente experimentam pico na massa corporal por volta dos 20 a 24 meses de idade, enquanto os ratos, como resultado de uma vida útil mais longa experimentam esse pico mais tarde, por volta dos 24 a 32 meses de idade (PAPPAS; NAGY, 2019). Dessa forma, a diferença observada na massa corporal inicial pode ser justificada pela idade do animal pois as ratas envelhecidas possuíam 28 meses de idade, enquanto as ratas adultas tinham 3 meses.

Sobre a redução da massa corporal após o experimento, resultados semelhantes também foram observados em outros estudos com ratos envelhecidos (RADER et al., 2016; MASSENZ et al., 2020). Nossos resultados mostraram que a redução da massa corporal ocorreu apenas nas envelhecidas, mesmo tendo sido mantida a continuidade das atividades regulares na gaiola durante todo o período do experimento, indicando que a perda de peso observada é um marcador da senescência.

Animais envelhecidos são considerados modelos experimentais da sarcopenia. Modelos de roedores envelhecidos são os mais naturais e têm várias vantagens em comparação com outros modelos de sarcopenia, como os modelos que fazem suspensão dos membros posteriores e modelos de atrofia por desuso (BAEK et al., 2020). Roedores envelhecidos têm morbidades e mecanismos bastante semelhantes aos encontrados em humanos com

sarcopenia, mas o custo elevado e a limitada disponibilidade de roedores envelhecidos tornam o uso deste modelo difícil (BAEK et al., 2020).

Após a análise da caracterização da amostra do presente estudo, a discussão dos resultados desse trabalho será realizada em tópicos específicos para cada componente do sistema osteomioarticular. O protocolo de alongamento utilizado nesse estudo simula parâmetros de prescrição frequentemente utilizados na prática de fisioterapeutas e profissionais de educação física, mas inclui a avaliação da força aplicada para realizar o alongamento por meio de uma célula de carga que permitiu estimar a intensidade do alongamento.

Não foi observada diferença entre os grupos na força total aplicada para alongar o músculo sóleo entre ratas envelhecidas e ratas adultas, o que indica que a intensidade utilizada nos dois protocolos para ratas de diferentes idades foi a mesma. No entanto, quando analisada individualmente cada sessão, foi observado que maior força foi aplicada para alongar o músculo sóleo envelhecido nas primeiras sessões em ambos os protocolos enquanto nas últimas sessões, foi aplicada maior força nas ratas adultas. Tal achado pode ser atribuído a menor amplitude de movimento da articulação talocrural das ratas envelhecidas o que exigiu que maior força fosse aplicada para posicionar a articulação em posição de dorsiflexão máxima (MARCUCCI; REGGIANI, 2020).

Outro motivo que pode justificar maior força necessária para alongar o músculo envelhecido é a rigidez muscular aumentada como consequência às alterações relacionadas à idade na MEC do músculo esquelético (STEARNS-REIDER et al., 2017). O músculo envelhecido apresenta maior resistência ao alongamento devido a maior quantidade de colágeno e consequente espessamento da MEC em comparação ao músculo jovem (PAVAN et al., 2020).

Os efeitos ao mesmo estímulo do alongamento na adaptação do músculo, cartilagem e osso serão discutidos nos tópicos abaixo.

5.1 MÚSCULO:

É sugerido que o alongamento fornece estímulos mecânicos e respostas metabólicas ao músculo, importantes para o crescimento muscular (NUNES et

al., 2020). Nesse sentido, esse estudo verificou as respostas à carga imposta pelo alongamento passivo, durante 6 e 12 sessões na massa muscular, área de secção transversa da fibra muscular, comprimento muscular, número de sarcômeros em série e comprimento do sarcômero.

Não foi observada diferença significativa entre o sóleo alongado e não alongado em nenhum dos grupos analisados para os desfechos massa muscular absoluta e massa muscular relativa. A diferença observada para esses desfechos foi encontrada apenas entre o GE4 e GA4 na massa muscular absoluta, onde o GE4 apresentou maior massa muscular que o GA4 no sóleo contralateral não alongado. Da mesma forma que a massa corporal de ratos atinge o pico por volta dos 24-32 meses, a massa livre de gordura também atinge o pico durante a velhice (PAPPAS; NAGY, 2019), o que está de acordo com os resultados do presente estudo, pois as ratas envelhecidas apresentaram maior massa muscular absoluta que as ratas adultas, embora a significância estatística tenha sido observada apenas nos grupos 4 semanas.

Também foi observada diferença significativa na massa muscular relativa à massa corporal do sóleo contralateral não alongado, entre GA2 e GE2, indicando maior massa no grupo adulto em comparação ao grupo envelhecido. A massa muscular relativa é um indicador do trofismo muscular e nesse caso, observou-se maior trofismo no sóleo das ratas jovens.

Os resultados também mostraram que não houve diferença entre o sóleo alongado e não alongado em nenhum dos grupos para o comprimento muscular, o que indica que 6 ou 12 sessões de alongamento passivo prescritos não foram suficientes para promover a alteração do comprimento muscular.

Dessa forma, 6 e 12 sessões de alongamento passivo não promoveram resposta na massa muscular e comprimento muscular do sóleo de ratas jovens e idosas. No entanto, a medida da área de secção transversa das fibras musculares e o número de sarcômeros em série são os métodos mais precisos para avaliar o trofismo muscular em paralelo e em série (GOMES et al., 2004), portanto, esses desfechos também foram investigados.

Foi observado menor ASTFM do sóleo alongado em comparação ao sóleo não alongado nos grupos GE2, GA2, GE4. A diferença na ASTFM observada

entre sóleo alongado e o contralateral foi de 26,49% no GE2, de 16,88% no Ge4 e de 8,02% no GA2.

Menor ASTFM do sóleo após exercício de alongamento também foi observada em estudos prévios realizados com animais envelhecidos. Com 3 sessões de exercício e força aplicada de $0,48N \pm 0,04$ a diferença foi de 17% entre grupo alongamento e grupo controle (ZOTZ et al., 2016), e com 9 sessões e força aplicada de $0,91 \pm 0,10$ a diferença foi de 6% (MASSENZ et al., 2020). No presente estudo, em 6 sessões e força aplicada de $1,03N \pm 0,33$, a diferença foi de 26,49% e em 12 sessões e força aplicada de $1,11 \pm 0,28$, a diferença foi de 16,88%. É importante frisar que nos estudos citados, a comparação da ASTFM do sóleo foi realizada com grupo controle, enquanto no presente estudo a comparação foi com o sóleo contralateral.

A redução da ASTFM do sóleo alongado em comparação ao sóleo contralateral também foi relatada por Gomes et al (2004) em ratos submetidos a uma única sessão semanal de alongamento, o que corrobora com os achados do presente estudo. Importante analisar o fato que o modelo experimental utilizado por Gomes et al (2004) foi ratos machos jovens, e o protocolo de alongamento consistiu em uma sessão semanal, com duração de 40 minutos, realizadas durante 3 semanas utilizando uma fita adesiva para manter o alongamento. De forma semelhante aos nossos achados, os referidos autores também não observaram diferença na massa muscular absoluta o que poderia ser consequência ao pequeno número de fibras musculares em estado de atrofia, e que provavelmente não foi suficiente para produzir mudanças significativas no peso muscular absoluto.

Portanto, redução da ASTFM com o exercício de alongamento passivo é um achado intrigante, especialmente no músculo envelhecido, uma vez que esse tipo de exercício é rotineiramente prescrito e praticado por essa população. Estudos realizados com ratas ovariectomizadas e histerectomizadas, que são modelos experimentais de envelhecimento, mostraram aumento da ASTFM após exercício de alongamento passivo realizado manualmente. Em um destes estudos, as ratas foram submetidas a 10 minutos de alongamento, duas vezes por semana durante 6 semanas, totalizando 12 sessões (YWAZAKI et al., 2016) e no outro estudo, ratas ovariectomizadas foram submetidas à 9 sessões

realizadas 3 vezes por semana, durante 3 semanas, com cada sessão consistindo em 1 série de 10 repetições e cada repetição durando 45 segundos (VIDAL et al., 2020). Analisando esses estudos observa-se que a prescrição utilizada é bastante variada, com estudos apresentando a atrofia muscular como efeito do alongamento passivo enquanto outros apresentam hipertrofia.

Os efeitos do alongamento passivo no trofismo muscular foram investigados, com relato de aumento da expressão da myo-D, miostatina e atrogina no sóleo de ratos submetidos a uma única sessão de alongamento e aumento da expressão de miostatina após 7 sessões e da atrogina após 2, 3 e 7 sessões. Dessa forma, o alongamento passivo mostrou aumentar a expressão de genes associados com crescimento muscular, reguladores negativos da massa muscular e atrofia, o que indica que o alongamento causa a remodelação das fibras musculares e interfere nas vias de hipertrofia e atrofia (PEVIANI et al., 2007).

No presente estudo, redução da ASTFM induzida pelo alongamento foi maior nas ratas envelhecidas, mas foi amenizada no grupo que foi submetido à 12 sessões. Por outro lado, nas ratas adultas a redução foi observada apenas no grupo submetido à 6 sessões, enquanto no grupo exposto à 12 sessões de alongamento passivo, não houve efeito na ASTFM. Diante desses resultados, pode-se propor que o alongamento passivo regula a ASTFM de maneira diferente em músculos normais envelhecidos e adultos.

Na comparação entre os grupos, o músculo sóleo das ratas adultas e envelhecidas que foi alongado por 12 (GE4 e GA4) sessões apresentou maior ASTFM em comparação ao sóleo das ratas que foram alongados por 6 sessões (GE2 e GA2). No protocolo de 12 sessões, não houve diferença entre as ratas adultas e envelhecidas, mas nos animais que foram alongados por 6 sessões, o GA2 apresentou menor ASTFM. Esses achados indicam que embora tenha sido observada menor ASTFM com o exercício de alongamento, no protocolo de 12 sessões esse efeito foi amenizado nas ratas adultas e envelhecidas, mas no GA2 a diferença foi pequena quando comparada com a diferença observada nos grupos envelhecidos. Esses resultados mostraram que o efeito do alongamento na área da fibra muscular foi dependente do número de sessões e da idade, ou

seja, a porcentagem de redução da ASTFM foi menor nas ratas adultas alongadas por 6 sessões e ratas envelhecidas alongadas por 12 sessões.

Analisando individualmente o GA2, que foi o que apresentou menor ASTFM, foi observado que esses animais apresentaram além de menor ASTFM em comparação aos outros grupos, menor comprimento muscular em comparação ao GE2, no sóleo alongado e não alongado. No entanto, quando analisada a massa muscular relativa à massa corporal, o GA2 apresentava maior massa relativa no sóleo não alongado em comparação ao GE2. Ainda, analisando a diferença na ASTFM do sóleo alongado e não alongado, o GA2 mostrou diferença de 8,02%, porcentagem substancialmente menor à observada nos grupos envelhecidos.

A avaliação da ASTFM fornece uma medida mais sensível das alterações no tamanho do músculo esquelético quando comparada à análise da massa muscular absoluta ou relativa. Assim, os valores mais altos da ASTFM observadas nas ratas envelhecidas provavelmente indicam um valor que reflete o pico de massa muscular que ocorre nesta faixa etária (MOBLEY et al., 2017; PAPPAS; NAGY, 2019).

Dessa forma, a resposta hipotrófica do músculo adulto ao alongamento nas primeiras 2 semanas foi transitória, já que com 4 semanas observou-se hipertrofia enquanto o músculo envelhecido alongado por 2 semanas apresentou 300% mais hipotrofia do que o músculo adulto. Para confirmar que o efeito hipotrófico do alongamento é tempo-dependente, percebe-se que a hipotrofia do músculo envelhecido em resposta ao alongamento, após 4 semanas, foi 35% menor. Além do músculo adulto ser menos sensível ao efeito hipotrófico do alongamento, após 4 semanas de alongamento o sóleo adulto já apresentou aumento de massa, demonstrando novamente que o efeito hipotrófico do alongamento é tempo-dependente, sendo revertido para o adulto provavelmente em 3 semanas, pois com 4 semanas observamos efeito hipertrófico. Com as devidas ressalvas e limitações de extrapolação para humanos e para a prática clínica, podemos sugerir que o alongamento, seja em adultos ou idosos, seja realizado por pelo menos 4 semanas, para que os efeitos do alongamento no músculo esquelético possam contribuir com o ganho de amplitude de

movimento, já que normalmente é assim q mensuramos os efeitos do alongamento.

Ainda, não foi encontrada diferença entre o sóleo alongado e não alongado em nenhum dos grupos no número de sarcômeros em série e comprimento do sarcômero, ou seja, o alongamento realizado por 2 ou 4 semanas, não estimulou o crescimento longitudinal. Dessa forma, a força aplicada para alongar o músculo envelhecido 3 vezes por semana durante 2 ou 4 semanas e a força aplicada para alongar o músculo adulto 3 vezes por semanas durante 2 semanas, promoveu diminuição na área da secção transversa sem modificação nos sarcômeros em série. Esses resultados apontam que o protocolo de alongamento investigado no presente estudo não estimulou o crescimento muscular nas ratas adultas ou nas ratas idosas.

Sarcomerogênese é a adição de sarcômeros em série na miofibrila, e é um desfecho bastante investigado em estudos sobre alongamento. A sarcomerogênese foi observada após 15 dias de alongamento passivo, que consistiu em 10 repetições de 1 minuto de duração, uma vez ao dia, durante 15 dias em ratos jovens (PEVIANI et al., 2018), ao passo que uma sessão de alongamento por semana, com 40 minutos de duração, não alterou o número de sarcômeros em série no sóleo de ratos jovens (GOMES et al., 2004), mas o alongamento realizado a cada 3 dias por 40 minutos aumentou o número de sarcômeros em série em comparação com o músculo contralateral (COUTINHO et al., 2004). Dessa forma, estudos que mostraram sarcomerogênese foram aqueles com maior tempo de duração da sessão e maior número de sessões, o que pode indicar que o tempo de 4 minutos de duração de cada sessão utilizado no presente estudo não foi suficiente para promover crescimento longitudinal.

No entanto, diferença significativa no número de sarcômeros em série foi observada entre as ratas adultas do experimento de 2 semanas e 4 semanas, no sóleo alongado e sóleo não alongado. As ratas do grupo 4 semanas apresentaram menor número de sarcômeros no sóleo de ambas as patas demonstrando se tratar de uma característica dos animais, já que mesmo com a exposição ao alongamento não houve mudança, ou seja a diferença observada no sóleo controle foi a mesma observada no sóleo alongado.

A metodologia do presente estudo ainda permitiu a investigação das mudanças relacionadas à idade e dos efeitos do exercício de alongamento passivo no tecido conjuntivo do músculo sóleo, com investigação da área de tecido não contrátil intramuscular e da expressão dos principais tipos de colágenos intersticiais do músculo esquelético, o colágeno 1 e 3, analisados por meio da técnica de imunohistoquímica. Os exercícios de alongamento têm sido tradicionalmente usados no tratamento da hipomobilidade, com base no princípio biológico de que o tecido conjuntivo se remodelará com o tempo em resposta ao estresse físico (JACOBS; SCIASCIA, 2011).

Foi verificado como efeito do alongamento, menor porcentagem de imunomarcção do colágeno 1 no sóleo alongado do GA4 em comparação ao sóleo contralateral, e maior imunomarcção de colágeno 3 no sóleo alongado do GE4 também em comparação ao sóleo contralateral. É relatado que parte da adaptação do músculo ao exercício, desuso e lesão por sobrecarga envolve mudanças no tecido conjuntivo intramuscular (PURSLOW, 2020), e a forma e magnitude de estresse mecânico atuando nas células sintetizadoras da MEC afeta a qualidade e quantidade da MEC. A matriz extracelular do músculo é de natureza dinâmica e acredita-se que responda ao estresse mecânico (KOVANEN, 2002), o que foi observado no grupo de ratas que foram submetidas à 12 sessões de alongamento passivo.

O envelhecimento e o treinamento físico são conhecidos por afetar as propriedades físicas e bioquímicas de diferentes tecidos conjuntivos, incluindo o tecido conjuntivo muscular (TAMAKI; HIRATA; UCHIYAMA, 2014), o que está de acordo com os achados do presente estudo, pois o protocolo com maior número de sessões e a idade mostraram causar adaptações na MEC, com alterações na porcentagem de imunomarcção do colágeno 1 e 3.

As respostas ao exercício mostraram menor imunomarcção de colágeno 1 no sóleo de ratas adultas e maior imunomarcção de colágeno 3 no sóleo de ratas envelhecidas, enquanto às adaptações relacionadas à idade foram maior imunomarcção de colágeno 1 e 3 no sóleo alongado e não alongado das ratas envelhecidas em comparação às adultas (ambos os grupos).

Os colágenos tipo 1 e 3 são os tipos de colágenos fibrilares mais abundantes no músculo esquelético, tendo sido sugerido que juntos representam

aproximadamente 75% do total do colágeno muscular (CSAPO; GUMPENBERGER; WESSNER, 2020). As fortes fibras paralelas de colágeno tipo 1, que estão presentes no endomísio, perimísio e epimísio, impõem resistência à tração e rigidez ao músculo, enquanto o colágeno tipo 3 forma uma malha frouxa de fibras que confere elasticidade ao endomísio e perimísio (KOVANEN, 2002).

O efeito observado de menor imunomarcagem de colágeno 1 no sóleo alongado das ratas adultas com 12 sessões de alongamento pode indicar redução da resistência à tração e rigidez do tecido, propriedades conferidas pelo colágeno 1, o que resulta em aumento da extensibilidade do tecido. O aumento da extensibilidade do tecido repercute em aumento da amplitude de movimento, efeito clínico do alongamento amplamente observado e relatado (HARVEY; HERBERT; CROSBIE, 2002; MEDEIROS; MARTINI, 2018). Ainda, é sugerido que o exame clínico da amplitude de movimento do paciente reflita principalmente as propriedades da MEC (GILLIES et al., 2012).

Embora o tipo de colágeno responsivo ao alongamento nas ratas idosas tenha sido o colágeno 3, e de acordo com suas propriedades de conferir elasticidade ao endomísio e perimísio, o efeito do alongamento no músculo envelhecido também pode indicar aumento da extensibilidade como efeito do alongamento passivo. Uma característica do colágeno tipo 3 é que ele está correlacionado à extensibilidade dos tecidos e pode contribuir para a elasticidade, uma propriedade que está unicamente ligada a este tipo de colágeno (KARSDAL et al., 2013). Estudo anterior também relatou melhora da extensibilidade em resposta ao alongamento passivo, decorrente do aumento da concentração de colágeno 3 (CAÇÃO-BENEDINI et al., 2013).

Quando aumento na extensibilidade muscular é observado, é possível que seja devido a uma simples diminuição na rigidez muscular ou aumento no comprimento muscular (WEPPLER; MAGNUSSON, 2010). O alongamento passivo suaviza a rigidez do tecido muscular, pois a resistência passiva é influenciada pela deformação (alongamento) do tecido conjuntivo do ventre muscular em resposta ao alongamento (PEVIANI et al., 2018).

Dessa forma, o alongamento passivo realizado em 12 sessões promoveu alteração na composição do tecido conjuntivo, e essa alteração foi dependente

da idade. É interessante retornar aos resultados da análise do comprimento muscular, comprimento do sarcômero e número de sarcômeros em série e verificar que não houve alteração desses desfechos com o alongamento. Assim, o alongamento passivo não promoveu o crescimento longitudinal da fibra muscular, mas promoveu adaptação do tecido conjuntivo muscular.

Os achados desse estudo mostraram que maior porcentagem de perimísio e endomísio foi observada no sóleo alongado e não alongado das ratas envelhecidas do protocolo 2 semanas em comparação às ratas adultas, o que concorda com os resultados da imunohistoquímica, em que foi observado maior porcentagem de imunomarcagem do colágeno 1 e 3 no GE2 em comparação ao GA2 no sóleo alongado e não alongado. Da mesma forma, maior área de perimísio foi observada no GA4 em comparação ao GA2, o que concorda com a maior imunomarcagem do colágeno 1 e 3 no GA4 em comparação ao GA2 no sóleo não alongado.

Por outro lado, as ratas envelhecidas e alongadas por 4 semanas mostraram menor área de perimísio no sóleo alongado em comparação ao GE2, o que concorda com a imunomarcagem do colágeno 3, com maior porcentagem de imunomarcagem no GE2. Ainda, os resultados da área de endomísio concordam com a maior imunomarcagem de colágeno 3 no sóleo alongado do GE2 em comparação ao GE4.

Como efeito do alongamento houve aumento da área de perimísio no GE2. No entanto, esse aumento não concordou com os achados da imunohistoquímica, embora tenha sido observado aumento não estatisticamente significativo da imunomarcagem de colágeno 1 e 3 em resposta ao alongamento. Ao analisar outros desfechos investigados nesse estudo, o efeito do alongamento no GE2 observado como redução de 26,49% da ASTFM pode sugerir o envolvimento do perimísio, que teve sua área aumentada. Essa relação fibra muscular-tecido conjuntivo intramuscular também foi observada previamente, sendo relatado que aumento do conteúdo de colágeno no músculo sóleo, gastrocnêmio e tibial anterior de ratos imobilizados resultou da redução do volume muscular e do aumento da espessura do endomísio e perimísio (PURSLOW, 2020).

A regulação do número de sarcômeros em série é realizada pela fibra muscular, e o número e a composição do sarcômero influenciam na rigidez, mas o principal elemento passivo é o tecido conjuntivo. As reduções à curto e longo prazo na rigidez do tecido muscular são expectativas razoáveis das alterações do tecido conjuntivo, pois o fibroblasto pode responder à tensão e remodelar proteoliticamente o tecido conjuntivo e assim diminuir a rigidez. O alongamento do tecido muscular atinge todos os elementos do tecido conjuntivo, com o fibroblasto sendo a célula mecanicamente responsiva (RILEY; VAN DYKE, 2012). Em um artigo de revisão sobre os efeitos do alongamento passivo e ativo no comprimento muscular, Riley e Van Dyke (2012) sugerem com base em estudos clínicos e com animais, que o alongamento ativo é necessário para aumentar o comprimento da fibra muscular e que o alongamento passivo reduz a rigidez.

Além disso, a maior imunomarcagem do colágeno 3 observada no GE4 como efeito do alongamento pode sugerir que a adaptação ao alongamento no músculo envelhecido envolve o remodelamento da MEC. A carga mecânica pode desencadear a síntese de colágeno nos músculos esqueléticos (KJAER, 2004) e portanto, observa-se que o alongamento passivo desempenha papel substancial no estímulo à síntese de colágeno 3 no músculo envelhecido.

Os processos de remodelação podem atuar para reparar danos diretos ao endomísio resultantes de altas forças de cisalhamento durante as contrações excêntricas, ou a remodelação pode ser secundária ao processo de inflamação que ocorre em fibras musculares danificadas (KOVANEN, 2002; MACKEY et al., 2004). Ao analisarmos os resultados da imunomarcagem do $TNF\alpha$, é observada maior imunomarcagem no sóleo alongado concomitante à maior imunomarcagem do colágeno 3, indicando que em resposta à força aplicada, resposta inflamatória ocorreu e pode ter gerado o estímulo à remodelação da matriz extracelular com aumento da síntese de colágeno 3. Esse resultado é bastante interessante, tendo em vista que foi relatado que a proporção relativa de colágeno tipo 1 aumenta e a de colágeno tipo 3 diminui com o envelhecimento (KRAGSTRUP; KJAER; MACKEY, 2011).

Ainda, a intensidade do exercício de alongamento pode desempenhar importante papel na determinação dos resultados do exercício, pois se for baixa

pode induzir apenas resposta elástica com pouco ou nenhum ganho na amplitude de movimento, enquanto se a força aplicada for muito alta pode desencadear resposta inflamatória (APOSTOLOPOULOS et al., 2015)

Analisando os resultados verificou-se que diante da mesma força aplicada para promover o alongamento, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os grupos, houve diferença nos desfechos. As ratas envelhecidas que receberam 12 sessões de alongamento mostraram resposta inflamatória (maior imunomarcção de TNF α) com remodelação do tecido conjuntivo (maior imunomarcção de colágeno 3) e menor área de secção transversa da fibra muscular ao passo que o grupo de ratas adultas apresentaram redução da resposta inflamatória (menor imunomarcção de TNF α) e remodelação do tecido conjuntivo (maior imunomarcção de colágeno 1) sem alteração da área de secção transversa da fibra muscular.

A força aplicada ao músculo durante o alongamento passivo pode contribuir potencialmente para inflamação do tecido, conforme demonstrado por estudo com modelo animal (PIZZA; BAYLIES; MITCHELL, 2001). O principal achado dos autores foi que alongamento passivo assim como contrações isométricas aumentaram o número de neutrófilos sem causar sinais evidentes histológicos ou funcionais de lesão, embora os autores indiquem que pequena lesão (sem sinal histológico ou funcional) pode ter ocorrido após alongamentos passivos e contrações isométricas e, portanto, um ou mais quimioatraentes para neutrófilos podem ter sido produzidos e/ou liberados e que a carga mecânica imposta sobre o músculo esquelético pode causar a liberação de quimioatraentes para neutrófilos (PIZZA; BAYLIES; MITCHELL, 2001). Outro estudo também relata que o aumento no número de neutrófilos como resposta imediata também foi observada após alongamento passivo não prejudicial e exercício isométrico, ilustrando que a presença de neutrófilos nem sempre indica lesão (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006).

A migração de neutrófilos após exercício excêntrico dos músculos da panturrilha foi relatada, com respostas dos neutrófilos circulantes ao exercício aumentando 4 horas após o exercício, o que sugere que os neutrófilos mobilizados para a circulação podem migrar para o tecido muscular afetado pelo exercício excêntrico e resultar em inflamação (KANDA et al., 2013).

A comunicação intercelular é realizada, em parte, por uma série de moléculas de sinalização celular, ou citocinas (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006). A resposta das citocinas ao exercício é complexa e está relacionada à intensidade do exercício, condições de treinamento, localização da medição de citocinas (por exemplo, tecido, plasma ou urina) e especificidade e sensibilidade dos métodos de medição. Além disso, a duração do tempo entre o exercício e a resposta das citocinas pode diferir dependendo do tipo de citocinas (SUZUKI, 2018).

O estudo de citocinas após exercício de alongamento pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na adaptação histomorfométrica muscular. Foi relatado que os miócitos submetidos ao estresse ou lesão sintetizam o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), e que essa citocina opera como mediador endógeno da adaptação muscular através de efeitos autócrinos e parácrinos (ROHER et al., 2008), demonstrando ter um papel regulador chave na miogênese e regeneração muscular (CHEN; JIN; LI, 2007). Estudo anterior relatou aumento da imunomarcção de TNF- α como resposta ao alongamento realizado no músculo sóleo de ratas envelhecidas, 3 vezes por semana durante uma única semana (MARTINS et al., 2020). Dessa forma, sugere-se que o efeito observado de maior imunomarcção de colágeno 3 foi mediado pelo TNF- α . A maior concentração de colágeno tipo 3 também é consistente com os resultados obtidos por outros autores, em que concentrações elevadas foram associadas com sinais histológicos de microlesões observada nas fibras musculares de ratos submetidos ao alongamento após um período de imobilização (CAÇÃO-BENEDINI et al., 2013).

Mediante os achados que mostraram regulação do tecido conjuntivo muscular com o exercício de alongamento, esse estudo buscou compreender o envolvimento do TGF- β , citocina envolvida em uma variedade de processos celulares, incluindo o reparo da miofibrila e a regulação da formação do tecido conjuntivo (ISMAEEL et al., 2019). Foi apontado em estudo anterior que 3 sessões de alongamento passivo em ratas envelhecidas reduziu a imunomarcção do colágeno 1 e aumentou a imunomarcção de colágeno 3 do sóleo, o que foi mediado pelo TGF- β 1, que também mostrou redução da imunomarcção (ZOTZ et al., 2016).

No presente estudo, apenas o grupo de ratas envelhecidas que recebeu 12 sessões de alongamento passivo mostrou envolvimento do TGF- β 1 na resposta ao estímulo mecânico do alongamento, pois foi encontrada redução da imunomarcação, indicando efeito anti-fibrótico. A redução do TGF- β 1 repercute em melhora da complacência do tecido muscular pois durante o envelhecimento normal as células musculares aumentam os níveis de TGF- β 1 e fazem a transição para um fenótipo mais fibrótico (ISMAEEL et al., 2019).

Redução do TGF- β 1 solúvel foi observado em estudo com modelo animal submetido à lesão do tecido subcutâneo e alongamento por 10 minutos, duas vezes ao dia ao longo de 7 dias, com tensão de 20-30% do comprimento do tecido. Os resultados mostraram que o alongamento pode atenuar o aumento do TGF- β 1 solúvel e do procolágeno tipo 1 após a lesão do tecido, o que caracteriza uma resposta fibrogênica diminuída (BOUFFARD et al., 2008).

No músculo adulto, os resultados da análise imunohistoquímica mostraram menor imunomarcação de colágeno 1 e de TNF- α . O impacto mecânico do alongamento nos mecanismos de regulação da inflamação no tecido conjuntivo foi demonstrado em estudo com modelo de inflamação aguda do tecido subcutâneo. O alongamento realizado por 10 minutos, duas vezes ao dia reduziu a inflamação, indicando efeito anti-inflamatório (BERRUETA et al., 2016).

Assim, esse estudo mostrou que as vias relacionadas à inflamação e fibrose podem estar envolvidas de forma diferente em músculos adultos e envelhecidos em resposta ao alongamento passivo. Ainda, os resultados destacam a importância da prescrição (duração, frequência e intensidade) na remodelação do tecido conjuntivo muscular dependente da idade induzida pelo alongamento. Com base nos resultados analisados da histomorfometria muscular e componentes do tecido conjuntivo muscular, as 12 sessões promoveram regulação do músculo e tecido conjuntivo muscular nas ratas envelhecidas e apenas do tecido conjuntivo muscular nas ratas adultas, enquanto as 6 sessões promovem adaptação apenas na fibra muscular, sem envolvimento da MEC.

5.2 CARTILAGEM

Efeitos do alongamento passivo estático do músculo sóleo foram encontrados na cartilagem da articulação do tornozelo nos grupos de ratas envelhecidas e adultas submetidas à 12 e 6 sessões.

Entre os sinais histológicos observados na articulação das ratas envelhecidas que não foram alongadas, a cartilagem articular se mostrou heterogênea quanto a sua morfologia, com animais apresentando as cartilagens da tíbia e do tálus com características semelhantes à dos animais adultos. No entanto, alterações importantes foram observadas tais como degradação da região articular posterior e presença de *pannus*, floculação na superfície articular e invaginação do osso subcondral na cartilagem da tíbia, e, na região articular média da cartilagem do tálus, verificou-se a invaginação do osso subcondral, clones de condrócitos, descontinuidade da *tidemark*, floculação da superfície articular e degradação na zona superficial. Essas alterações morfológicas podem justificar possível redução da mobilidade da articulação talocrural, embora não tenhamos investigado nesse estudo, o que apontamos como uma limitação.

As ratas envelhecidas alongadas durante 4 semanas mostraram aumento do número de condrócitos na região média da cartilagem articular do tálus e sinais de degradação da cartilagem na região articular anterior da tíbia e do tálus, com o osso subcondral recoberto pelo *pannus* e na região articular posterior da tíbia e média do tálus, hiper celularidade, desorganização das camadas de condrócitos, descontinuidade da *tidemark*, invaginação do osso subcondral e floculação da superfície articular. Assim, verificou-se que a diferença na morfologia da cartilagem encontrada após o alongamento foi a hiper celularidade e desorganização das camadas de condrócitos, o que sugere que a cartilagem articular respondeu a força aplicada para alongar o músculo sóleo (RENNER et al., 2006).

Ainda, é importante mencionar que celularidade, clonagem de condrócitos e perda de conteúdo de proteoglicanas estão relacionadas a degeneração (RENNER et al., 2006), e nesse sentido, o aumento do número de condrócitos como efeito do alongamento deve ser considerado na cartilagem envelhecida, embora não tenha sido observado alteração na espessura. O aumento

observado indica que os condrócitos, células mecanossensíveis, responderam ao estímulo oferecido pelo alongamento do músculo sóleo nas ratas que receberam maior número de sessões.

Durante o alongamento, forças compressivas são impostas à cartilagem articular, e são percebidas pelos condrócitos que detectam a compressão. Os condrócitos mantêm a homeostase do tecido, reagem a lesões e realizam a remodelação da cartilagem e o aumento do número de células pode estar relacionado ao reparo tecidual em resposta ao estresse, uma vez que os condrócitos podem reagir a forças mecânicas e mudanças estruturais na matriz extracelular (FRANCIOZI et al., 2013).

O aumento do número de condrócitos pode ser considerado uma resposta positiva, mas também pode indicar uma reação à sobrecarga. Um estudo considerou resposta positiva ao exercício quando os estímulos compressivos induziram o aumento da atividade condrocítica, que foi identificada pelo aumento do volume nuclear e da espessura da cartilagem, o que significou maior resistência à compressão (MALDONADO et al., 2013). Outro estudo por sua vez considerou o aumento da celularidade e ausência de alteração da espessura da cartilagem articular como resposta prejudicial e irreversível ao alongamento da articulação do tornozelo previamente imobilizada (RENNER et al., 2006). No presente estudo, as ratas envelhecidas alongadas durante 2 semanas mostraram redução da espessura da região anterior da zona profunda da cartilagem da tíbia, indicando uma resposta prejudicial à cartilagem articular. Retornando aos achados da variável força aplicada para promover o alongamento, maior força foi aplicada nas primeiras sessões no experimento de 6 semanas nas ratas envelhecidas, o que pode explicar a redução da espessura observada na zona profunda da cartilagem articular.

Dessa forma, os resultados do presente estudo mostraram que a cartilagem articular é submetida à compressão durante o alongamento muscular passivo o que desencadeia resposta, demonstrando interação musculo-cartilagem. Com 6 sessões a resposta foi da zona profunda da cartilagem e com 12 sessões, a resposta foi da zona superficial.

Portanto, os condrócitos também são sensíveis ao estímulo de alongamento, e o efeito do alongamento foi tempo dependente, mesmo sem

umentar a espessura da cartilagem, já que com 2 semanas este achado não foi detectado. Assim, é importante controlar os parâmetros de prescrição do alongamento em idosos pois não é apenas o músculo esquelético que responde ao estímulo.

As ratas adultas por sua vez, mostraram alteração na espessura da cartilagem articular como resposta ao alongamento. Aquelas que foram alongadas por 6 sessões mostraram aumento da espessura na região média da zona superficial da tíbia, enquanto as submetidas à 12 sessões mostraram redução da espessura da região posterior da zona superficial do tálus.

Embora tenha sido observada redução da espessura, isso não significa que houve degeneração ou lesão na cartilagem, pois na análise histológica a cartilagem articular apresentava superfície lisa com condrócitos organizados nas quatro camadas celulares normais. Na camada superficial, que foi a única que mostrou resposta ao estímulo do alongamento, foi observado densidade celular maior, com os condrócitos dispostos em aglomerados horizontais e de formato achatado. É importante relatar que a matriz extracelular também se apresentava com aspecto normal, sem a presença de floculações ou fissuras. Assim, os resultados indicam que a zona superficial é a primeira zona a responder ao estímulo do alongamento muscular nas ratas jovens. Da mesma forma que nas ratas envelhecidas, analisando os achados da variável força aplicada para promover o alongamento, maior força foi aplicada nas últimas sessões no experimento de 12 semanas nas ratas adultas, o que pode explicar a redução da espessura observada na zona superficial da cartilagem articular, enquanto no experimento de 6 sessões não houve diferença entre as sessões na força aplicada para alongar o músculo, o que pode explicar o aumento da espessura da cartilagem da tíbia.

As propriedades mecânicas da zona superficial da cartilagem articular demonstram que ela possui um módulo de compressão mais baixo que o tecido mais profundo, resultando em mais deformação da matriz e maiores alterações sob carga compressiva (MANSFIELD; BELL; WINLOVE, 2015). Dessa forma, a força aplicada para alongar o músculo sóleo impôs compressão principalmente sobre a zona superficial da cartilagem articular e esse resultado é relevante para

a área da fisioterapia, pois o alongamento passivo é frequentemente prescrito no tratamento de lesões articulares, pós operatórios e reabilitação pós imobilização.

Durante o movimento de dorsiflexão do tornozelo, ocorre o deslizamento posterior do tálus em relação à tibia (RESENDE et al., 2006). No presente estudo, a posição utilizada para alongar o músculo sóleo foi de dorsiflexão máxima, o que pode sugerir que os resultados encontrados sejam decorrentes desse posicionamento, já que maior contato é gerado entre tálus e tibia na região anterior, enquanto na região posterior o tálus fica livre de compressão. Foi relatado que maior área de contato entre tálus e tibia e maior deformação da cartilagem ocorreu no movimento de dorsiflexão, com maior espessura da cartilagem observada sobre os “ombros” do tálus (MILLINGTON et al., 2007).

Assim, a cartilagem articular é responsiva à sobrecarga, assim como à redução da descarga de peso que induz o afinamento da cartilagem articular por meio da aceleração do catabolismo de agregan, modulação da mineralização da matriz da cartilagem e ativação de osteoclastos subcondrais (NOMURA et al., 2017)

Portanto, os achados do presente estudo são relevantes para a prescrição do alongamento passivo no contexto de reabilitação, levando em consideração situações como imobilização e pós operatórios ou lesões da cartilagem articular, e o fator idade deve ser considerado durante a prescrição do alongamento passivo.

5.3 OSSO:

Na análise do efeito do alongamento na tibia apenas o grupo adulto alongado por 12 sessões mostrou diferença significativa no número de osteócitos e lacunas cheias. O efeito do alongamento do músculo sóleo no osso foi redução do número de osteócitos e de lacunas cheias na tibia de ratas adultas.

Um estudo realizado com ratos machos adultos e utilizando o modelo de imobilização mostrou que duas semanas de imobilização seguida por remobilização com alongamento passivo consistindo de 3 repetições de 30 segundos de duração cada, durante 15 dias, também não provocaram alterações

significativas no diâmetro do canal medular e na espessura óssea mas o número de osteócitos diminuiu significativamente nos ratos imobilizados e continuou a decrescer mesmo com a remobilização. De acordo com os autores, os resultados encontrados por eles podem estar relacionados com a queda no metabolismo ósseo decorrente da imobilização, o que provocou diminuição na quantidade de células para a manutenção desse tecido (PORTINHO; BOIN; BERTOLINI, 2008). Curiosamente, em ratas adultas alongadas, nossos achados mostraram redução do número de osteócitos semelhante à condição de imobilização.

Os osteócitos são as células mais abundantes do osso e são mecanosensíveis, com capacidade de detectar inclusive a tensão mecânica no tecido ósseo induzida por forças musculares. A configuração experimental do presente estudo permitiu a investigação dessa resposta, expondo os animais a exercício de alongamento que desencadeou resposta apenas no grupo adulto alongado por 12 sessões. Assim, as respostas mecanoadaptativas ao exercício de alongamento coordenadas pelos osteócitos foi dependente da frequência e volume total, além da idade. Estudo com camundongos mostrou que animais idosos necessitam de cargas mais altas para provocar resposta anabólica o que sugere mudança no comportamento celular com a idade (GARDINIER et al., 2018).

Os outros grupos não apresentaram resposta dos osteócitos ao estímulo mecânico fornecido pelo alongamento passivo do músculo sóleo, o que pode indicar que o estímulo não foi suficiente para gerar resposta das células ósseas. É relatada que a deformação necessária para causar resposta nos osteócitos é maior do que a necessária para causar resposta no tecido ósseo como um todo (YOU et al., 2001). Ainda, o osso analisado nesse estudo foi o cortical, o que pode explicar a não observação da resposta do osso ao alongamento do músculo. O osso trabecular transfere cargas mecânicas da superfície articular para o osso cortical e o *turnover* é maior do que no osso cortical (OTT, 2018). Portanto, uma limitação desse estudo foi ter investigado apenas o osso cortical e não ter sido avaliado o osso trabecular.

O menor número de osteócitos e de lacunas cheias na tíbia do membro alongado no GA4 pode indicar a apoptose dessas células, e a apoptose indica remodelação óssea (ARIAS et al., 2018) sendo a remodelação óssea a primeira

resposta fisiológica adaptativa ao exercício e desuso (HUGHES et al., 2020). Os osteócitos atuando como mecanossensores iniciam a remodelação óssea em resposta à aplicação de forças (BOZAL et al., 2013). Das funções dos osteócitos, o controle da remodelação óssea parece ser uma das principais funções alteradas com a idade (JILKA; O'BRIEN, 2016), o que foi visto nesse estudo, pois os osteócitos dos animais envelhecidos não apresentaram resposta à força aplicada pelo alongamento do músculo sóleo na tibia.

A apoptose tem muitas funções, incluindo a remoção de células que não estão mais funcionando adequadamente, a remoção de células supérfluas durante o desenvolvimento, a eliminação de células potencialmente cancerosas e a regulação do tamanho do tecido, o que inclui o osso. A regulação da apoptose de osteócitos por forças mecânicas é um componente integrante da resposta adaptativa do osso à mudanças na carga (JILKA; NOBLE; WEINSTEIN, 2013). Estudo realizado com aplicação de forças compressivas e forças de tração por meio de aparelho ortodôntico em molares de ratos machos mostrou que, ao contrário da força compressiva, a força de tração induziu uma diminuição no volume de osteócitos (BOZAL et al., 2013).

Dessa forma, considerando que o alongamento do músculo sóleo pode ter gerado força de tração sobre a tibia, os resultados desse estudo demonstram que o alongamento muscular ocasionou resposta das células mecanossensíveis do osso adulto e que dependeu do número de sessões. No entanto, alterações morfológicas não foram observadas pois na análise histológica dos cortes transversais das tibias do membro alongado e não alongado do GA4, ambos apresentaram morfologia dentro da normalidade de configuração tecidual.

No que diz respeito aos efeitos da idade, as ratas envelhecidas apresentaram morfologia tecidual alterada, diferindo da configuração padrão observada nas ratas adultas. As alterações observadas foram canal medular com formato alterado em que a medula óssea apresentava predominância de tecido adiposo unilocular e presença reduzida de tecido conjuntivo reticular mielóide e de megacariócitos. Na análise histomorfométrica as ratas envelhecidas mostraram maior área do canal medular, concordando com os achados morfológicos. Ainda foram observadas irregularidades na margem endosteal com presença de reentrâncias reabsortivas perfurantes na zona

cortical interna, espessura reduzida e presença de osteoclastos denotando reabsorção óssea. Novamente esses achados concordam com os achados histomorfométricos de menor espessura do osso nas ratas envelhecidas. Foi relatado que amplo espaço medular, muitas vezes ocupado por células de gordura e adipócitos é sinal morfológico da degeneração do tecido ósseo que ocorre com a idade (GIORDANO et al., 2016) e como a perda óssea ocorre principalmente na superfície endosteal, maior expansão medular é observada nos ossos com uma grande perda de densidade mineral óssea (AHLBORG; JOHNELL; KARLSSON, 2004).

Na análise da MEC, nas zonas cortical externa adjacente à superfície periosteal e cortical média foram observadas diferenças morfológicas nas lacunas ósseas, destacando-se o aumento de lacunas vazias e hipertrofiadas, distribuídas aleatoriamente dentre as regiões corticais. Também foi observada maior número de lacunas vazias nas ratas envelhecidas. Estudo da histomorfometria óssea em humanos mostrou que a densidade lacunar diminui de maneira linear com a idade (BUSSE et al., 2010), e a redução das lacunas de osteócitos também foi confirmada em estudo com animais (PIEMONTESE et al., 2017).

Os cortes transversais das tíbias de todos os animais dos grupos adultos 2 e 4 semanas, alongados e não alongados, apresentaram morfologia dentro da normalidade de configuração tecidual. Portanto, o alongamento do músculo sóleo não causou efeitos na histomorfometria do osso envelhecido, o que sugere que os parâmetros de prescrição utilizados nesse estudo não causaram dano e nem benefício, enquanto 12 sessões de alongamento passivo, realizado 3 vezes por semana, causaram remodelação da tíbia adulta, ou seja, a carga imposta foi suficiente para promover resposta do osso adulto ao estímulo do alongamento.

Embora integre rotinas de exercício para idosos, o alongamento muscular não promoveu respostas no osso envelhecido e assim outros tipos de exercícios com propriedades osteogênicas devem ser inseridos na rotina de exercício dessa população. Por outro lado, no osso adulto, o alongamento muscular foi percebido pelas células ósseas e assim no contexto de reabilitação, a prescrição

desse tipo de exercício deve levar em consideração situações como pós operatórios, fraturas e doenças ósseas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos histomorfométricos de seis sessões de alongamento passivo do músculo sóleo foram redução da área de secção transversa da fibra muscular em ratas envelhecidas e adultas, aumento da espessura da zona superficial e redução da espessura da zona profunda da cartilagem da tíbia de ratas adultas. Doze sessões causaram redução da área de secção transversa da fibra muscular, aumento do colágeno 3 intramuscular e aumento de condrócitos em ratas envelhecidas; redução do colágeno 1 intramuscular, redução da espessura da zona superficial da cartilagem do tálus e redução do número de osteócitos e de lacunas cheias na tíbia de ratas adultas. Portanto, cartilagem e osso também responderam à força aplicada para alongar o músculo e os efeitos foram dependentes da idade.

Doze sessões de alongamento passivo não promoveram crescimento longitudinal do músculo sóleo, mas promoveram aumento da extensibilidade por meio da reorganização do tecido conjuntivo, por mecanismos diferenciados. As vias relacionadas à inflamação e fibrose podem estar envolvidas de forma diferente nessa reorganização do tecido conjuntivo do músculo adulto e envelhecido em resposta ao alongamento. Os resultados indicam que os efeitos do alongamento passivo são dependentes da idade.

Portanto, a resposta hipotrófica ao alongamento é transitória, sendo tempo e idade-dependentes, pois foi mais reativa após 2 semanas de alongamento. Com 4 semanas, o músculo envelhecido, apesar de menor magnitude, ainda se apresentava hipotrofiado, provavelmente devido a ação inibidora do colágeno 3 e $TNF-\alpha$, mas a redução de $TGF-\beta 1$, indica efeito anti-fibrótico. Por outro lado, a mecano-sensibilidade da matriz extracelular, após 4 semanas de alongamento, foi menos reativa no músculo jovem, com redução de $TNF-\alpha$ e Colágeno 1, sem alteração de ASTFM, sugerindo aumento de extensibilidade muscular. A cartilagem também foi responsiva ao alongamento, aumentando número de condrócitos, porém, sem aumentar a espessura da cartilagem, após 4 semanas de alongamento no músculo envelhecido. Os achados reforçam o efeito tempo dependente também da cartilagem envelhecida, já que com 2 semanas esta não foi modificada. Portanto, como

indicação clínica, respeitando as devidas limitações e extrapolações, podemos sugerir que tanto o músculo, quanto a cartilagem e o osso envelhecidos, são menos mecano-sensíveis ao alongamento e/ou levam mais tempo para responder ao alongamento com o incremento de trofismo, em comparação ao sistema musculoesquelético adulto.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription**. The Journal of the Canadian Chiropractic Association 9 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2013.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**. 10 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2018.
- AHLBORG, H. G.; JOHNELL, O.; KARLSSON, M. K. An age-related medullary expansion can have implications for the long-term fixation of hip prostheses. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 75, n. 2, p. 154–159, 2004.
- AKKIRAJU, H.; NOHE, A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. **Journal of Developmental Biology**, v.3, n.4, p.177-192, 2015.
- ANDRADE, I. T. de; LANCHA, A. H.; CAMPOS-FERRAZ, P. L. de. Efeito da suplementação de proteína isolada do leite ou da soja na prevenção da perda de massa muscular em idosos saudáveis: uma revisão. **Nutrire**, v. 40, n. 1, p. 90–103, 2015.
- ANGIN, E.; ERDEN, Z. The effect of group exercise on postmenopausal osteoporosis and osteopenia. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v. 43, n. 4, p. 343–350, 2009.
- APOSTOLOPOULOS, N. et al. The relevance of stretch intensity and position—a systematic review. **Frontiers in Psychology**, v. 6, p. 1128, 2015.
- AQUINO, C. F.; VIANA, S. O.; FONSECA, S. T. Comportamento biomecânico e resposta dos tecidos biológicos ao estresse e à imobilização. **Fisioterapia em movimento**, v. 18, n. 2, p. 35–43, 2005.
- ARAZI, H.; EGHBALI, E. Effects of Different Types of Physical Training on Bone Mineral Density in Men and Women. **Journal of Osteoporosis and Physical Activity**, v. 05, n. 03, 2017.
- ARIAS, C. F. et al. Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 1 set. 2018
- ARTHUR, S. T.; COOLEY, I. D. The effect of physiological stimuli on sarcopenia; Impact of Notch and Wnt signaling on impaired aged skeletal muscle repair. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 5, p. 731–760, 2012.
- AVERSA, Z. et al. The clinical impact and biological mechanisms of skeletal muscle aging. **Bone**, v. 127, p. 26–36, 22 out. 2019.
- BAEK, K. W. et al. Rodent model of muscular atrophy for sarcopenia study. **Journal of Bone Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 97–110, 2020.

- BERNABEI, M.; MAAS, H.; VAN DIEËN, J. H. A lumped stiffness model of intermuscular and extramuscular myofascial pathways of force transmission. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 15, n. 6, p. 1747–1763, 18 dez. 2016.
- BERRUETA, L. et al. Stretching Impacts Inflammation Resolution in Connective Tissue. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 7, p. 1621–1627, jul. 2016.
- BOSKEY, A. L.; COLEMAN, R. Aging and bone. **Journal of Dental Research**, v.89, n.12, 1333–1348, dez. 2010
- BOUFFARD, N. A. et al. Tissue stretch decreases soluble TGF- β 1 and type-1 procollagen in mouse subcutaneous connective tissue: Evidence from ex vivo and in vivo models. **Journal of Cellular Physiology**, v. 214, n. 2, p. 389–395, fev. 2008.
- BOZAL, C. B. et al. Histomorphometric study and three-dimensional reconstruction of the osteocyte lacuno-canalicular network one hour after applying tensile and compressive forces. **Cells Tissues Organs**, v. 197, n. 6, p. 474–483, 2013.
- BROCKETT, C. L.; CHAPMAN, G. J. Biomechanics of the ankle. **Orthopaedics and Trauma**, v. 30, n. 3, p. 232–238, 1 jun. 2016.
- BROWN, M.; FISHER, J. S.; SALSICH, G. Stiffness and muscle function with age and reduced muscle use. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 17, n. 3, p. 409–414, maio 1999
- BUSSE, B. et al. Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. **Ageing Cell**, v. 9, n. 6, p. 1065–1075, dez. 2010.
- BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation : A Damage and Repair. **Journal of Athletic Training**, v. 41, n. 4, p. 457–465, 2006.
- CAÇAO-BENEDINI, L. O. et al. Immobilization and therapeutic passive stretching generate thickening and increase the expression of laminin and dystrophin in skeletal muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 6, p. 483–491, 2014.
- CAÇÃO-BENEDINI, L. O. et al. Remobilization through stretching improves gait recovery in the rat. **Acta Histochemica**, v. 115, n. 5, p. 460–469, 2013.
- CAI CAIOZZO, V. J. et al. Effects of distraction on muscle length: Mechanisms involved in sarcomerogenesis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.403 n.SUPPL, p.133-145, 2002.
- CALLAHAN, D. M. et al. Age-related structural alterations in human skeletal muscle fibers and mitochondria are sex specific: Relationship to single-fiber function. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 12, p. 1582–1592, 15 jun.

2014.

CAMARERO-ESPINOSA, S. et al. Articular cartilage: From formation to tissue engineering. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 5, p. 734–767, 2016.

CARTER, M. I.; HINTON, P. S. Physical activity and bone health. **Missouri Medicine**, v.111, n.1, p.59-64, 2014

CARVALHO, A. C. B. et al. Bone tissue histomorphometry in castrated rats treated with tibolone. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 235–243, 2010.

CHEN, C. et al. Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 305, n. 12, p. 1202–1208, 2013.

CHEN, S. E.; JIN, B.; LI, Y. P. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 292, n. 5, p. C1660-71, maio 2007.

CHODZKO-ZAJKO, W. J. et al. Exercise and physical activity for older adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 7, p. 1510–1530, jul. 2009.

COREY, S. M. et al. Stretching of the back improves gait, mechanical sensitivity and connective tissue inflammation in a rodent model. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29831, jan. 2012.

COUTINHO, E. L. et al. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1853–1861, 2004.

COUTINHO, E. L. et al. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. **Connective Tissue Research**, v. 47, n. 5, p. 278–286, 6 jan. 2006.

CRISTOPOLISKI, F. et al. Stretching exercise program improves gait in the elderly. **Gerontology**, v. 55, n. 6, p. 614–620, 2009.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**, v. 48, n. 1, p. 16–31, 1 jan. 2019.

CSAPO, R.; GUMPENBERGER, M.; WESSNER, B. Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n.5 p. 1–15, 2020.

DALLE, S.; ROSSMEISLOVA, L.; KOPPO, K. The role of inflammation in age-related sarcopenia. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n.12, p. 1045, 12 dez. 2017.

DALY, R. M. et al. Exercise for the prevention of osteoporosis in postmenopausal women: an evidence-based guide to the optimal prescription.

Brazilian Journal of Physical Therapy, v. 23, n. 2, p. 170–180, 2018.

ECKER, R. S.; KOYAMA, E.; PACIFICI, M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. **Current Osteoporosis Reports**, v.13, n.6, p.407- 414, 2015.

DEMONTIS, F. et al. The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. **Aging Cell**, v. 12, n. 6, p. 943–949, 2013.

DEYNE, P. G. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. **Physical therapy**, v. 81, n. 2, p. 819–827, 2001.

DUNN, S. L.; OLMEDO, M. L. Mechanotransduction: Relevance to Physical Therapist Practice--Understanding Our Ability to Affect Genetic Expression Through Mechanical Forces. **Physical Therapy**, v. 96, n. 5, p. 712–721, 2016.

FANZANI, A. et al. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: An update. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 3, p. 163–179, 2012.

FATURI, F. M. et al. Intermittent stretching induces fibrosis in denervated rat muscle. **Muscle and Nerve**, v. 53, n. 1, p. 118–126, jan. 2016.

FELAND, J. B. et al. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. **Physical therapy**, v. 81, n. 5, p. 1110–1117, 2001.

FERRUCCI, L. et al. Interaction Between Bone and Muscle in Older Persons with Mobility Limitations. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 19, p. 3178–3197, 2014.

FOWLES, J. R. et al. The effects of acute passive stretch on muscle protein synthesis in humans. **Canadian journal of applied physiology**, v. 25, n. 3, p. 165–80, jun. 2000.

FOX, A. J. .; BEDI, A.; RODEO, S. A. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. **Sports Health**, v. 1, n. 6, p. 461–468, 2009.

FRANCIOZI, C. E. S. et al. Gradual strenuous running regimen predisposes to osteoarthritis due to cartilage cell death and altered levels of glycosaminoglycans. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 7, p. 965–972, jul. 2013.

FREITAS-RODRÍGUEZ, S.; FOLGUERAS, A. R.; LÓPEZ-OTÍN, C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 2015–2025, 1 nov. 2017.

FREITAS, S. R. et al. Stretching Effects : High-intensity & Moderate - duation vs, low-intensity & long-duration. **International Journal of Sports Medicine**, v.37, n.3. p. 239–244, 2016.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Behavior Genetics**, v. 45, n. 2, p. 183–195, 8 mar. 2015.

FUKUDA, S.; IIDA, H. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female Wistar rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 7, p. 755–760, jul. 2004.

GAJDOSIK, R. L. Passive extensibility of skeletal muscle: Review of the literature with clinical implications. **Clinical Biomechanics**, v. 16, n. 2, p. 87–101, 2001.

GAJDOSIK, R. L. et al. Viscoelastic properties of short calf muscle-tendon units of older women: Effects of slow and fast passive dorsiflexion stretches in vivo. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 2–3, p. 131–139, 2005.

GALEA, G. L. et al. Old age and the associated impairment of bones' adaptation to loading are associated with transcriptomic changes in cellular metabolism, cell-matrix interactions and the cell cycle. **Gene**, v. 599, p. 36–52, 30 jan. 2017.

GALLO, L. et al. Effects of static stretching on functional capacity in older women: randomized controlled trial. **Journal of Exercise Physiology**, v. 18, n. 5, p. 13–22, 2015.

GALLO, L. H. et al. Efeito de diferentes volumes de alongamento na capacidade funcional de idosos. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 15, n. 1, p. 103–112, 2013.

GALLON, D. et al. The effects of stretching on the flexibility, muscle performance and functionality of institutionalized older women. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 229–235, mar. 2011..

GAMA, H. S. et al. Stretching exercise: prescription and effects on musculoskeletal function in adults and older people. **Cad. Bras. Ter. Ocup**, v. 26, n. 1, p. 187–206, 2018.

GANS, C. Fiber architecture and muscle function. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 10, p. 160–207, 1982.

GARBER, C. E. et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.

GARDINIER, J. D. et al. Bone adaptation in response to treadmill exercise in young and adult mice. **Bone Reports**, v. 8, p. 29–37, 1 jun. 2018.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546,

28 nov. 2003.

GILLIES, A. R. et al. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318–331, set. 2012.

GIORDANO, V. et al. Age-related changes in bone architecture. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 4, p. 276–285, ago. 2016.

GOMES, A. R. S. et al. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1473–1480, out. 2004.

GOMES, A. R. S. et al. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **Journal of anatomy**, v. 210, n. 3, p. 328–35, mar. 2007.

HARVEY, L.; HERBERT, R.; CROSBIE, J. Does stretching induce lasting increases in joint ROM? A systematic review. **Physiotherapy research international**, v.7, n.1, p.1-13, 2002.

HEMMATIAN, H. et al. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 5, p. 401–411, 11 out. 2017.

HERNANDEZ, A. R. et al. Sex differences in age-related impairments vary across cognitive and physical assessments in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 134, n. 2, p. 69–81, 1 abr. 2020.

HONG, A. R.; KIM, S. W. Effects of Resistance Exercise on Bone Health. **Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 4, p. 435, dez. 2018.

HOTTA, K. et al. Daily muscle stretching enhances blood flow, endothelial function, capillarity, vascular volume and connectivity in aged skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 10, p. 1903–1917, 15 maio 2018.

HOUARD, X.; GOLDRING, M. B.; BERENBAUM, F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. **Current Rheumatology Reports**, v. 15, n. 11, 2013.

HUGHES, J. M. et al. The Central Role of Osteocytes in the Four Adaptive Pathways of Bone's Mechanostat. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 48, n. 3, p. 140–148, 1 jul. 2020.

ICHIHASHI, N.; IBUKI, S.; NAKAMURA, M. Effects of static stretching on passive properties of muscle-tendon unit. **The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2014.

ISMAEEL, A. et al. Role of Transforming Growth Factor- β in Skeletal Muscle Fibrosis: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2446, 17 maio 2019.

ISNER-HOROBETI, M. E. et al. Eccentric Exercise Training: Modalities, Applications and Perspectives. **Sports Medicine**, v.43, n.6, p.483-512, 9 jun.

2013.

JACOBS, C. A.; SCIASCIA, A. D. Factors that influence the efficacy of stretching programs for patients with hypomobility. **Sports Health**, v. 3, n. 6, p. 520–523, nov. 2011.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 264–271, 2013.

JILKA, R. L.; O'BRIEN, C. A. The Role of Osteocytes in Age-Related Bone Loss. **Current Osteoporosis Reports**, v. 14, n. 1, p. 16–25, 2016.

KANDA, K. et al. Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. **Exercise Immunology Review**, v. 19, p. 72–85, 2013.

KARAMANIDIS, K.; ARAMPATZIS, A. Mechanical and morphological properties of different muscle-tendon units in the lower extremity and running mechanics: Effect of aging and physical activity. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 20, p. 3907–3923, 15 out. 2005.

KARSDAL, M. A. et al. Extracellular matrix remodeling: The common denominator in connective tissue diseases. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 11, n. 2, p. 70–92, 1 mar. 2013.

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

KERRIGAN, D. C. et al. Effect of a hip flexor-stretching program on gait in the elderly. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 84, n. January, p. 1–6, 2003.

KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, 2010.

KIM, M.-K.; LEE, J. C.; YOO, K.-T. The effects of shoulder stabilization exercises and pectoralis minor stretching on balance and maximal shoulder muscle strength of healthy young adults with round shoulder posture. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 30, n. 3, p. 373–380, 2018.

KJAER, M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 649–698, 2004.

KOVANEN, V. Intramuscular extracellular matrix: Complex environment of muscle cells. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 30, n. 1, p. 20–25, 2002.

KRAGSTRUP, T. W.; KJAER, M.; MACKEY, A. L. Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with

aging. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 21, n. 6, p. 749–757, 2011.

KRONBAUER, G. A.; DE SOUZA CASTRO, F. A. Estruturas elásticas e fadiga muscular. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 35, n. 2, p. 503–520, jun. 2013.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 20, n.5, 2014.

KUNZ, R. I. et al. Alterações histomofométricas na articulação do joelho de ratos Wistar após remobilização em meio aquático. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 22, n. 3, p. 317–324, 2015.

KUROSE, T. et al. Distribution and change of collagen types I and III and elastin in developing leg muscle in rat. **Hiroshima Journal of Medical Sciences**, v. 55, n. 3, p. 85–91, 2006.

LEE, J. W. et al. The effect of ankle range of motion on balance performance of elderly people. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 24, n. 10, p. 991–994, 2012.

LEITE, D. X. et al. Relação entre rigidez articular passiva e torque concêntrico dos rotadores laterais do quadril. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 16, n. 5, p. 414–421, out. 2012.

LEONG, D. J. et al. Mechanotransduction and cartilage integrity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1240, n.1, p.32-37, 2011.

LIDA, H.; FUKUDA, S. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and strength at different skeletal sites in male rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 1, p. 29–34, jan. 2002.

LIEBER, R. L. et al. Skeletal muscle mechanics, energetics and plasticity. **Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation**, v. 14, n. 1, p. 108, 23 dez. 2017. Disponível em: <<http://jneuroengrehab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12984-017-0318-y>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

LIEBER, R. L.; FRIDÉN, J. **Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture** *Muscle and Nerve*, nov. 2000. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054744>>. Acesso em: 23 set. 2019.

LINDLE, R. S. et al. Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20-93 yr. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 5, p. 1581–1587, 1 nov. 1997.

MAAS, H.; SANDERCOCK, T. G. Force transmission between synergistic skeletal muscles through connective tissue linkages. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 575672, 2010.

MACINTOSH, B. R.; MACNAUGHTON, M. B. The length dependence of muscle active force: Considerations for parallel elastic properties. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 5, p. 1666–1673, maio 2005.

MACKEY, A. L. et al. Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 97, p. 197–203, 2004..

MALDONADO, D. C. et al. The effects of joint immobilization on articular cartilage of the knee in previously exercised rats. **Journal of Anatomy**, v. 222, n. 5, p. 518–525, 2013.

MANN, C. J. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal muscle**, v. 1, n. 1, p. 21, 2011.

MANSFIELD, J. C.; BELL, J. S.; WINLOVE, C. P. The micromechanics of the superficial zone of articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 10, p. 1806–1816, 1 out. 2015.

MARCHETTI, P. H. et al. Different volumes and intensities of static stretching affect the range of motion and muscle force output in well-trained subjects. **Sports Biomechanics**, p. 1–10, 29 ago. 2019.

MARCUCCI, L.; REGGIANI, C. Increase of resting muscle stiffness, a less considered component of age-related skeletal muscle impairment. **European journal of translational myology**, v. 30, n. 2, p. 8982, 13 jul. 2020.

MARQUES, A. P. et al. Effect of frequency of static stretching on flexibility, hamstring tightness and electromyographic activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 949–953, 2009.

MARTIN, R. M.; CORREA, P. H. S. Bone quality and osteoporosis therapy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 186–199, mar. 2010.

MARTINEZ-HUENCHULLAN, S. et al. The emerging role of skeletal muscle extracellular matrix remodelling in obesity and exercise. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 7, p. 776–790, 1 jul. 2017.

MARTINS, H. R. F. et al. Morphometric and Molecular Muscle Remodeling after Passive Stretching in Elderly Female Rats. **Clinics**, v. 75, n. e1769, p. 1–7, 10 nov. 2020.

MARTINS, W. et al. Diacutaneous fibrolysis versus passive stretching after articular immobilization: Muscle recovery and extracellular matrix remodelling. **OA Medical Hypothesis**, v. 1, n. 2, dez. 2013.

MASSENZ, K. J. V. et al. Effects of chronic stretching on soleus muscle of wistar female rats. **International Journal of Morphology**, v. 38, n. 4, p. 1039–1046, 1 ago. 2020.

MCCORMICK, R.; VASILAKI, A. Age-related changes in skeletal muscle:

changes to life-style as a therapy. **Biogerontology**, v. 19, n. 6, p. 519–536, 27 set. 2018.

MCLOON, L. K. et al. Composition, architecture, and functional implications of the connective tissue network of the extraocular muscles. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 59, n. 1, p. 322–329, 2018.

MCMAHON, G. et al. Circulating tumor necrosis factor alpha may modulate the short-term detraining induced muscle mass loss following prolonged resistance training. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n.3, p. 527, 3 maio 2019.

MCNEIL, C. J. et al. Geometry of a weight-bearing and non-weight-bearing bone in the legs of young, old, and very old men. **Calcified Tissue International**, v. 85, n. 1, p. 22–30, 17 jul. 2009. MEDEIROS, D. M.; MARTINI, T. F. Chronic effect of different types of stretching on ankle dorsiflexion range of motion: Systematic review and meta-analysis. **Foot**, v. 34, p. 28–35, 2018.

MEYER, G. A.; LIEBER, R. L. Elucidation of extracellular matrix mechanics from muscle fibers and fiber bundles. **Journal of Biomechanics**, v. 44, n. 4, p. 771–773, 2011.

MILLER, T. A. et al. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 5, p. 1710–1717, 1 nov. 2001.

MILLINGTON, S. et al. A stereophotographic study of ankle joint contact area. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 11, p. 1465–1473, 1 nov. 2007.

MILOVANOVIC, P. et al. Age- and Sex-Specific Bone Structure Patterns Portend Bone Fragility in Radii and Tibiae in Relation to Osteodensitometry: A High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography Study in 385 Individuals. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 10, p. 1269–1275, 1 out. 2014.

MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 12, n. 3, p. 50–55, 31 dez. 2005.

MOBLEY, C. B. et al. Aging in rats differentially affects markers of transcriptional and translational capacity in soleus and plantaris muscle. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JUL, p. 518, 20 jul. 2017.

MOURKIOTI, F.; ROSENTHAL, N. NF- κ B signaling in skeletal muscle: Prospects for intervention in muscle diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v.86, n.7, p.747-759, 2008.

NILWIK, R. et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 5, p. 492–498, 2013.

NOJIRI, S. et al. Effect of static stretching with different rest intervals on muscle

stiffness. **Journal of Biomechanics**, v. 90, p. 128–132, 11 jun. 2019.

NOMURA, M. et al. Thinning of articular cartilage after joint unloading or immobilization. An experimental investigation of the pathogenesis in mice. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 5, p. 727–736, 1 maio 2017.

NUNES, J. P. et al. Does stretch training induce muscle hypertrophy in humans? A review of the literature. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v.40, n.3, 2020.

OLIVEIRA, L. C. de; OLIVEIRA, R. G. de; PIRES-OLIVEIRA, D. A. de A. Comparison between static stretching and the Pilates method on the flexibility of older women. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 20, n. 4, p. 800–806, out. 2016.

OSTAN, R. et al. Gender, aging and longevity in humans: An update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine. **Clinical Science**, v. 130, n. 19, p. 1711–1725, 2016.

OTERO, M. et al. The effectiveness of a basic exercise intervention to improve strength and balance in women with osteoporosis. **Clinical interventions in aging**, v. 12, p. 505–513, 2017.

OTT, S. M. Cortical or Trabecular Bone: What's the Difference? **American Journal of Nephrology**, v.47, 373-375, 2018.

OZCIVICI, E. et al. Mechanical signals as anabolic agents in bone. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 1, p. 50–59, jan. 2010.

PADULO, J. et al. Concentric and eccentric: muscle contraction or exercise? **Sports health**, v. 5, n. 4, p. 306, jul. 2013.

PAGE, P. Current concepts in muscle stretching for exercise and rehabilitation. **International journal of sports physical therapy**, v. 7, n. 1, p. 109–19, 2012.

PAPPAS, L. E.; NAGY, T. R. The translation of age-related body composition findings from rodents to humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 172–178, 2019.

PAVAN, P. et al. Alterations of extracellular matrix mechanical properties contribute to age-related functional impairment of human skeletal muscles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, 1 jun. 2020.

PEVIANI, S. M. et al. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle and Nerve**, v. 35, n. 3, p. 363–370, 2007.

PEVIANI, S. M. et al. Regulation of extracellular matrix elements and sarcomerogenesis in response to different periods of passive stretching in the soleus muscle of rats. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9010, 13 dez. 2018.

PIEMONTESE, M. et al. Old age causes de novo intracortical bone remodeling

and porosity in mice. **JCI insight**, v. 2, n. 17, 7 set. 2017.

PIZZA, F. X.; BAYLIES, H.; MITCHELL, J. B. Adaptation to eccentric exercise: Neutrophils and E-selectin during early recovery. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 26, n. 3, p. 245–253, 2001.

PORTINHO, D.; BOIN, V. G.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 408–411, set. 2008.

PURSLOW, P. P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 133, n. 4, p. 947–966, dez. 2002.

PURSLOW, P. P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 133, n. 4, p. 947–966, dez. 2002.

RADER, E. P. et al. Age-dependent muscle adaptation after chronic stretch-shortening contractions in rats. **Aging and Disease**, v. 7, n. 1, p. 1, 1 fev. 2016.

RAMIREZ, C. et al. Effect of tibiotarsal joint inflammation on gene expression and cross-sectional area in rat soleus muscle. **Brazilian journal of physical therapy**, v. 17, n. 3, p. 244–254, jan. 2013.

REDDY, R. S.; ALAHMARI, K. A. Effect of Lower Extremity Stretching Exercises on Balance in Geriatric Population. **International Journal of Health Sciences**, v. 10, n. 3, p. 371–377, jul. 2016.

REID, M. B.; LI, Y. P. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: A cellular perspective. **Respiratory Research**, v. 2, n. 5, p. 269–272, 2001.

REIS, G. H. dos et al. Avaliação Morfométrica Do Tecido Ósseo De Ratas Obesas Induzidas Por Dieta De Cafeteria. **Perspectivas Online - Biológicas e Saúde**, v. 6, n. 20, p. 19–29, 2016.

RENNER, A. F. et al. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 2, p. 196–202, 1 fev. 2006.

RESENDE, M. et al. Estudo da confiabilidade da força aplicada durante a mobilização articular ântero-posterior do tornozelo. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 10, n. 2, p. 199–204, 2006.

RILEY, D. A.; VAN DYKE, J. M. The Effects of Active and Passive Stretching on Muscle Length. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v.23, n.1, 51-57, fev. 2012.

RODACKI, A. L. F. F. et al. Transient effects of stretching exercises on gait parameters of elderly women. **Manual Therapy**, v. 14, n. 2, p. 167–172, abr. 2009.

ROHER, N. et al. The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α increases the amount of glucose transporter-4 at the surface of muscle cells independently of changes in interleukin-6. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1880–1889, abr. 2008.

RYAN, E. D. et al. Determining the minimum number of passive stretches necessary to alter musculotendinous stiffness. **Journal of Sports Sciences**, v. 27, n. 9, p. 957–961, 2009.

SALVINI, T. F. et al. One-Minute Bouts of Passive Stretching After Immobilization Increase Sarcomerogenesis in Rat Soleus Muscle. **Journal of Morphologicam Sciences**. v. 23, p. 271–277, 2006.

SALVINI, T. F.; PEVIANI, S. M.; RUSSO, T. L. Efeitos da eletroestimulação e do alongamento muscular sobre a adaptação do músculo desnervado – implicações para a fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 16, n. 3, p. 175–183, 2012.

SANTOS, C. X. et al. Static Stretching Intensity Does Not Influence Acute Range of Motion, Passive Torque, and Muscle Architecture. **Journal of Sport Rehabilitation**, v. 3, p. 1–6, 3 mar. 2019.

SATO, S. et al. The effects of static stretching programs on muscle strength and muscle architecture of the medial gastrocnemius. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7 July, p. e0235679, 9 jul. 2020.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS Journal**, v.17,4294-314, 2013.

SCHLEIP, R.; MÜLLER, D. G. Training Principles for Fascial Connective Tissues: Scientific Foundation and Suggested Practical Applications. **J Bodyw Mov Ther**, v. 17, n. 1, p. 103–115, jan. 2013.

SECCHI, K. et al. Efeito do alongamento e do exercício contra-resistido no músculo esquelético de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 3, p. 228–234, jun. 2008.

SEEMAN, E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. **Lancet**, v. 359, n. 9320, p. 1841–1850, 25 maio 2002.

SIMAS, J. M. M. arque. et al. Effects of physical exercise on the cartilage of ovariectomized rats submitted to immobilization. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 4, p. 574–579, 1 out. 2015.

SPYROPOULOU, A.; BASDRA, E. K. Mechanotransduction in bone: Intervening in health and disease. **World Journal of Experimental Medicine**,

v. 3, n. 4, p. 74, 2013.

STANZIANO, D. C. et al. The effects of an active-assisted stretching program on functional performance in elderly persons: A pilot study. **Clinical Interventions in Aging**, v. 4, n. 1, p. 115–120, 2009.

STAUBER, W. T.; WILLEMS, M. E. T. Prevention of histopathologic changes from 30 repeated stretches of active rat skeletal muscles by long inter-stretch rest times. **European Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 1–2, p. 94–99, 2002.

STEARNS-REIDER, K. M. et al. Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion. **Aging Cell**, v. 16, n. 3, p. 518–528, mar. 2017.

SUZUKI, K. Cytokine response to exercise and its modulation. **Antioxidants**, v. 7, n. 1, 1 mar. 2018

SZAFRANSKI, J. D. et al. Chondrocyte mechanotransduction: Effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 12, p. 937–946, dez. 2004.

TAKAHASHI, M. et al. Muscle excursion does not correlate with increased serial sarcomere number after muscle adaptation to stretched tendon transfer. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 11, p. 1774–1780, 1 nov. 2012.

TAMAKI, T.; HIRATA, M.; UCHIYAMA, Y. Qualitative alteration of peripheral motor system begins prior to appearance of typical sarcopenia syndrome in middle-aged rats. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 1–14, 2014.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biology of aging: Theories, mechanisms, and perspectives. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845–2857, set. 2010.

THOMAS, J. R.; NELSON, J. K. Métodos de Pesquisa em Atividade Física. Editora Artmed. 6ª edição, 2012.

TIELAND, M.; TROUWBORST, I.; CLARK, B. C. Skeletal muscle performance and ageing. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 1, p. 3–19, 2018.

TROMBETTI, A. et al. Age-associated declines in muscle mass, strength, power, and physical performance: impact on fear of falling and quality of life. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 2, p. 463–471, 21 fev. 2016.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. **Bone**, v. 14, n. 4, p. 595–608, 1993.

VAN DER POEL, C. et al. Ageing prolongs inflammatory marker expression in regenerating rat skeletal muscles after injury. **Journal of Inflammation**, v. 8, n. 1, p. 41, 2011.

- VASILCEAC, F. A. et al. The remodeling of collagen fibers in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatology International**, v. 31, n. 6, p. 737–742, 2011.
- VELLEMAN, S. G. et al. Review: The skeletal muscle extracellular matrix: Possible roles in the regulation of muscle development and growth. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 92, n. 1, p. 1–10, mar. 2012.
- VIDAL, R. et al. The effects of stretching on muscle morphometry of ovariectomized rats. **Fisioterapia em Movimento**, v. 33, p. 2020, 2020.
- VIEIRA, L. et al. Resistance exercise recovers the structure of cartilage and synovial membrane of the ankle joint of rats after sciatic compression. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, n. 3, 24 ago. 2017.
- WANG, J. et al. Inflammation and age-associated skeletal muscle deterioration (sarcopaenia). **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 10, p. 94–101, 1 jul. 2017.
- WATSON, S. L. et al. High-Intensity Resistance and Impact Training Improves Bone Mineral Density and Physical Function in Postmenopausal Women With Osteopenia and Osteoporosis: The LIFTMOR Randomized Controlled Trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 2, p. 211–220, fev. 2018.
- WATT, J. R. et al. Effect of a supervised hip flexor stretching program on gait in elderly individuals. **PM and R**, v. 3, n. 4, p. 324–329, 2011.
- WEPLER, C. H.; MAGNUSSON, S. P. Increasing Muscle Extensibility: A Matter of Increasing Length or Modifying Sensation? **Phys Ther**, v. 90, n. 3, p. 438–449, 2010.
- WESSNER, B. et al. Age-specific response of skeletal muscle extracellular matrix to acute resistance exercise: A pilot study. **European Journal of Sport Science**, v. 19, n. 3, p. 354–364, 16 mar. 2019.
- WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. **Journal of cell science**, v. 9, n. 3, p. 751–67, nov. 1971.
- WISDOM, K. M.; DELP, S. L.; KUHL, E. Use it or lose it: multiscale skeletal muscle adaptation to mechanical stimuli. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 14, n. 2, p. 195–215, abr. 2015.
- YLINEN, J. et al. Effect of stretching on hamstring muscle compliance. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 41, n. 1, p. 80–84, jan. 2009.
- YOU, L. et al. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. **Journal of Biomechanics**, v. 34, n. 11, p. 1375–1386, 2001.
- YOUNG, W.; ELIAS, G.; POWER, J. Effects of static stretching volume and intensity on plantar flexor explosive force production and range of motion. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 46, n. 3, p. 403–411,

2006.

YU, H. S. et al. Impact of mechanical stretch on the cell behaviors of bone and surrounding tissues. **Journal of Tissue Engineering**, v. 7, p. 204173141561834, 18 jan. 2016.

YWAZAKI, J. L. et al. Effects of resistive exercise and stretching on the soleus muscle of ovariectomized rats. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 23, n. 1, p. 74–83, mar. 2016.

ZAKAS, A. et al. Acute effects of stretching duration on the range of motion of elderly women. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 9, n. 4, p. 270–276, out. 2005.

ZALESKI, A. L. et al. Coming of Age: Considerations In the Prescription of Exercise For Older Adults. **Methodist DeBakey Cardiovascular Journal**, v. 12, n. 2, p. 98–104, 2016.

ZHANG, C. et al. Ageing characteristics of bone indicated by transcriptomic and exosomal proteomic analysis of cortical bone cells. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 14, n. 1, p. 129, 10 dez. 2019.

ZHAO, Z. et al. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homeostasis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.24, n.10, p. 5408-5419, maio 2020

ZIAALDINI, M. M. et al. Biochemical Pathways of Sarcopenia and Their Modulation by Physical Exercise: A Narrative Review. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 167, 4 out. 2017.

ZÖLLNER, A. M. et al. Stretching skeletal muscle: chronic muscle lengthening through sarcomerogenesis. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e45661, jan. 2012.

ZOTZ, T. G. et al. Acute effects of stretching exercise on the soleus muscle of female aged rats. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 1, p. 1–9, 2016.

ZOTZ, T. G. et al. Acute effects of stretching exercise on the soleus muscle of female aged rats. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2016b.

ZOTZ, T. G. G. et al. The development of a mechanical device to stretch skeletal muscle of young and old rats. **Clinics**, v. 74, 4 set. 2019.

ZÜGEL, M. et al. Fascial tissue research in sports medicine: From molecules to tissue adaptation, injury and diagnostics: Consensus statement. **British Journal of Sports Medicine**, v. 52, n. 23, p. 1497, 1 dez. 2018.

ANEXO A APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais



Curitiba, 03 de Dezembro de 2016.

PARTE DO PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 0552016 (EMENDA - Inclusão de Pesquisadores)

TÍTULO DO PROJETO: Efeito do abrigamento no metabolismo energético de ratos idosos: avaliação morfológica e molecular

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Taita Gláucio Sivato Zoti

EQUIPE DE PESQUISA: Taita Gláucio Sivato Zoti, Anna Raquel Silveira Gomes, Luciana de Fátima Chassis Ribeiro, Helene Ricci Ferra Martins, Rafael Zoti, Keli Lovison, Ana Paula Cunha Loureiro, José Fernando Baumgartner

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Saúde e Sociedades / Fisioterapia / FISIOT / Mestrado / Doutorado

VIGÊNCIA DO PROJETO	100015 e 110017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	40
ESPECIES/RAÇAS	Ratus norvegicus (Rata) (Rata)	Nº SEXO	Não se aplica
SEXO	Fêmeas	ATIVIDADES	Não se aplica
IDADE / PESO	3 a 20 meses / a partir de 250g	ESPÉCIE - GRUPO TAXONÔMICO	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Biotério - PUCPR	LOCAL (SE)	Não se aplica

O Colegiado da CEUA ratifica este protocolo que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Rio Chondra, sublinhamento Verkhvata (vermelho), para fins de pesquisa científica, em conformidade com as normas da Lei nº 11.794/2008 e Decreto nº 6.860/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA (Comitê Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **03.12.2016**. Se houver alteração do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR, descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificada e as suas justificativas. Se o protocolo, ou parte dele, for realizado em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar a coleta de dados e a realização final para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser controlado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requisitado por esta CEUA em qualquer tempo. Laborantes ao pesquisador que é obrigado conservar o material animal por ele e manter o livro de pesquisa e este CEUA.

Assinatura:
Prof. Dra. Marta Ludmila Fischer
Coordenadora - Comitê de Ética no Uso de Animais

Rua Francisco Corrêa, 1155 Prado Velho CEP 80215-901 Curitiba Paraná Brasil

ANEXO B APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1103

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.162524/2017-04

APROVADO/APPROVAL: 19/09/2017 – R.O. 08/2017

TÍTULO: Efeitos do Alongamento no músculo esquelético de ratas idosas: Avaliação morfológica e molecular.

TITLE: Effects of Skeletal Muscle Stretching on Aged Female Rats: Morphological and Molecular Evaluation.

AUTORES/AUTHORS: Talita Gianello Groato Zotz, Anna Raquel Silveira Gomes, Hilana Rickli Fluza Martins, Kátia Veiga Massanz, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, Rafael Zotz.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Prevenção e Reabilitação em Fisioterapia

Prof. Dra. Katya Natwiko
Coordenadora da CEUA

APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE 2017-2020

Artigos completos publicados em periódicos

MARTINS, H.R.F ; ZOTZ, T.G.G ; MESSA, S. P. ; CAPRIGLIONE, LUIZ GUILHERME A. ; ZOTZ, RAFAEL ; NORONHA, L. ; VIOLA DE AZEVEDO, MARINA LOUISE ; GOMES, A. R. S. . Morphometric and molecular muscle remodeling after passive stretching in elderly female rats. CLINICS **JCR** , 2020.

MASSEZ, K. J. V. ; ZOTZ, TALITA GNOATO ; **MARTINS, H.R.F** ; CAMPOS, T. M. ; BERTONCINI, N. ; CAPRIGLIONE, LUIZ GUILHERME A. ; NORONHA, LUCIA ; VIOLA DE AZEVEDO, MARINA LOUISE ; GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA . Effects of chronic stretching on soleus muscle of wistar female rats. International Journal of Morphology **JCR** , V. 38, P. 1039-1046, 2020.

GALLO DA SILVA, TAMIRES TEREZINHA; **MARTINS, HILANA RICKLI FIUZA** ; DE ALMEIDA, PABLO ; GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA. Correlações entre os componentes da aptidão física de idosos participantes de grupos de convivência. FISIOTERAPIA BRASIL, V. 20, P. 329-339, 2019.

Artigos Submetidos

HILANA RICKLI FIUZA MARTINS; ELISÂNGELA VALEVEIN RODRIGUES, LUIZA HERMINIA GALLO, RICARDO LEHTONEN R. DE SOUZA; LUPE FURTADO-ALLE; ANNA RAQUEL SILVEIRA GOMES. Relationship of telomere length with musculoskeletal function in fallers and non-fallers community-dwelling older women. Submetido na Revista Maturitas.

HILANA RICKLI FIUZA MARTINS; GRAZIELA GERSTER; MARCOS VINICIUS SOARES MARTINS; ANNA RAQUEL SILVEIRA GOMES. **The effectiveness of physical exercise in the management of osteosarcopenia in older women: a systematic review and meta-analysis.** Submetido na revista Clinical and Experimental Rheumatology.

Resumos publicados e/ou apresentados em congresso

Martins, Hilana Rickli Fiuza; MASSENZ, K. J. V. ; BERTONCINI, N. ; CAMPOS, T. M. ; GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA ; ZOTZ, TALITA GNOATO . Skeletal muscle extracellular matrix (ECM) adaptation after chronic stretching exercise in aged female rats. In: International Conference on Frailty and Sarcopenia Research, 2018, Miami. The Journal of Frailty & Aging, 2018. v. 7. p. 152-153.

Martins, Hilana Rickli Fiuza; MICHALOUSKY, R. F. ; MOLINA, G. C. ; BENDHACK, L ; VOJCIECHOWSKI, A. S ; BIESEK, S. ; Gallo, LH ; GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA . RELATION BETWEEN FRAILTY CRITERIA AND QUALITY OF LIFE IN PRE-FRAIL COMMUNITY DWELLING OLDER WOMEN.

In: International Conference on Frailty and Sarcopenia Research, 2018, Miami. The Journal of frailty and aging. v. 7. p. 112-112.

Martins, Hilana Rickli Fiuza; BIESEK, S ; MELO FILHO, J ; VOJCIECHOWSKI, A. S ; FERREIRA, A. B ; TORMES, G. A ; RABITO, E. I ; PINTARELLI, V. L ; GOMES, A. R. S. . EVALUATION OF CALF CIRCUMFERENCE AND MEDIAL GASTROCNEMIUS THICKNESS IN PRE FRAIL COMMUNITY-DWELLING OLDER WOMEN. In: International Conference on Frailty and Sarcopenia Research, 2018, Miami. The Journal of Frailty & Aging©, 2018. v. 7.

MASSEZ, K. J. V. ; **Martins, Hilana Rickli Fiuza** ; GOMES, A. R. S. ; LOUREIRO, A. P. C. ; SANTANA, D. M. ; CAPRIGLIONE, LUIZ GUILHERME A. ; ZOTZ, T.G.G . CORRELAÇÃO ENTRE A FORÇA APLICADA PARA PROMOVER O ALONGAMENTO MUSCULAR E A HISTOMORFOMETRIA DO MÚSCULO SÓLEO EM RATAS JOVENS E IDOSAS. In: XI Congresso Gaúcho de Ortopedia e Traumatologia e III Jornada Gaúcha da Abrafito, 2018, Gramado-RS. Anais do XI Congresso Gaúcho de Ortopedia e Traumatologia e III Jornada Gaúcha da Abrafito, 2018.

GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA ; **Martins, Hilana Rickli Fiuza** ; MASSENZ, K. J. V. ; BERTONCINI, N. ; CAMPOS, T. M. ; NORONHA, L. ; AZEVEDO, M. L. V. ; NAGASHIMA, S. ; ZOTZ, T.G.G . EFFECTS OF CHRONIC STRETCHING ON MUSCLE TROPHISM AND CONNECTIVE TISSUE IN AGED FEMALE RATS. In: World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (WCO-IOF-ESCEO 2018), 2018, Krakow, Poland. World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (WCO-IOF-ESCEO 2018), 2018. v. 29. p. 270-271.

MASSENZ, K. J. V. ; SCHEWTSCHIK, A. F. ; **MARTINS, H.R.F** ; GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA ; LOUREIRO, A. P. C. ; ZOTZ, TALITA GNOATO . EFFECTS OF A CHRONIC STRETCHING PROTOCOL IN THE SOLEUS MUSCLE HISTOMORPHOMETRY OF AGED FEMALE RATS.. In: International Conference on Frailty & Sarcopenia Research, 2017, Barcelona. The Journal of Frailty & Aging. Tolosane- França: The Journal of Frailty & aging, 2017. v. 6. p. 63-63.

MASSEZ, K. J. V. ; SCHEWTSCHIK, A. F. ; **MARTINS, H.R.F** ; GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA ; LOUREIRO, A. P. C. ; SANTANA, D. M. ; ZOTZ, T.G.G . Efeitos crônicos do exercício de alongamento mecânico passivo estático na área de secção transversa do músculo sóleo de ratas jovens e idosas. In: XXVII Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia, 2017, Curitiba. XXVII Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia. Curitiba: Sociedade Paranaense de Geriatria e Gerontologia, 2017. v. 1.

Zotz, T.G.G ; MASSENZ, K. J. V. ; SCHEWTSCHIK, A. F. ; **MARTINS, H.R.F** ; SANTANA, D. M. ; GOMES, A. R. S. . Efeitos crônicos do exercício de alongamento mecânico passivo estático no músculo sóleo de ratas jovens e idosas: avaliação de comprimento muscular e sarcômeros em série. In: XX Congresso Sul Brasileiro de Ortopedia e Traumatologia e Jornada Paranaense de Fisioterapia traumato-ortopédica, 2017, Curitiba. XX Congresso Sul Brasileiro

de Ortopedia e Traumatologia e Jornada Paranaense de Fisioterapia traumato-ortopédica, 2017. v. XX.

GOMES, A. R. S. ; VOJCIECHOWSKI, A. S. ; SCHEWTSCHIK, A. F. ; LOUREIRO, A. P. C. ; CAPRIGLIONE, LUIZ GUILHERME A. ; **MARTINS, H.R.F** ; ZOTZ, T.G.G . Effects of passive mechanical stretching exercise on soleus muscle of female aged rats. In: 21 st World Congress of Gerontology and Geriatrics, 2017, San Francisco. Innovation in aging. San Francisco: Gerontology Society of America, 2017. v. 1. p. 1390-1391.

MARTINS, H.R.F ; SILVA, T. T. G. ; ALMEIDA, P. ; GOMES, A. R. S. . CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS FÍSICOFUNCIONAIS DE IDOSAS DA COMUNIDADE FREQUENTADORAS DE GRUPOS DE CONVIVÊNCIA. In: XI Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, 2017, Florianópolis. Evidências e Boas práticas em Atividade Física e Saúde. Pelotas, Rio Grande do Sul, Br: Rev Bras Ativ Fís Saúde, 2017. v. 22. p. 533-533.

MASSENZ, K. J. V. ; **MARTINS, H.R.F** ; GOMES, A. R. S. ; LOUREIRO, A. P. C. ; SANTANA, D. M. ; ZOTZ, T.G.G . EFEITOS CRÔNICOS DO ALONGAMENTO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA LONGITUDINAL NO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS IDOSAS. In: I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro Abrafito, 2017, Brasília. I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro Abrafito. Curitiba: Revista Inspirar Movimento & Saúde- Revista Eletrônica Inspirar Suplemento 1, 2017. v. 9. p. 72-72.

MASSEZ, K. J. V. ; SCHEWTSCHIC, A. F. ; **MARTINS, H.R.F** ; GOMES, A. R. S. ; SANTANA, D. M. ; ZOTZ, T.G.G . EFEITOS CRÔNICOS DO EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO MECÂNICO PASSIVO ESTÁTICO NA HISTOMORFOMETRIA RADIAL E LONGITUDINAL DO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS JOVENS. In: I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro da Abrafito, 2017, Brasília. Anais do I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro da Abrafito. Curitiba: Revista Inspirar Movimento & Saúde- Revista Eletrônica Inspirar Suplemento 1, 2017. v. 9. p. 84-84.

Martins, Hilana Rickli Fiuza; ZOTZ, TALITA GNOATO ; MESSA, S. P. ; NORONHA, L. ; AZEVEDO, M. L. V. ; GOMES, A. R. S. . MUSCLE STRETCHING EXERCISE REDUCES FIBROSIS IN THE SOLEUS MUSCLE OF AGED FEMALE RATS. In: International Conference on Frailty and Sarcopenia Research, 2016, Philadelphia. The Journal of Frailty & Aging, 2016. v. 5. p. 59-59.

Martins, Hilana Rickli Fiuza; ZOTZ, TALITA GNOATO ; MESSA, S. P. ; NORONHA, L. ; AZEVEDO, M. L. V. ; GOMES, A. R. S. . MUSCLE STRETCHING EXERCISE REDUCES FIBROSIS IN THE SOLEUS MUSCLE OF AGED FEMALE RATS. In: International Conference on Frailty and Sarcopenia Research, 2016, Philadelphia. The Journal of Frailty & Aging, 2016. v. 5. p. 59-59.

STONOAGA, E. ; GOMES, ANNA RAQUEL SILVEIRA ; **MARTINS, H.R.F** ; CAMPOS, T. M. ; MASSENZ, K. J. V. ; ZOTZ, TALITA GNOATO . Efeito do

exercício de alongamento intermitente no trofismo do músculo sóleo de ratas idosas. Congresso Brasileiro e Internacional da Abrafito, 2019.

Martins, Hilana Rickli Fiuza; CAMPOS, T. M. ; ZOTZ, T.G.G ; STONOGA, E. ; MASSEZ, K. J. V. ; GOMES, A. R. S. . COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO ALONGAMENTO NA SARCOMEROGÊNESE DO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS JOVENS E IDOSAS. 11º Congresso Sul-Brasileiro de Geriatria e Gerontologia, XXIX Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia de VII Simpósio Idoso na Atenção Primária.

Martins, Hilana Rickli Fiuza; RODRIGUES, E. V. ; GALLO, L. H. ; GOMES, A. R. S. . CORRELAÇÃO ENTRE COMPRIMENTO DO TELÔMERO E FUNÇÃO MUSCULOESQUELÉTICA EM IDOSAS DA COMUNIDADE 11º Congresso Sul-Brasileiro de Geriatria e Gerontologia, XXIX Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia de VII Simpósio Idoso na Atenção Primária.

OLIVEIRA, M. C. ; **Martins, Hilana Rickli Fiuza** ; BOARETTO, M. L. ; GOMES, A. R. S. ; ZOTZ, T.G.G ; RIBEIRO, L. F. C. . 'ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE NÚCLEOS DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATAS IDOSAS SUBMETIDAS AO ALONGAMENTO PASSIVO'. 7º COSIMP - 7º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 7º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul e 2º Encontro de Pesquisa e Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - COSIMP, realizado no período de 07 a 09 de novembro de 2018, no (a) Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus Cascavel 2018

RANK FILHO, C. A. ; PEREIRA, C. H. ; DIAS, F. A. L. ; GOMES, A. R. S. ; **Martins, Hilana Rickli Fiuza** ; MASSENZ, K. J. V. ; STONOGA, E. ; ZOTZ, T.G.G . ANÁLISE DO TRAÇADO ELETROCARDIOGRÁFICO EM RATAS IDOSAS. Jornada Acadêmica de Fisioterapia- UFPR 2018 2018.

RANK FILHO, C. A. ; PEREIRA, C. H. ; DIAS, F. A. L. ; GOMES, A. R. S. ; **Martins, Hilana Rickli Fiuza** ; MASSENZ, K. J. V. ; BERTONCINI, N. ; STONOGA, E. ; ZOTZ, TALITA GNOATO . Análise da variabilidade da frequência cardíaca de ratas idosas. Jornada Acadêmica de Fisioterapia- UFPR 2018 2018.

CAMPOS, T. M. ; BERTONCINI, N. ; **Martins, Hilana Rickli Fiuza** ; GOMES, A. R. S. ; NORONHA, L. ; ZOTZ, T.G.G . efeito crônico do exercício de alongamento no colágeno tipo I do músculo sóleo de ratas jovens e idosas. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

ZOTZ, T.G.G ; MASSENZ, K. J. V. ; SCHEWTSCHIC, A. F. ; **MARTINS, H.R.F** ; SANTANA, D. M. ; GOMES, A. R. S. . efeitos crônicos do exercício de alongamento mecânico passivo estático no músculo sóleo de ratas jovens e idosas: avaliação de comprimento muscular e sarcômeros em série.. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em bancas de comissões julgadoras

Processo avaliativo do Edital PROEPPI Unificado de Pesquisa n.º 04/2018. 2018. Instituto Federal do Paraná

Processo de Avaliação de Projeto de Pesquisa do Edital 2018 do Programa de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná. 2018. Universidade Federal do Paraná.

Debatedor dos trabalhos inscritos no XXVII Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC, realizado no período de 22 a 26 de outubro de 2018. 2018. Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Debatedor(a) no XXVI Encontro Anual de Iniciação Científica EAIC, que integra o evento de extensão: V SIEPE DIREITOS HUMANOS: DIALOGANDO SOBRE A DIVERSIDADE,. 2017. Universidade Estadual do Centro-Oeste

Palestra:

Congresso do aparelho locomotor: Painel de evidências- Envelhecimento em Foco. Guarapuava 2018

Jornada acadêmica da residência de Fisioterapia do Hospital Regional de Ponta Grossa: Atuação fisioterapêutica na reabilitação cardíaca. Ponta Grossa 2018

Semana do Idoso promovida pela Residência em Saúde do Idoso. Hospital Regional de Ponta Grossa 2019.

Participação em congresso

11º Congresso Sul-Brasileiro de Geriatria e Gerontologia, XXIX Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia de VII Simpósio Idoso na Atenção Primária. Curitiba, 2019

International Conference on Frailty & Sarcopenia Research. Miami, 2018

I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro da ABRAFITO, Brasília 2017

XI Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde. Florianópolis, 2017

Visita Técnica:

Department of Physical Therapy at Florida International University (FIU) in Miami, USA from February 26 to 28, 2018.