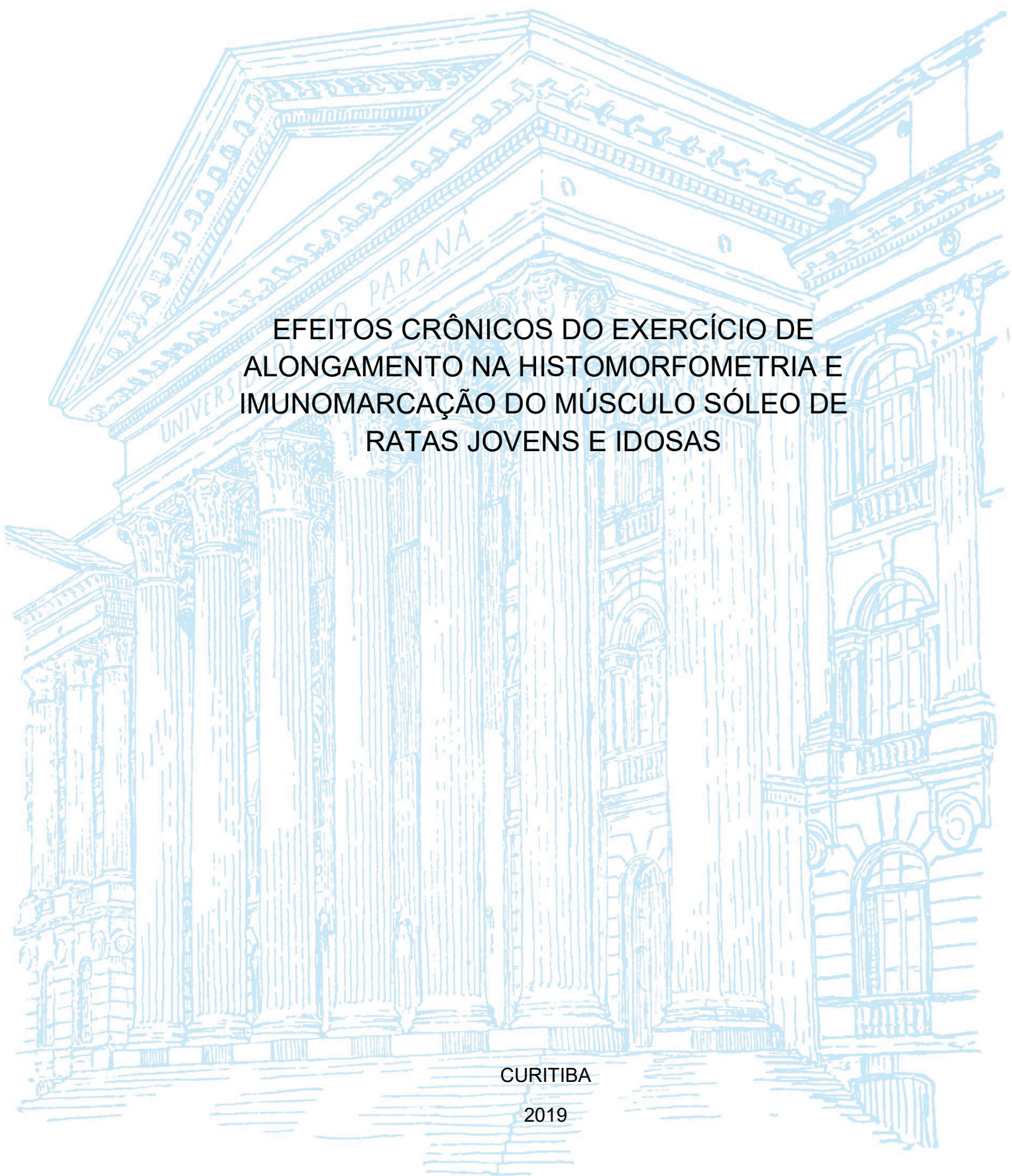


KÁTIA JANINE VEIGA MASSENZ



EFEITOS CRÔNICOS DO EXERCÍCIO DE
ALONGAMENTO NA HISTOMORFOMETRIA E
IMUNOMARCAÇÃO DO MÚSCULO SÓLEO DE
RATAS JOVENS E IDOSAS

CURITIBA

2019

KÁTIA JANINE VEIGA MASSENZ

EFEITOS CRÔNICOS DO EXERCÍCIO DE
ALONGAMENTO NA HISTOMORFOMETRIA E
IMUNOMARCAÇÃO DO MÚSCULO SÓLEO DE
RATAS JOVENS E IDOSAS

Dissertação ao curso de Pós-Graduação em Educação Física, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientadora: Anna Raquel Silveira Gomes.

Co-orientadora: Talita Gianello Gnoato Zotz.

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Massenz, Kátia Janine Veiga

Efeitos crônicos do exercício de alongamento na histomorfometria e imunomarcagem do músculo sóleo de ratas jovens e idosas. / Kátia Janine Veiga Massenz. – Curitiba, 2019.

110 p.: il.

Orientador: Anna Raquel Silveira Gomes

Coorientador: Talita Gianello Gnoato Zotz

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

1. Envelhecimento 2. Exercícios de alongamento 3. Mecanotransdução celular I. Título II. Gomes, Anna Raquel S., 1976 III. Zotz, Talita Gianello Gnoato 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 SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EDUCAÇÃO FÍSICA -
40001016047P0

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 dissertação de Mestrado de **KÁTIA JANINE VEIGA MASSENZ** intitulada: **Efeitos crônicos do exercício de alongamento na histomorfometria e imunomarcção do músculo sóleo de ratas jovens e idosas**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 08 de Fevereiro de 2019.

ANNA RAQUEL SILVEIRA GOMES
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

TALITA GIANEZLO GNOATO ZOTZ
Coorientador - Avaliador Externo (UFPR)

LUIZ CLAUDIO FERNANDES
Avaliador Externo (UFPR)

FERNANDO AUGUSTO LAVEZZO DIAS
Avaliador Externo (UFPR)

**Dedico essa dissertação às minhas tias Cátia Maria e Denise Travaglia (Denaises),
por abrirem mão de seus sonhos para incentivarem os meus!**

“A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor” (Chico Xavier).

AGRADECIMENTOS

Ao Universo por ter conspirado tanto a meu favor durante momentos decisivos em minha vida.

À Ciência

À Deus

Á Urcesino e Judite, meus queridos avô e avó, sem vocês eu nada seria, eu nada faria! As duas pessoas que dedicaram suas vidas a trabalhar para me educar e me criar da melhor maneira que podiam! Amo vocês!

À família, à minha mãe, meus irmãos (Rodrigo, Rubia e Daniel), minhas cunhadas Luana e Ana, minha Tia Carla e meu Tio Valdemir. Obrigada por me apoiarem e darem palavras de conforto durante esse trajeto. Obrigada por entenderem minha ausência em momentos essenciais! Independentemente de qualquer coisa, sei que sempre poderei contar com vocês e o contrário também é verdadeiro! Amo vocês!

À Giani Sabbi Pedrozo, querida amiga! Obrigada por me ouvir durante esses nossos 14 anos de amizade! Saiba que mesmo longe de você e dos meus afilhados que eu amo tanto, eu sempre estarei aqui para apoiar você em tudo, assim como você faz nos bons e maus momentos da vida! Obrigada por ter me dito palavras de carinho e ter me lembrado (em momentos que eu havia esquecido), o quanto eu batalhei para chegar tão longe, e por não me deixar desistir! Amo você minha irmã!

À Milca Rayssa (Milketis do brigadeiro nosso de todo dia!) Amiga, nós passamos por muitos momentos difíceis durante esses últimos dois anos. Obrigada por cada conversa, cada desabafo, de certa forma tenho certeza que o melhor acontecimento da vida foi a gente ter dividido o AP! Ganhei uma família (eu, você, Pri e Sandroca) em Curitiba! Já estou com saudades! Te amo amiga!

A Déborah e Emelly, minhas bbs! Amigas queridas, que desde a monitoria da PUCPR acompanharam minha aflição desde o processo seletivo até esse momento da defesa final! Amigas, sem vocês nada teria tanta graça, obrigada por serem tão vocês na minha vida! Embora a gente se fale do nosso jeito (daquele jeito) quero que saibam que vocês são essenciais na minha vida! Amo vocês!

A Alana Vidoreto, minha comadre que desde a faculdade topa tudo comigo e me apoia em todas escolhas que faço! Somos tão diferentes e mesmo assim, tão unidas! Te amo amiga, obrigada por me apoiar sempre!

À Hilana, que durante todas as etapas do mestrado me acompanhou e me ensinou muito sobre a paciência e persistência! Muito obrigada pelas palavras de alento nos momentos mais difíceis e pela compreensão em todas as fases da Kátia no mestrado! Obrigada, você é um exemplo para mim!

A Karina, querida colega que entrou comigo no mestrado! Nós compartilhamos diversos momentos desde a entrevista do processo seletivo! Obrigada por cada angustia e momento feliz nós dividimos até o momento da entrega da dissertação!

Às IC'S, Talita Campos, Nayara e Elizandra pelo companheirismo na rotina do Biotério, pelos cafés e risadas diárias!

A Anna Paula Cunha Loureiro, a professora que me encaminhou para a minha iniciação científica, que viu o meu potencial antes mesmo de eu entender quem eu queria ser profissionalmente! Obrigada por me ensinar tanto! Com certeza, sem o seu apoio eu não estaria onde estou hoje! Amo você!

À Rafael Zotz, por ter me ensinado o manejo com as ratas, ensinar tudo sobre experimentação desde meu primeiro contato com os animais durante a minha iniciação científica! E, pelo cuidado e zelo com as ratas no biotério da PUCPR!

Ao grupo de pesquisa com Idosas Humanas Audrin, Jarbas, Simone, obrigada por terem me aceitado, me incluído e me ensinado sobre o projeto de vocês nos meus primeiros meses de mestranda! Com certeza tudo que me ensinaram eu levarei para vida! Obrigada!

Aos veterinários Daniele Moro Santana e Luiz Guilherme e ao Laboratório de Cultivo Celular da PUCPR por terem participado da anestesia dos animais e terem cedido a estrutura para que a coleta do experimento 3 semanas acontecesse e tenha sido um sucesso!

Aos colaboradores do Laboratório de Patologia da PUCPR, Ana Paula, Marina e Seigo! Vocês me ouviram em momentos difíceis, toparam e me auxiliaram em cada piloto, cada fotografia, cada segundo que dedicaram para tirar minhas dúvidas e para me ouvir durante esses 4 anos!

A Prof^a Lúcia Noronha, por ceder o espaço do Laboratório de Patologia para a realização do experimento do meu mestrado e iniciação científica, obrigada!

Aos colaboradores do Laboratório do Professor Mário Navarro da UFPR e Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR por todo auxílio e paciência durante os experimentos que realizamos lá ao longo do meu mestrado! Por permitirem nossa entrada no laboratório e pela receptividade!

À empresa Knittel que doou as lâminas de imunohistoquímica permitindo a continuação da minha pesquisa de mestrado, vocês foram essenciais!

Aos membros da banca por aceitarem o convite e por avaliarem esse trabalho desde a banca de qualificação! Com toda certeza suas contribuições elevaram a qualidade e nível científico dessa dissertação!

Ao PPGEDF por fornecer estrutura física e apoio permitindo a execução de meu mestrado.

Ao Rodrigo servidor técnico do PPGEDF que me auxiliou em todas etapas do mestrado, sempre prestativo em esclarecer minhas dúvidas e pela compreensão que teve comigo em momentos de aflição!

A todos que contribuíram de alguma maneira para que esse momento chegasse!

A CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. (This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001).

GRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Duuudu

Quando nos conhecemos, aos 18 anos, não tínhamos planos, nem um caminho a seguir. Com o tempo eu me dediquei a estudar, fazer faculdade e me lembro de compartilhar com você as angústias desde o primeiro vestibular que prestei (em 2011!). Nos meus melhores e piores momentos, me lembro de contar com você. Nos últimos 8 anos as circunstâncias da vida nos afastaram fisicamente, mas ainda acredito que é o que sentimos que nos aproxima de maneira sobrenatural. Da maneira que pôde, você me acompanhou até esse momento, obrigada por me apoiar e por importar-se acima de tudo!

*Duvida da luz dos astros,
De que o sol tenha calor,
Duvida até da verdade,
Mas confia em meu amor.
(William Shakespeare)*

À Talita Gnoato Zotz e Anna Raquel

Talita, você me deu a oportunidade de desenvolver minha iniciação científica. Você e o Rafael me ensinaram tudo que sei desde os cuidados com as caixas até a manipulação correta de um rato! Você me ensinou também sobre a empatia, paciência e sobre a humildade! Obrigada por ter me ensinado tanto durante esses 4 anos que passamos juntas! Me mostrou o potencial que eu tinha para entrar no mestrado e me apoiou em todas etapas do processo, lembra? Foi você que viu que eu tinha passado na prova e me ligou para contar! Obrigada por ter me orientado e me ensinado sobre como escrever um artigo (desde o TCC), sobre como rodar a estatística, como isolar uma fibra muscular na lupa! Você com certeza me ensinou muito! No mestrado, com você aprendi a como redigir os projetos de iniciação científica e como auxiliar as alunas de graduação! Espero que possamos seguir essa parceria sempre, você é um exemplo! Obrigada!

Anna Raquel, quem nos apresentou foi a Talita (também sou muito grata a ela por isso!). Obrigada por ter me aceitado como aluna de mestrado, obrigada por me ensinar tudo que sei sobre a docência! Desde o princípio eu tive meus medos e incertezas, mas para cada momento de fraqueza meu, você teve a palavra correta de motivação, o empurrão que eu precisava para não desistir dos meus sonhos! Obrigada pela experiência que vivenciamos na minha prática docente, pelos momentos de descoberta e alegria que compartilhamos nos hospitais HT e HC! Com certeza foi de um crescimento imensurável, fato que fica evidenciado na nossa publicação do resumo, resultado de todo nosso esforço naqueles meses! Você me ensinou a preparar uma aula, a ser humilde e reconhecer nossas limitações! Me ensinou tudo que sei sobre escrever um ofício, sobre escrever um projeto para o CEP, sobre ser política e entender que para cada momento de empolgação, deve haver um mesmo momento de coerência e paciência! Obrigada por ser com toda certeza um exemplo de profissional (fisioterapeuta e também professora!)

Vocês duas me ensinaram que na vida cada momento deve ser vivido na intensidade merecida e que mesmo nas falhas somos capazes de crescer, obrigada por terem me orientado e terem permitido meu crescimento tanto pessoal, como profissional durante esses quatro anos! Juntas iremos, sempre, mais longe!

RESUMO

Introdução: A realização do exercício de alongamento, dependendo do tipo, intensidade, volume, frequência e período de treinamento pode promover respostas intracelulares, variando de acordo com a fase da vida, isto é, criança, adulto ou idoso. As respostas intracelulares podem ser identificadas como modificações histomorfométricas, as quais são responsivas a ativação dos componentes da matriz extracelular no músculo esquelético, como por exemplo, o colágeno I e III. Com o processo de envelhecimento verifica-se declínio físico e redução da amplitude de movimento articular, que contribuem para a redução da massa muscular, tanto radial denominada sarcopenia, como longitudinal, identificada pela diminuição do comprimento muscular e do número de sarcômeros em série. Em idosos o fator inflamatório como TNF- α pode ativar vias da atrofia muscular e contribuir na ativação do fator β do crescimento (TGF β), que podem afetar a massa muscular e os colágenos I e III. **Objetivos:** Avaliar os efeitos crônicos do exercício de alongamento mecânico passivo estático na histomorfometria e imunomarcação do músculo sóleo de ratas jovens e idosas. **Métodos:** Trinta e oito *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar* albino, fêmeas foram divididas em grupo controle jovem (GCJ, n=8, 253 \pm 12g); grupo alongamento jovem (GAJ, n=10, 274 \pm 50g); grupo controle idoso (GCI, n=7, 335 \pm 39g) e grupo alongamento idoso (GAI, n=7, 321 \pm 32g). O alongamento foi realizado no músculo sóleo esquerdo, 3 vezes por semana, durante 3 semanas por meio de um aparato de alongamento, com a rata anestesiada. O protocolo de alongamento consistiu de 4 repetições, 60 segundos cada repetição, com intervalo de 30 segundos entre as repetições, em cada sessão. No dia seguinte após a última sessão de alongamento, as ratas foram anestesiadas, e o músculo sóleo esquerdo foi dissecado, pesado em balança de precisão, mensurado com paquímetro digital e em seguida, armazenado para posterior preparo das lâminas de hematoxilina eosina (HE); contagem de sarcômeros em série e de imunomarcação para análise de colágeno tipo I, colágeno III, TGF- β 1 e TNF- α , em microscopia de luz. As análises histomorfométricas (área de secção transversa das fibras musculares-ASTFM) foram realizadas por meio do software *ImageJ* (1.52a USA), enquanto que a porcentagem de imunomarcação foi realizada por meio do software *Image Pro Plus versão 4.1*. A análise de normalidade dos dados foi realizada por meio do teste *Shapiro-Wilk* e a homogeneidade pelo teste *Levene*. Quando os dados apresentaram distribuição normal e homogênea aplicou-se os testes *T-student* pareado, para avaliação do peso corporal inicial (1º dia) e final (9º dia). Para comparação dos dados intergrupos e intragrupos de dados normais aplicou-se o teste paramétrico ANOVA- *one way, post hoc Tukey*. Enquanto que para os dados não normais, aplicou-se o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. A correlação entre as variáveis paramétricas foi analisada pelo teste de *Pearson* e para as variáveis não paramétricas pelo teste de *Sperman*. A significância dos dados foi considerada quando $p \leq 0,05$. **Resultados:** A massa muscular absoluta não diferiu na comparação intragrupos ($p > 0,05$) ou intergrupos ($p > 0,05$). Porém, foi verificada menor massa muscular relativa ao peso corporal no GAI (0,04 \pm 0,02) comparado ao GAJ (0,06 \pm 0,00) $p = 0,00$, *Kruskal-Wallis*. A ASTFM foi significativamente maior no GAJ em comparação com o GCJ (5681,15 μ m² \pm 1943,61 μ m² vs 5119 \pm 1857,73 $p = 0,00$ *Kruskal-Wallis*). Enquanto que em ratas idosas verificou-se menor ASTFM no GAI comparado ao GCI (3919,54 μ m² \pm 1694,65 μ m² vs 4172,82 μ m² \pm 1446,08 μ m² $p = 0,00$, *Kruskal-Wallis*). O comprimento muscular foi maior no GAI quando comparado ao GCI (25,12mm \pm 2,46mm vs 22,14mm \pm 2,56mm $p = 0,04$ ANOVA *one way Post Hoc Tukey*). E o comprimento dos sarcômeros maior em GAI em relação ao GAJ (1,85 μ m \pm 0,20 μ m vs 2,23 μ m \pm 0,26 μ m $p = 0,00$, *Kruskal-Wallis*). A porcentagem de colágeno I foi maior no GAJ do que no GAI (7,44% \pm 7,18 vs 0,07% \pm 0,09 $p = 0,02$ *Kruskal-Wallis*). Assim como a porcentagem de colágeno III quando comparados GAJ com GAI (14,37% \pm 9,54% vs 5,51% \pm 5,52% $p = 0,00$ *Kruskal-Wallis*). A porcentagem

de TNF- α foi maior em GAI do que em GAJ ($41,87\% \pm 40,19$ vs $1,72\% \pm 2,02$ $p=0,00$ Kruskal-Wallis). A porcentagem de epimísio foi maior no GAJ comparado ao GCJ ($201,83 \pm 132,07\%$ vs $181,09 \pm 147,04\%$, $p = 0,00$ Kruskal-Wallis). **Conclusão:** A sarcopenia foi detectada no músculo envelhecido. Alongamento induziu hipertrofia, sarcomerogênese e aumentou colágeno I e colágeno III no músculo jovem. Em contraste, o alongamento no músculo envelhecido causou hipotrofia e degradação da matriz provavelmente modulada pelo TNF- α .

Palavras-chave: envelhecimento; exercício de alongamento muscular; mecanotransdução celular; plasticidade muscular.

ABSTRACT

Introduction: Stretching exercise, depending on the type, intensity, volume, frequency and training period can stimulate intracellular responses, depending on life-stage, i.e., child, adult or elderly. The cell responses can be histomorphometric modifications induced by the activation of extracellular matrix components in the skeletal muscle, such as collagen I and III. Aging is associated with physical decline and a decrease in joint range of motion, which contribute to reduce muscular mass, both radially denominated sarcopenia, and longitudinal, identified by the decrease of muscle length and serial sarcomere number. In older people inflammatory factor such as TNF- α can stimulate atrophy pathways and contribute to the activation of transforming growth factor (TGF β), which might affect muscle mass and collagens I and III. **Objectives:** To evaluate the effects of mechanical passive static stretching exercise on the histomorphometry and immunostaining of soleus muscle in young and old rats. **Methods:** Thirty-eight *Rattus norvegicus*, *Wistar* albino females were divided into young control group (YCG, n = 8, 253 \pm 12g); young stretching group (YSG, n = 10, 274 \pm 50g); aged control group (ACG, n = 7, 335 \pm 39g) and aged stretching group (ASG, n = 7, 321 \pm 32g). The stretching was carried out on the left soleus muscle, 3 times a week, for 3 weeks by means of a stretching apparatus. The stretching protocol consisted of 4 repetitions, lasting 60s each, with a 30s interval between repetitions, in each session. The day after last stretching session, under anesthesia, left soleus muscle was dissected, weighed on a precision scale, measured with a digital caliper and then prepared for hematoxylin eosin slides (HE); serial sarcomeres number and immunohistochemistry for analysis of collagen type I, collagen III, TGF- β 1 and TNF- α , through a light microscopy. The histomorphometric analysis muscle fiber cross sectional area-MFCSA were measured through *ImageJ software* (1.52a, USA), while the percentage of immunostaining was performed using *Image Pro Plus software* (4.1, USA). Analysis of data normality was performed using the *Shapiro-Wilk* test and for homogeneity *Levene's test*. When the data were normal distributed and homogeneous, it was used paired student t test to compared initial (1st day) and final (day 9) body weight. Comparisons within and between for parametric data was used ANOVA - *one way*, post hoc Tukey. When nonparametric Kruskal Wallis test was run. Correlations between parametric variables were analyzed by the Pearson test and for the non-parametric variables by the Sperman test. The significance was set at $p \leq 0.05$. **Results:** The absolute muscle mass did not differ intragroup ($p > 0.05$ ANOVA-one way, Post Hoc Tukey) or intergroups comparisons ($p > 0.05$ Kruskal-Wallis test) Although, muscle mass relative to body weight was lower in ESG compared to YSG (0.04% \pm 0.02% vs 0.06% \pm 0.00% $p = 0.00$ *Kruskal Wallis*). MFCSA was significantly higher in the YSG compared to YCG (5681.15 μ m² \pm 1943.61 μ m² vs 5119.84 μ m² \pm 1857.73 μ m², $p = 0.00$, Kruskal Wallis). While in older rats it was observed lower MFCSA in ESG compared to ECG (3919.54 μ m² \pm 1694.65 μ m² vs 4172.82 μ m² \pm 1446.08 μ m² $p = 0.00$ Kruskal-Wallis). Muscle length was higher in ESG compared to ECG (25.12mm \pm 2.46mm vs 22.14mm \pm 2.56mm $p = 0.04$, ANOVA *one way Post Hoc Tukey*). Sarcomere length was higher in ESG compared with YSG (2.23 μ m \pm 0.26 μ m vs 1.85 μ m \pm 0.20 μ m, $p = 0.00$, Kruskal-Wallis). The percentage of collagen I was greater in YSG in comparison with ESG (7.44% \pm 7.18 vs 0.07% \pm 0.09%, $p = 0.02$, Kruskal-Wallis). As well as the percentage of collagen III when compared YSG with ESG (14.37% \pm 9.54% vs 5.51% \pm 5.52%, $p = 0.00$, Kruskal-Wallis). The percentage of TNF- α was superior in ESG compared to YSG (41.87% \pm 40.19 vs 1.72% \pm 2.02 $p = 0.00$ Kruskal-Wallis). Epimysium was larger in the YSG compared to YCG (201.83 \pm 132.07% vs 181.09 \pm 147.04%, $p = 0.00$, Kruskal-Wallis). **Conclusion:** Sarcopenia was detected in aged muscle. Stretching induced hypertrophy, sarcomerogenesis and increased

collagen I and collagen III in young muscle. In contrast, stretching on aged muscle caused hypotrophy and matrix degradation probably modulated by TNF- α .

Keywords: aging; muscle stretching exercise; cellular mechanotransduction; muscle plasticity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desfechos do efeito crônico do alongamento em animais jovens.	55
Tabela 2. Comparação da massa corporal inicial (1º dia de alongamento) vs massa corporal final (9º dia de alongamento).....	72
Tabela 3. Comparação da massa corporal inicial e final, massa muscular absoluta e massa muscular relativa entre os grupos.....	73
Tabela 4. Efeito do exercício de alongamento crônico na ASTFM do músculo sóleo de ratas jovens e idosas.	73
Tabela 5. Efeito do exercício de alongamento crônico no comprimento do músculo sóleo de ratas jovens e idosas.	74
Tabela 6. Efeito do exercício de alongamento crônico na estimativa de sarcômeros em série.....	74
Tabela 7. Efeito do exercício de alongamento crônico na estimativa de sarcômeros em série.....	75
Tabela 8. Comparação da área de Imunopositividade para Colágeno tipo I no músculo sóleo entre os grupos.	76
Tabela 9. Comparação da área de Imunopositividade para Colágeno tipo III no músculo sóleo entre os grupos.	78
Tabela 10. Comparação da Relação entre colágeno I e III no músculo sóleo entre os grupos.	79
Tabela 11. Comparação da área de Imunopositividade para TNF- α no músculo sóleo entre os grupos.....	80
Tabela 12. Comparação da área de imunopositividade para TGF β -1 no músculo sóleo entre os grupos.....	82
Tabela 13. Correlação entre a força aferida em ratas jovens alongadas e medidas histomorfométricas e imuno-histoquímicas.	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral das funções complexas e interações da matriz extracelular dos músculos esqueléticos. Adaptado de Murphy e Ohlendieck (2016).	30
Figura 2. Mecanismo de ativação e transdução de força dependentes da MEC e sarcômero. A: unidade funcional muscular (sarcômero), composto pelas proteínas actina, miosina, actina e titina. B: Envolvimento e integração do sistema sarcomeral em relação a MEC demonstrando o mecanismo de mecanotransdução envolvendo a talina em interação com a actina presente no sarcômero. Adaptado de Gessmann et al., (2010).	32
Figura 3. Diagrama esquemático da organização macroscópica do tecido muscular e da organização do tendão MEC no músculo. (A) A MEC muscular pode ser categorizada como epimísio (ao redor do músculo), perimísio (fascículos musculares circundantes) e endomísio (fibras musculares circundantes). Adaptado de GILLIES; LIEBER (2011). 34	
Figura 4. Resposta biológica de estiramento passivo em uma fibra muscular em etapas básicas. Após aplicação do alongamento, a MEC recebe o sinal por meio das integrinas, repassa o sinal para o citosol para que as sinalizações intracelulares iniciem o processo de transcrição até a miofibrillogênese. Adaptado de De Deyne et al., (2001).	38
Figura 5. Fatores que causam o desenvolvimento da sarcopenia. Adaptado de Morley e colaboradores (2014).	41
Figura 6. Sistemas de ubiquitina-proteassoma na homeostase muscular: As enzimas E1 ativam as proteínas ubiquitina após a clivagem do ATP. A ubiquitina é então movida de E1 para membros da classe de enzimas E2. A reação final de ubiquitilação é catalisada por membros da classe de enzimas E3. E3 liga-se a E2 e a proteína substrato, induzindo a transferência de ubiquitina de E2 para o substrato. Uma vez que o substrato ele é encaixado no proteassomal para degradação. Adaptado de Bonaldo e Sandri (2013).	43
Figura 7. Mudanças da MEC com o processo de envelhecimento. Adaptado de KRAGSTRUP et al., (2011).	46
Figura 8. Modelo de dissipação de carga no músculo esquelético e respostas adaptativas na matriz extracelular (MEC). Interação hipotética, modelo adaptado de KJAER e colaboradores (2004).	48
Figura 9. Diagrama de hipótese proposto para explicar interação da MEC na ativação de fatores fibrinogênicos e miogênicos durante a contração muscular. Adaptado de Stearns-Reider e colaboradores., (2017). Legenda: $\epsilon\gamma^1$: delta inicial do músculo jovem em repouso; $\epsilon\gamma^2$: delta de deformação em músculo jovem contraindo; ϵ^{01} : delta inicial do músculo idoso em repouso; ϵ^{02} : delta de deformação em músculo idoso contraindo. .	50
Figura 10. Esquema ilustrativo do processo de divisão dos animais do estudo.....	59
Figura 11. Demonstração da fórmula para conta da dosagem anestésica. Fonte: adaptado de CREAL, 2013.	60
Figura 12. Desenho esquemático do aparato de alongamento apresentando detalhes da posição da rata durante o alongamento do músculo sóleo esquerdo, adaptado de Zotz et al., (2014).	61
Figura 13. Descrição de como foi realizada a secção do músculo sóleo esquerdo coletado. A: região musculotendínea proximal; B: região musculotendínea distal. Adaptado de Martins (2015).	63

- Figura 14.** Corte histológico transversal do músculo sóleo em objetiva 10x. O contorno na cor amarela representa o método utilizado para mensuração da área de secção transversa de cada fibra muscular por meio do software Image J. Barra = 100µm. 64
- Figura 15.** Preparo da imunohistoquímica, primeira etapa, aplicação dos anticorpos primários. A: circundução da área de corte na lâmina utilizando caneta hidrofóbica Dako Pen; B: gotejamento de solução tampão PBS (tampão fosfato-salino) tris pH 7.3. C: processo de diluição dos anticorpos primários preparados com ImmPRESS™ kit (Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase Reagent, MP 7500, Vector Labs, USA). D: etapa de pipetagem dos anticorpos primários no corte em cada lâmina, somente na área circundada. E: lâminas em câmara úmida hermética, levada em geladeira (Consul) overnight..... 66
- Figura 16.** Fotomicrografias, objetiva 40x, de corte transversal do músculo sóleo e análise realizada por meio do Image Pro Plus®. A: setas demonstram imunomarcção, sinalizada pela cor castanha. B: setas indicam marcação em cor vermelha indicando imunopositividade verificada pelo software. Barra 20µm..... 67
- Figura 17.** Fotomicrografia (100x em imersão) de fibra isolada de músculo sóleo de rato, preparada para contagem do número de sarcômeros em série. Traçado preto representa 100 µm por meio do software Image J (versão 1.52a, EUA). 68
- Figura 18.** Fotomicrografia de corte transversal do músculo sóleo, corado com hematoxilina e eosina (HE), objetiva 20x. (A) Fotomicrografia antes de editar no Photoshop CS6 Portable (versão 13.0, BRA). (B) Fotomicrografia após marcação do epimísio e perimísio (pantone verde 802C e pantone laranja 715C, respectivamente) e coloração de fundo preto. (+) epimísio; (cabeça de seta) perimísio; (setas) endomísio. Barra de escala: 50µm..... 69
- Figura 19.** Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcção de colágeno tipo I em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcção de colágeno tipo I marcada em coloração castanha (C) GCI ♦ indicam de imunomarcção de colágeno tipo I em coloração castanha; (D) GAI * indicam imunomarcção de colágeno tipo I em coloração castanha. Barra de 50µm..... 77
- Figura 20.** Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcção de colágeno tipo III em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcção de colágeno tipo III marcada em coloração castanha (C) GCI ♦ indicam de imunomarcção de colágeno tipo III em coloração castanha; (D) GAI * indicam imunomarcção de colágeno tipo III em coloração castanha. Barra de 50µm.....776
- Figura 21.** Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcção de TNF-α em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcção de TNF-α marcada em coloração castanha (C) GCI ♦ indicam de imunomarcção de TNF-α em coloração castanha; (D) GAI * indicam imunomarcção de TNF-α em coloração

castanha. Barra de 50µm.....778 de

Figura 22. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcção de TGF-β1 em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcção de TGF-β1 marcada em coloração castanha (C) GCI ♦ indicam de imunomarcção de TGF-β1 em coloração castanha; (D) GAI * indicam imunomarcção de TGF-β1 em coloração castanha. Barra de 50µm..... 80

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADM	Amplitude de movimento
AGEs	Produtos finais da Glicação Avançada
Akt	proteína quinase B (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog)
ASTFM	Área de secção transversa da fibra muscular
Ca ²⁺	Íon cálcio
Cdn-2	Fator regulador nuclear cdn-2
DEG/ENAC	Fator regulador de canais iônicos
E1	Enzima ativadora ubiquitina proteassoma
E2	Enzima conjugadora ubiquitina proteassoma
E3	Enzima ligase ubiquitina proteassoma
Foxo	Forkhead box O
I κ B	Proteínas inibitórias do fator nuclear kappa
IPP	Regulador Ilk-Pinch Parvin
JMT	Junção miotendínea
LAP	Peptídeo de latência
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MEC-4	Caenorhabditis elegans degenerins Mechanosensory
Mg	Miligramas
ml	Mililitros
MMP-2	Metaloproteinases de matriz tipo 2
MMP-9	Metaloproteinases de matriz tipo 9
MMP-1	Metaloproteinases de matriz tipo 1
MMP-13	Metaloproteinases de matriz tipo 13
MRFS	Fatores regulatórios miogênicos
MURF1	Fator regulatório miogênico tipo 1
MSTN	Miostatinas
MTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
NF- κ B	Fator de ativação nuclear kappa B
NRIP	Proteína sarcomérica de regulação contrátil
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
Smad3	Small mothers againts decapentaplegic tipo 3
TGF- β	Fator beta do crescimento
TNF α	Fator alfa de necrose tumoral
UPR	Sistema de resposta protéica
UNC-8	Caenorhabditis elegans degenerins Uncoordinated
μ m	Micrometros
μ m ²	Micrometros quadrados
IPP	Regulador Ilk-Pinch Parvin

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	22
2.1 Objetivos Gerais.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. HIPOTESES.....	27
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	29
4.1 Composição e função da MEC em músculos jovens.....	29
4.2 Mecanotransdução em músculos jovens.....	37
4.3 Processo de envelhecimento musculoesquelético e <i>Inflamagin</i>	39
4.4 Envelhecimento da matriz extracelular (MEC).....	45
4.5 Mecanotransdução durante o envelhecimento.....	47
4.6 Prescrição do exercício crônico de alongamento para indivíduos jovens 50	
4.7 Estudos com protocolos de alongamento crônico em animais jovens e seus desfechos.....	52
4.8 Prescrição do exercício de alongamento para indivíduos idosos.....	56
4.9 Estudos com protocolos de alongamento em animais idosos e seus desfechos.....	57
5. METODOLOGIA.....	58
5.1 Divisão dos animais.....	59
5.2 Protocolo de alongamento do experimento.....	60
5.3 Métodos de coleta e avaliação.....	62
5.4 Avaliação da Área de Secção Transversa.....	63
5.5 Imunohistoquímica.....	64
5.6 Sarcômeros em Série.....	68
5.7 Análise do tecido intramuscular não contrátil: epimísio, perimísio e endomísio.....	69
5.8 Análise estatística dos resultados.....	70

6. RESULTADOS	72
6.1 Massa corporal, massa muscular absoluta e relativa e histomorfometria 72	
6.1.1 Massa Corporal.....	72
6.1.2 Massa Muscular	72
6.1.3 Área de secção transversa das fibras musculares (ASTFM)	73
6.2 Análise Longitudinal, comprimento muscular, comprimento dos sarcômeros em série e estimativa dos sarcômeros em série.....	74
6.3 Imunohistoquímica	76
6.4 Dados de epimísio, perimísio e endomísio	84
6.5 Dados de força aferida	87
6.5.1 Resultado dos dados de força aferida pelo aparato de alongamento .	87
7. DISCUSSÃO.....	89
8. CONCLUSÃO	94
PRODUÇÃO CIENTIFICA NO PERÍODO DO MESTRADO (2017-2019).....	94
REFERÊNCIAS	97
ANEXO 01.....	110
ANEXO 2.....	111

1. INTRODUÇÃO

Os exercícios de alongamento podem ser subdivididos de acordo com seus efeitos em agudos e crônicos. Definem-se por efeitos agudos aqueles avaliados imediatamente após a realização do alongamento (BATISTA et al., 2017) e por efeitos crônicos aqueles investigados após prática regular (dias, semanas ou meses) (MEDEIROS; LIMA, 2017; MEDEIROS; MARTINI, 2018). E, independente da faixa etária, isto é, criança, adulto ou idoso, os exercícios de alongamento são realizados com o objetivo principal de manutenção ou ganho de amplitude de movimento (ADM) (ACSM, 2011).

A redução de ADM em idosos desenvolve-se principalmente devido ao agravamento das disfunções musculoesqueléticas relacionadas ao processo de envelhecimento, tais como a diminuição da força muscular denominada dinapenia; da massa muscular designada sarcopenia e da flexibilidade (ANGULO et al., 2016; BROOK et al., 2016; SANTOS et al., 2016; SOARES et al., 2017). Porém, os efeitos dos exercícios de alongamento no músculo esquelético, especialmente as modificações histomorfológicas, podem ser diferentes para jovens e idosos (ZOTZ et al., 2014).

Atividades como o desempenho da marcha são afetadas pela redução de ADM decorrente do processo de envelhecimento, favorecendo ao risco de quedas. Em estudo desenvolvido por McKay e colaboradores (2017), foi reportado que o declínio da ADM de dorsiflexores de tornozelo apresenta forte associação com o processo de envelhecimento. Sendo que em mulheres a redução de ADM desse grupamento muscular chega a 15% (SOUCIE et al., 2010; MACKEY et al., 2017).

Já o Colégio Americano de Medicina e Esporte reportou que mulheres acima dos 70 anos de idade podem apresentar diminuição de ADM de tornozelo entre 30 a 40% (ACSM, 2009). Além disso, Zotz e colaboradores (2014) em revisão sistemática e meta-análise, concluíram que o exercício de alongamento apresenta efeito favorável na melhora da velocidade da marcha por favorecer

principalmente a ADM de dorsiflexores, embora a prescrição para idosos ainda não seja delineada devido à falta de padronização de protocolo de alongamento.

Até o momento, duas teorias principais foram descritas para explicar os efeitos fisiológicos do exercício de alongamento que contribuem para o aumento da ADM: teorias neurais e mecanicistas (NORDEZ et al., 2017; MAGNUSSON et al., 2010). A teoria mecanicista argumenta que os efeitos do exercício de alongamento modificam a histomorfometria do tecido muscular esquelético, para aumentar a ADM (NORDEZ et al., 2017). Nesse sentido, a ADM máxima pode ser limitada por estruturas não musculares, como o tecido conjuntivo do músculo esquelético, mas o mecanismo intracelular em resposta ao alongamento ainda precisa ser investigado.

No que diz respeito a parâmetros de prescrição do exercício de alongamento e seus efeitos na ADM, em indivíduos jovens, já foi demonstrado que o exercício de alongamento é efetivo na manutenção de ADM a partir de 3 semanas de exercício, quando realizado pelo menos 3 vezes por semana (AKAGI; TAKAHASHI, 2014).

Estudos com ratos machos jovens previamente imobilizados mostraram que o exercício de alongamento passivo estático, quando realizado em 10 repetições de 60 segundos de manutenção, 30 segundos de intervalo, 3 vezes por semana, durante 3 semanas aumentou a área de secção transversa da fibra muscular e o estimulou a deposição de sarcômeros em série (COUTINHO et al., 2006). Ywazaki et al (2015), utilizando um modelo de rato envelhecido, ou seja, ratas jovens ovariectomizadas e histerectomizadas, verificaram aumento da área de secção transversa da fibra muscular e sarcomerogênese após protocolo de 10 repetições de 45s cada, ou seja, volume de 450s por sessão, no músculo sóleo encurtado de ratas jovens realizado por seis semanas.

Em contraste, Zotz et al. (2016), com ratas envelhecidas (26 meses), detectaram redução da área seccional de fibras musculares (ASTFM) e não houve diferença no número de sarcômeros em série, após um protocolo de alongamento de uma semana após protocolo de exercícios de alongamento no

músculo sóleo de ratos idosos, aplicado em volume de 240s (4 repetições de 60s), 3 vezes por semana, durante 1 semana. No entanto, não foi encontrado nenhum estudo relatando os efeitos do exercício de alongamento comparando músculos esqueléticos jovens e idosos.

Em humanos, os efeitos do alongamento no músculo esquelético são geralmente avaliados por meio de ultrassonografia, a fim de avaliar o comprimento do fascículo, a espessura do músculo, a área de secção transversa muscular e o ângulo de penação (FREITAS et al., 2016; FREITAS; MILHOMENS, 2015). No entanto, esta metodologia não permite quantificar o tecido conjuntivo do músculo esquelético como epimísio, perimísio e endomísio, nem contar o número de sarcômeros em série envolvidos na melhora da ADM (MURPHY; OHLENDIECK, 2016). O exercício de alongamento pode estimular ciclos de síntese e degradação do epimísio, perimísio e endomísio para a remodelação do músculo esquelético (WESSNER et al., 2018). Além disso, os colágenos do tipo I e do tipo III, fatores de crescimento como o TGF β -1 e fatores pró-inflamatórios como o TNF- α , podem atuar na sinalização das vias celulares para adaptação do músculo esquelético jovem e envelhecido (MURPHY; OHLENDIECK, 2016).

Dessa forma, a prescrição de exercícios de alongamento torna-se um desafio, levando em consideração que há pouco consenso sobre qual a duração e frequência mais adequadas, quais tipos de exercício de alongamento seriam mais eficientes e as alterações musculares contráteis e não contráteis do microambiente celular, necessárias para manutenção e/ou ganho de ADM para cada faixa etária (ZOTZ et al., 2014).

Os modelos experimentais geralmente apresentam como amostra animais jovens, e muitas vezes machos (COUTINHO et al., 2004; COUTINHO et al., 2006). Vale enfatizar que embora o processo de envelhecimento acometa ambos os sexos, as repercussões musculoesqueléticas mais expressivas acometem as mulheres (ROBERTS et al., 2018). Portanto, estudos que avaliem os efeitos crônicos de protocolos de exercício de alongamento em ratas jovens e idosas, são necessários.

Além disso, estudos com animais permitem analisar as adaptações histomorfológicas musculares, como por exemplo a contagem do número de sarcômeros em série (DE JAEGUER et al., 2015; YWAZAKI et al 2015), a mensuração da área de secção transversa das fibras musculares (ZOTZ et al., 2016) e a análise do tecido conjuntivo (COUTINHO et al., 2006; SECCHI et al., 2008). Estas análises permitem investigar os mecanismos envolvidos na adaptação muscular esquelética decorrente da prática de exercícios de alongamento (GIANELO et al., 2016; CAÇÃO-BENEDINI et al., 2014; BENEDINI-ELIAS et al., 2013).

O processo de envelhecimento é acompanhado pelo aumento do fator de necrose tumoral α (TNF- α), que atua diretamente no processo de catabolismo e influencia a degradação muscular por desencadear ciclo inflamatório (ANGULO et al., 2016). Além disso, o TNF- α pode induzir degradação muscular em ratos idosos de forma mais expressiva do que em jovens, contribuindo para o aumento do fator beta do crescimento (TGF- β), favorecendo a deposição de tecido fibrótico na matriz extracelular (MEC) (PEAKE et al., 2010; BANO et al., 2017; LUSTOSA et al., 2017). Porém, os efeitos do exercício de alongamento no TGF- β importante modificador da MEC, não está bem estabelecido.

No envelhecimento ocorre maior deposição do colágeno tipo I quando comparado ao colágeno III, contribuindo para redução da extensibilidade muscular e redução de ADM (KIM et al., 2016). O TGF- β é secretado na MEC de forma inativa e pode ser ativado pelo estímulo do exercício de alongamento (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2015), aumentando a síntese de proteínas na MEC. Assim, seria interessante estudos que demonstrassem o comportamento dessa citocina e sua influência no processo de adaptação crônica ao exercício de alongamento, tanto em jovens quanto em idosos.

Durante o envelhecimento, o TNF- α pode regular positivamente o NF- κ B, aumentando a resposta inflamatória contribuindo para a apoptose celular e inibindo as vias MyoD e Mef2, reduzindo a massa muscular (BRZESZCZYŃSKA et al., 2018). Em contrapartida, o TNF- α pode regular positivamente o trofismo

muscular no microambiente das células jovens, mas ainda não se conhece os mecanismos envolvidos no crescimento longitudinal e radial, após o alongamento crônico (FARUP et al., 2015).

A resposta celular ao estímulo mecânico externo, como por exemplo, a realização de exercícios de alongamento, são diferentes em jovens e idosos, sendo que o processo crônico inflamatório, presente no envelhecimento favorece à redução de massa muscular e maior deposição de tecido fibrótico na MEC (PEAKE et al., 2010). Nesse sentido, os estudos de investigação dos efeitos crônicos de alongamento indicam que ainda não se sabe como a MEC e histomorfometria muscular esquelética se comportam por mais de 2 semanas de exercício de alongamento (MARSHALL et al., 2011; BLAZEVIICH et al., 2014; REID et al., 2011), comparando jovens e idosos.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos crônicos do exercício de alongamento mecânico passivo estático, sobre a histomorfometria e imunomarcagem do músculo sóleo tanto de ratas jovens quanto de ratas idosas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos crônicos do exercício de alongamento mecânico passivo estático na histomorfometria e imunomarcação do músculo sóleo de ratas jovens e idosas.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Aferir a massa corporal e muscular de ratas jovens e idosas;
- ❖ Aferir a força mecânica necessária para realizar o alongamento passivo do músculo sóleo de ratas jovens e idosas;
- ❖ Mensurar a área de secção transversa das fibras musculares do músculo sóleo de ratas jovens e idosas;
- ❖ Mensurar o comprimento muscular do músculo sóleo de ratas jovens e idosas;
- ❖ Quantificar o número de sarcômeros em série do músculo sóleo de ratas jovens e idosas;
- ❖ Estimar o comprimento dos sarcômeros do músculo sóleo de ratas jovens e idosas;
- ❖ Analisar a histomorfologia do músculo sóleo de ratas jovens e idosas.
- ❖ Quantificar a imunomarcação de colágeno tipo I e III, TGF- β 1 e TNF- α no músculo sóleo de ratas jovens e idosas.
- ❖ Comparar todos os desfechos acima entre ratas jovens e ratas idosas.

3. HIPOTESES

H0) O exercício de alongamento muscular crônico não interfere na morfologia, porcentagem de colágeno I e III e TGF β -1 e TNF- α e histomorfometria das fibras musculares de ratas jovens e idosas.

H1) O exercício de alongamento muscular crônico induz aumento do comprimento muscular e promove sarcomerogênese mais expressivo em ratas jovens do que em idosas.

H2) O exercício de alongamento muscular crônico induz sarcomerogênese de maneira mais pronunciada em músculos de ratas jovens do que em idosas.

H4) O exercício de alongamento muscular crônico induz hipertrofia no músculo de ratas jovens de maneira mais intensa do que no músculo de ratas idosas.

H5) O exercício de alongamento muscular crônico impede o processo de sarcopenia no músculo sóleo de ratas idosas.

H6) O exercício de alongamento muscular crônico reduz porcentagem de colágeno I, TGF- β e TNF- α nas fibras musculares de ratas jovens de maneira mais intensa do que em ratas idosas, por análise imunohistoquímica.

H7) O exercício de alongamento muscular induz o aumento da porcentagem de colágeno III nas fibras musculares de ratas jovens de maneira mais intensa e do que em idosas por análise imunohistoquímica.

H8) A força necessária para executar o exercício de alongamento em ratas idosas é maior do que em ratas jovens.

H9) A força necessária para executar o exercício de alongamento reduzirá progressivamente com o passar das semanas, tanto para ratas jovens quanto para idosas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Composição e função da MEC em músculos jovens

As células musculares são responsáveis pela contração muscular, estruturalmente são multinucleadas e apresentam seus núcleos posicionados na periferia, ou seja, em íntimo contato com a membrana plasmática, também denominada sarcolema (TAYLOR et al., 2013). Por meio do sarcolema as células musculares entram em contato com a matriz extracelular (MEC) tornando possível a interação entre essas duas estruturas (MACKEY et al., 2017; WESSNER et al., 2018).

Considerando que os movimentos internos dos componentes musculares estão interligados com o citoesqueleto, portanto a remodelação da MEC é um processo dinâmico que envolve a integração íntima com o complexo de fibras musculares (RAYAGIRI et al., 2018).

A MEC funciona, por um lado como um suporte de estabilização estrutural e, por outro lado, como uma interação celular na qual vias de sinalização são ativadas (MURPHY; OHLENDIECK, 2016). A ligação estabilizadora entre o exterior e o interior das células musculares é fornecida pela MEC no eixo sarcolema-citoesqueleto e é de extrema importância para a manutenção de contração e funções musculoesqueléticas (MURPHY; OHLENDIECK, 2016). Essas interações estão representadas na Figura 1.

A unidade contrátil do músculo esquelético é o sarcômero, que movimenta-se funcionalmente a partir de um mecanismo de deslizamento dos conjuntos proteicos de actina e miosina (LEMKE; SCHNORRER, 2017). Os sarcômeros são dispostos em série linear nas miofibrilas, uma contração coordenada de todos os sarcômeros ao longo de uma miofibrila permite a contração de um conjunto muscular e resulta em produção de força mecânica (LEMKE; SCHNORRER, 2017; GILLIES; LIEBER, 2011).

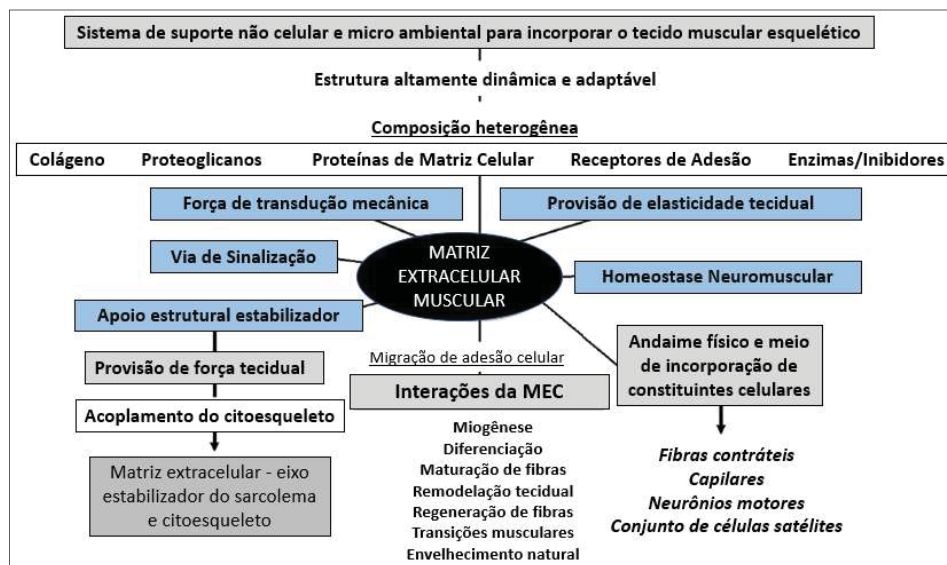


Figura 1. Visão geral das funções complexas e interações da matriz extracelular dos músculos esqueléticos. Adaptado de Murphy e Ohlendieck (2016).

Dessa maneira, o músculo desenvolve tensão passiva quando recebe carga externa e, dentro das fibras musculares, a tensão passiva parece se desenvolver principalmente devido a presença de titina, uma proteína que se estende do disco Z para a linha M dentro dos sarcômeros (GILLIES; LIEBER, 2011).

A remodelação muscular eficiente requer a interação entre os componentes da MEC e o músculo esquelético (WESSNER et al., 2018). A MEC tem característica não contrátil, é um sistema altamente dinâmico, responsável por ciclos frequentes de degradação e remodelação que ocorre graças a transmissão de força passiva entre a MEC e as fibras musculares (MURPHY; OHLENDIECK, 2016; WESSNER et al., 2018). Nesse sentido, a ligação entre a MEC e as miofibras musculares é possível devido a presença de proteínas transmembrana, denominadas integrinas (GILLIES; LIEBER, 2011).

As integrinas transmembrana são heterodímeros do tipo α - β , compostas de domínios extracelulares, que interagem com a MEC e citoplasma celular por meio de caudas que se ligam a proteínas adaptadoras intracelulares como a talina, que por sua vez se ligam ao citoesqueleto de actina (MOSER et al., 2009).

Recentemente demonstrou-se que a regulação de adesão e sinalização das integrinas depende de um regulador chamado Ikk-Pinch-Parvin (IPP), crucial

durante processos de adesão e sinalização de integrinas, responsável por regular a transmissão de forças mecânicas na MEC (LEMKE e SCHNORRER, 2017). Experimentos *in vivo* demonstram a ação de talina no auxílio durante o deslocamento do citoesqueleto em ações de actina sugerindo fortemente que a montagem citoesqueleto de actina produz e transmite forças mecânicas para cauda de integrinas por meio da talina (BROWN, 2000).

As caudas da integrina ligam-se ao domínio da cabeça da talina, enquanto a actina se liga ao longo do domínio da haste, puxando a talina para uma conformação estendida (BROWN, 2000; LEMKE; SCHNORRER, 2017). Juntas tanto integrinas quanto talina transmitem forças mecânicas durante a contração muscular. Como consequência, os níveis de integrina aumentam durante a maturação da remodelação musculotendínea e assim podem suportar cada vez mais forças de tração (LEMKE; SCHNORRER, 2017).

Durante a maturação e miofibrilogênese em músculos jovens, o tecido aumenta a tensão, resultando em menor endocitose de integrinas, portanto, os conjuntos de integrinas estão estabilizados nas pontas das miofibrilas, favorecendo a transmissão de estímulo mecânico (LEMKE e SCHNORRER, 2017), conforme demonstrado na Figura 2.

Os mecanismos pelos quais as integrinas conseguem realizar a transmissão de força mecânica também incluem a alteração de canais iônicos como os de DEG/ENaC específicos em mecanotransdução em mamíferos (GESSMANN et al., 2010). Portanto, essas proteínas são fortes candidatas a formar um conjunto iônico mecanossensível como por exemplo *Caenorhabditis elegans Degenerins* (MEC-4), membro da família DEG / ENaC e necessária para o comportamento mecanossensível de sensação de toque e propriocepção (GESSMANN et al., 2010).

Nesse sentido, experimentos que buscam elucidar como os estímulos mecânicos atuam na transcrição de tecido conjuntivo intramuscular e em tendões, demonstrou dois fatores principais envolvidos nesse processo. Foram identificados o GTF2IRD1 e ETS2 como reguladores principais de transcrição. A função principal de GTF2IRD1 foi a translocação no núcleo após um estiramento mecânico (KAYAMA et al., 2016).

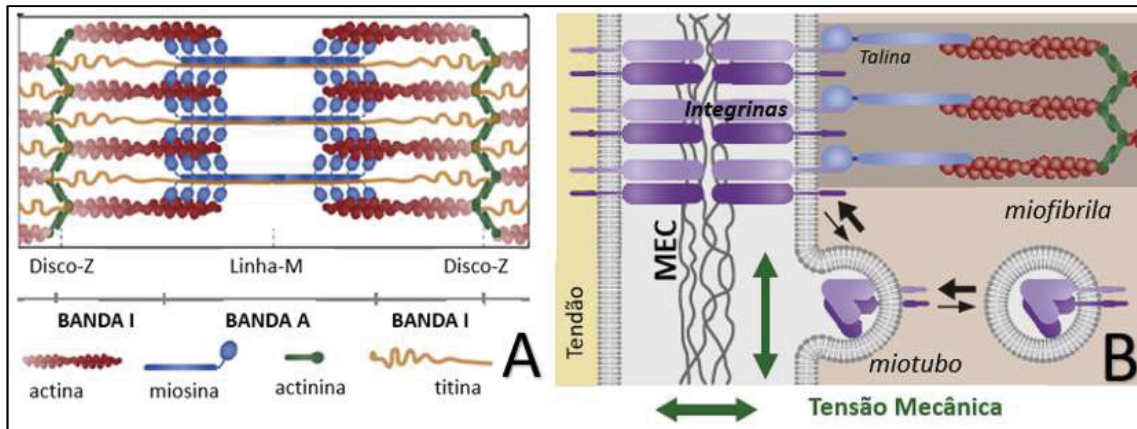


Figura 2. Mecanismo de ativação e transdução de força dependentes da MEC e sarcômero. A: unidade funcional muscular (sarcômero), composto pelas proteínas actina, miosina, actina e titina. B: Envolvimento e integração do sistema sarcomeral em relação a MEC demonstrando o mecanismo de mecanotransdução envolvendo a talina em interação com a actina presente no sarcômero. Adaptado de Gessmann et al., (2010).

O MEC-4 está relacionado a subunidade do canal iônico formando o canal iônico mecanossensorial central em contato com os neurônios receptores (GESSMANN et al., 2010). Além disso, a UNC-8, também membro da família DEG/ ENaC, provavelmente encontra-se em um canal sensível ao alongamento no processo do neurônio motor, o que resulta em modulação do movimento coordenado em resposta ao alongamento (GESSMANN et al., 2010).

Dessa maneira, entende-se a importância e íntima relação da MEC e da fibra muscular durante a execução e recepção de estímulos e transdução de força mecânica (LEMKE e SCHNORRER, 2017; KAYAMA et al., 2016). No entanto, a base mecanicista detalhada para tal interação continua a ser definida (MURPHY; OHLENDIECK, 2016).

Nesse contexto, as citocinas pro fibróticas e os componentes da MEC que interagem com elas têm sido alvos específicos para terapias antifibróticas no sentido de recuperar o músculo esquelético, isso baseado no seu potencial para

afetar diretamente a produção de colágenos específicos na MEC (LEMKE e SCHNORRER, 2017; GILLIES e LIEBER, 2011; MURPHY; OHLENDIECK, 2016). Assim, exercícios de alongamento poderiam ser uma opção de intervenção no sentido de remodelamento da MEC.

A composição da MEC se dá por meio de redes de proteoglicanos denominados colágenos (RICARD-BLUM, 2011). Já foram relatados 28 isoformas de colágenos, que diferem entre si de acordo com seu arranjo e função (RICARD-BLUM, 2011). Nesse contexto, são descritos os colágenos musculares encontrados na matriz intersticial (colágeno I, III, V, XI, XII, XIV, XV, XVIII), além daqueles localizados em contato com micro fibrilas de MEC (colágeno VI) e lâmina basal (colágeno IV, VI, XV, XVIII) (MURPHY; OHLENDIECK, 2016).

A distribuição dos colágenos na MEC segue uma ordem topográfica, ela é organizada em três níveis, conforme a região que envolve as miofibrilas musculares: o perimísio que envolve o músculo esquelético inteiro, o perimísio envolve feixes musculares constituídos por uma variável quantidade de células musculares e o endomísio que delinea a fibra muscular de maneira individual (GRANT et al., 1999; GILLIES; LIEBER, 2011). A distribuição de tecido conjuntivo conforme a topografia descrita está exemplificada na Figura 05.

O desenvolvimento de cada um desses três níveis, nos quais o tecido conjuntivo se distribui, inicia-se na camada do epimísio, parte para o perimísio e por último desenvolve-se na camada do endomísio (KUROSE et al., 2006). Além disso, os colágenos diferem não somente quanto ao tipo, mas também quanto à quantidade e distribuição de cada um deles em cada camada (KUROSE et al., 2006; GILLIES; LIEBER, 2011; MURPHY; OHLENDIECK, 2016).

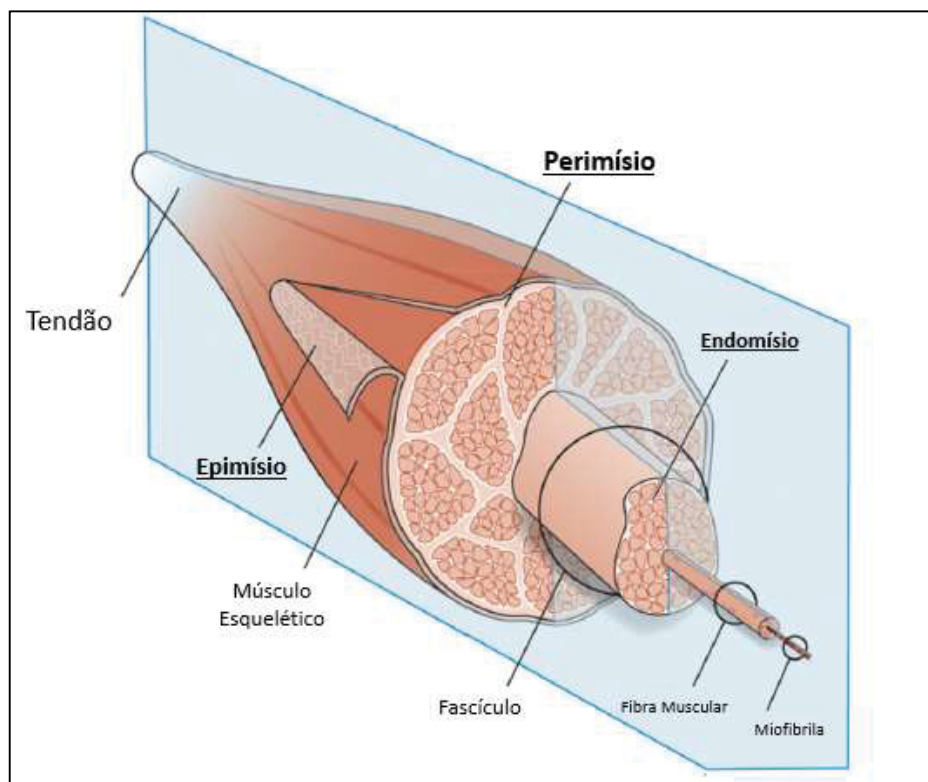


Figura 3. Diagrama esquemático da organização macroscópica do tecido muscular e da organização do tendão MEC no músculo. (A) A MEC muscular pode ser categorizada como epimísio (ao redor do músculo), perimísio (fascículos musculares circundantes) e endomísio (fibras musculares circundantes). Adaptado de GILLIES; LIEBER (2011).

Nesse sentido, o epimísio é composto por grande quantidade de colágeno tipo I e pouca quantidade de colágeno tipo III (KUROSE et al., 2006; MURPHY; OHLENDIECK, 2016). As fibras de colágeno são os principais contribuintes para a resistência mecânica dos tecidos moles, o arranjo e orientação das fibras de colágeno determinam a mecânica comportamento desses tecidos no epimísio, as fibras de colágeno são onduladas e quase paralelas umas às outras, o que caracteriza o epimísio como um tecido altamente complacente (GAO et al., 2008).

O perimísio foi descrito como uma estrutura na qual as superfícies profundas e superficiais unem-se formando feixes de colágeno muito grandes, com um padrão familiar de “*crimpagem*” que lembra o que é encontrado em tendão (GAO et al., 2008; MURPHY; OHLENDIECK, 2016). Qualitativamente, o perimísio e endomísio são compostos de quantidades equivalentes de colágeno tipo I e III, além de conterem outras variações de proteoglicanos (GILLIES; LIEBER, 2011; KUROSE et al., 2006). No entanto, a condição da organização

da rede estrutural do arranjo de colágeno verificada no perimísio é diferente da estrutura de malha do endomísio (GILLIES; LIEBER, 2011; KUROSE et al., 2006).

Ou seja, a topologia de superfície do perimísio sugere que, ao contrário do endomísio, no perimísio as fibras de colágeno são organizadas em conjuntos mais ou menos discretos que se estendem por meio das fibras musculares (GILLES; LIEBER, 2011; MURPHY; OHLENDIECK, 2016). Isso pode ser observado em micrografias nas quais as fibras formam uma série densa de bandas ao longo das fibras enquanto as fibras colágenas transversais se interconectam fibras musculares em pontos discretos denominados de placa perimisial (GILLES; LIEBER, 2011). Ainda, parece haver associação entre os chamados cabos perimisiais e a malha endomisial, local onde o perimísio termina e inicia-se o endomísio (GILLES; LIEBER, 2011; MURPHY; OHLENDIECK, 2016).

No endomísio, uma rede ordenada de proteoglicanos circunda fibras musculares individuais que se deformam de forma não linear ao longo do comprimento do sarcômero (GILLES; LIEBER, 2011). O resultado é uma rede de suporte cujas propriedades mecânicas refletem mais a geometria da rede do que as propriedades constitutivas das fibras de colágeno compostas, o que pode significar que a força é transmitida, provavelmente, devido ao cisalhamento por meio da camada do endomísio (GILLES; LIEBER, 2011; MURPHY; OHLENDIECK, 2016).

A deposição de tecido fibrótico ocorre principalmente pela presença de fatores de crescimento, entre eles o TGF- β , secretado na MEC em uma forma inativa ligado ao peptídeo de latência (LAP), e é ativado quando o LAP é degradado por proteases presentes na membrana celular (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2015). Após liberado pode ativar duas vias: uma canônica acionando Smad3 e outra via quinase, não canônica de TAK-1 – MAPK (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2015). Essas vias regulam ações intracelulares do TGF- β .

Portanto, a biossíntese de colágeno é caracterizada pela presença de fatores pós-translacionais de cadeias polipeptídicas, que contribuem para a qualidade e estabilidade da molécula de colágeno na MEC e dependem da força externa para sua modulação, como por exemplo, o exercício de alongamento (LI et al., 2018).

A regulação da deposição de colágeno na MEC é comandada pelas metaloproteinases de matriz uma classe importante de enzimas associadas também ao suporte e integridade do tecido durante as fases de deposição de colágeno e regeneração muscular (GILLES; LIEBER, 2011). Os níveis de metaloproteinases de matriz (MMPs) no músculo não lesionado são geralmente baixas, mas secretadas no sentido de manter a homeostase (GILLES; LIEBER, 2011; KHERIF et al., 1999).

Os inibidores de metaloproteinases de matriz, denominados TIMP, são fatores reguladores endógenos envolvidos na formação, adaptação e degradação controlada do MEC (GILLES; LIEBER, 2011). Em geral essas MMPs, podem ser expressas no músculo esquelético na isoformas de gelatinases MMP-2 e MMP-9, responsáveis por degradarem colágeno tipo IV, fibronectina, proteoglicanos e laminina, enquanto que as colagenases MMP-1 e MMP-13 degradam os tipos I e III colágeno (KHERIF et al., 1999).

O aumento da deposição de tecido conjuntivo deve-se ao fato de que a ativação de TGF- β induz a produção de colágeno tipo I, fibronectina ao mesmo tempo que suprime as metaloproteinases da MEC (GILLIES; LIEBER, 2011).

Além da ação das metaloproteinases, forças aplicadas externamente apresentam uma resposta intracelular no sentido de alinhamento progressivo das fibras, influenciando na reorientação das fibras de colágeno da MEC (GAO et al., 2008; COUTINHO et al., 2006). Nesse sentido, os exercícios de alongamento são uma alternativa de intervenção que visam como objetivo remodelar a MEC.

Esse mecanismo de interação celular decorrente do estímulo de alongamento é denominado mecanotransdução e será abordado na próxima

sessão. Vale ressaltar que durante o processo de envelhecimento ocorrem modificações estruturais na MEC e, portanto, a mecanotransdução em jovens e idosos não acontece da mesma maneira. Assim, nessa dissertação a composição da MEC em idosos e mecanotransdução em músculo envelhecido serão apresentadas em duas sessões distintas.

4.2 Mecanotransdução em músculos jovens

As células podem detectar e reagir às propriedades biofísicas do ambiente extracelular por meio de sítios de adesão localizados em suas integrinas e se adaptam ao meio extracelular devido ao processo denominado mecanotransdução (SUN et al., 2016). No entanto, o aumento radial e longitudinal muscular é o resultado de diversas interações celulares que resultam na ativação de genes específicos (RUSSEL et al., 2000).

Nesse sentido, ressalta-se que o tecido muscular esquelético tem duas características principais: (1) anisotropia, qualidade peculiar que substâncias cristalizadas demonstram ao reagir diferentemente ao serem expostas ao fenômeno físico; (2) viscoelasticidade não linear, ou seja, o tecido muscular é ao mesmo tempo viscoso e elástico de maneira heterogênea ao longo de suas miofibrilas (VAN LOOCKE et al., 2006; BILSTON; TAN, 2015).

Em biomecânica quando uma substância sofre ação de força passiva como por exemplo o estiramento, deformar-se-á de maneira tempo-dependente (DE DEYNE et al., 2001). A transmissão de forças pelas aderências da integrina estabelece reciprocidade mecânica entre a viscoelasticidade da MEC e a tensão celular (SUN et al., 2016). Esse comportamento é resultado das propriedades visco elásticas do material e denomina-se “*creep*” (DE DEYNE et al., 2001). A repercussão do estímulo de alongamento em vias intracelulares está representada na Figura 4.

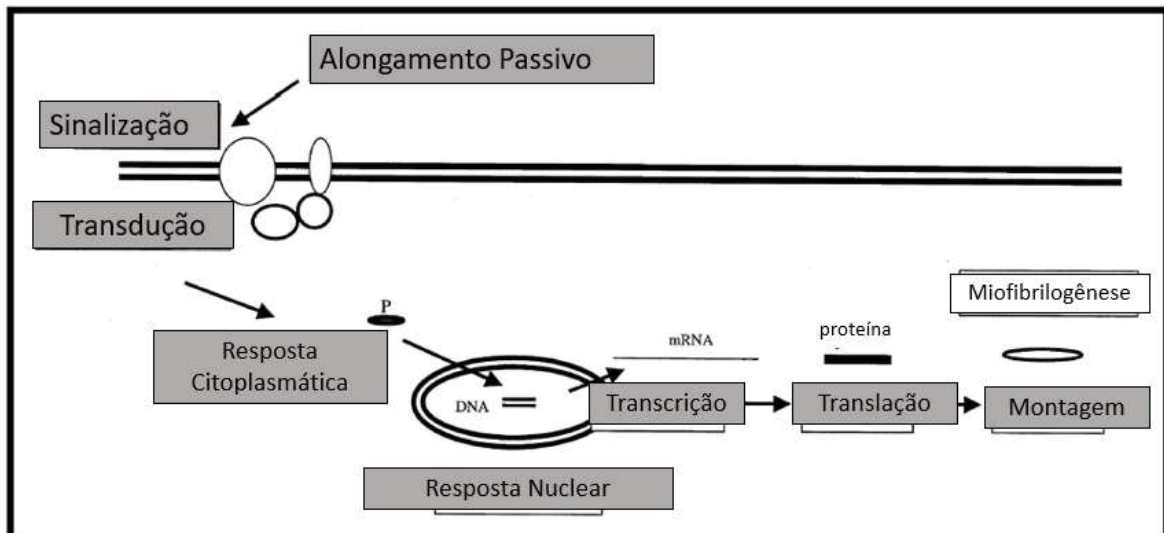


Figura 4. Resposta biológica de estiramento passivo em uma fibra muscular em etapas básicas. Após aplicação do alongamento, a MEC recebe o sinal por meio das integrinas, repassa o sinal para o citosol para que as sinalizações intracelulares iniciem o processo de transcrição até a miofibrilogênese. Adaptado de De Deyne et al., (2001).

O processo de mecanotransdução inicia-se a partir da transmissão de força entre as células e MEC, evento denominado primariamente de mecanotransmissão, processo que ocorre ao longo do trajeto mecanossensível, formado por integrinas de aderência (SUN et al., 2016).

A carga mecânica nos locais de adesão ativadas pela transmissão de força inicia um mecanismo de interação celular que pode alterar desde a conformação da proteína induzindo sinais bioquímicos (SUN et al., 2016).

Associado ao disco Z nas porções laterais do sarcômero está localizada a proteína denominada costâmero, essa proteína transmembrana é responsável por transmitir até 80% da força gerada pela fibra muscular durante a contração (DE DEYNE et al., 2001).

É importante ressaltar que não há correlação simples entre o tamanho da adesão e a magnitude da força transmitida (SCHILLER; FÄSSLER, 2013). Na verdade, a aplicação de alongamentos repetidos é a principal força ativadora das integrinas mecanossensíveis, mesmo com baixa amplitude de força, pois prolonga significativamente a vida útil da ligação das integrinas devido ao processo nomeado "*reforço mecânico cíclico*" (KONG et al., 2013; KONG et al., 2009).

Esses sinais bioquímicos acionam a porção ligante das integrinas recrutando numerosas proteínas às suas caudas citoplasmáticas curtas, resultando na montagem de estruturas de adesão que diferem em sua morfologia e localização sub-celular, bem como na sua composição proteica e propriedades mecânicas (SCHILLER; FÄSSLER, 2013).

As integrinas também podem ativar mecanicamente a sinalização do TGF β (WELLS; DISCHER, 2008). No entanto, após secretado TGF- β é imobilizado em proteínas localizados na MEC as integrinas ligam-se e liberam o TGF β armazenado na MEC, que então aciona as quinases receptoras de TGF β transmembranas heterotetraméricas formadas por receptores tipo II e receptores tipo I (BUSCEMI et al., 2011). No entanto, os receptores tipo I e II são espacialmente segregados dentro de FAs e somente convergem no FA menos tenso, sugerindo exigência mecânica complexa para sinalização ótima de TGF- β (RYS et al., 2015).

É válido ressaltar que as células adaptam sua sinalização também em resposta ao à rigidez da MEC, geometria celular e densidade celular com o objetivo de controlar a proliferação e diferenciação celular (SUN et al., 2016). Em resposta ao gradiente de rigidez da MEC desenvolve-se o processo chamado *durotaxis* (SCHILLER; FÄSSLER, 2013). Tal processo é evidenciado em duas situações distintas: durante a imobilização ou envelhecimento músculo esquelético. Portanto, na sessão que segue será discutido o processo de envelhecimento e a repercussão do mesmo no sistema musculo esquelético.

4.3 Processo de envelhecimento musculoesquelético e *Inflamagin*

O cenário mundial passa por processo de modificação das pirâmides etárias que ocorre devido à queda das taxas de natalidade associada ao aumento da expectativa de vida, tornando cada vez maior o número de indivíduos que superam os 60 anos de idade (WHO, 2017). No Brasil, a taxa de crescimento populacional caiu de 2,99 na década de 60 para 1,17 em 2010 levando os idosos a representar 10,8% do total da população. Essa modificação do perfil populacional, é a predominância na quantidade mulheres em relação à

de homens. O número de homens para cada 100 mulheres é de 96 no Brasil e se assemelha à taxa mundial que é de 101 (IBGE, 2010).

De acordo com os dados do último censo brasileiro, o estado do Paraná representa 8% da população idosa do total do país. Somente no município de Curitiba estão concentrados 16% do total de idosos do estado e, além disso, trata-se do local onde a quantidade de idosos homens é 32% menor do que a de mulheres da mesma faixa etária (IBGE, 2010). Nesse sentido, Silva et al. (2015), descrevem que durante o processo de envelhecimento as limitações funcionais ocorrem de forma mais evidente em mulheres do que em homens. Tonando-se, assim, necessária a investigação acerca das alterações estruturais e físico-funcionais que afetam essa população.

As mudanças fisiológicas e funcionais decorrentes do processo de envelhecimento são determinantes para o desenvolvimento de doenças crônicas e dependência funcional em idosos (WHO, 2017). Nesse sentido, o distúrbio denominado *inflammaging* é caracterizado por inflamação contínua devido a senescência, este é determinante para o processo de imunossenescência (OGAWA et al., 2016; CHHETRI et al. 2018). Tal processo é regulado pelo fator chave *Cdkn2* desempenhando papel primário no desenvolvimento da senescência celular pois aumenta as citocinas inflamatórias e reduz a taxa de diferenciação miogênica celular (BRZESZCZYŃSKA et al., 2018).

Por definição imunossenescência é o resultado do aumento de fatores inflamatórios circulantes que contribuem para o declínio físico funcional em idosos (OGAWA et al., 2016). Esse fenômeno de inflamação crônica induzida pela idade contribui para o desenvolvimento da miríade de condições geriátricas, como por exemplo, a sarcopenia (CHHETRI et al., 2018).

O declínio de força muscular relacionado à idade, sem que ocorra redução de massa muscular, recebe o nome de dinapenia (CHANG et al., 2018). Já, a redução da massa muscular, que pode ou não, estar relacionada a dinapenia e funcionalidade em idosos, é definida como sarcopenia (WALSTON, 2012; CRUZ-JENTOFT et al., 2018).

A patogênese da sarcopenia está associada a fatores intrínsecos incluindo fatores pró-inflamatórios, acúmulo de citocinas devido ao *inflammaging*, estresse oxidativo e resistência à insulina e está demonstrada na Figura 5. (MORLEY et al., 2014).

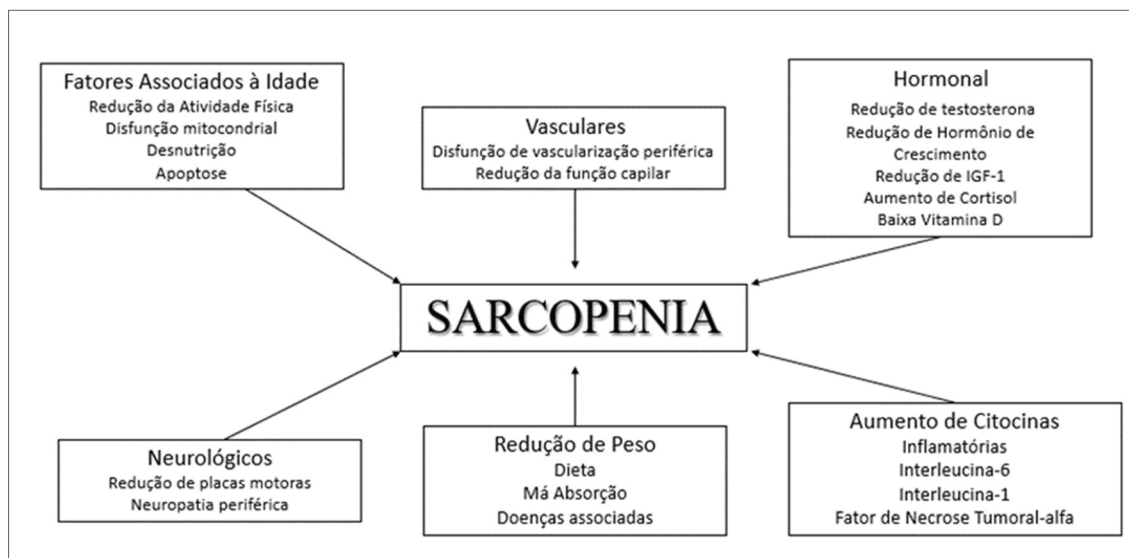


Figura 5. Fatores que causam o desenvolvimento da sarcopenia. Adaptado de Morley e colaboradores (2014).

Após a quinta década de vida há a redução progressiva de massa muscular que vai de 1 à 2% ao ano, enquanto a taxa de declínio de força é de 1,5% por ano (ZEMBRÓN-ŁACNY et al., 2014). E quando, associada a fatores extrínsecos como redução da atividade física e má nutrição podem ser agravados (MORLEY et al., 2014). A redução da qualidade estrutural das células musculares somado à redução de unidades motoras contribui para redução de força muscular (CHANG et al., 2018).

As células musculares são denominadas fibras e são classificadas em fibra do tipo I via oxidativa, contração lenta, tipo IIa de via oxidativa contração rápida e as do tipo IIb via glicolítica de contração rápida (BROOKE; KAISER, 1974). No quadro sarcopênico ocorre progressiva redução das fibras do tipo II de contração rápida contribuindo para a redução da efetividade da contração muscular (WALSTON, 2012; NILWIK et al., 2013). Apesar de o processo sarcopênico ser atribuído prioritariamente a deterioração das fibras de contração rápida, existem evidências sugerindo que músculos de fibra lenta, como por

exemplo o músculo sóleo, também apresentam progressivo declínio estrutural e funcional durante a senescência (CARTER et al., 2010).

Além disso, embora o processo de envelhecimento acometa ambos os sexos as repercussões histológicas são diferentes em homens e mulheres (ROBERTS et al., 2018). Tal fato ocorre pelo desenvolvimento da menopausa em mulheres, no qual o declínio de estrogênio sistêmico favorece o desenvolvimento da sarcopenia (SARVER et al., 2017). Além disso, em estudo de coorte recente Roberts e colaboradores (2018), demonstrou por análise histológica que em mulheres o processo de sarcopenia favorece a atrofia das fibras do tipo IIb sem alterar a quantidade de fibras, enquanto em homens ocorre além da redução da quantidade de fibras tipo IIb verifica-se hipertrofia das fibras tipo I, como ato compensatório de regulação muscular (ROBERTS et al., 2018).

As modificações metabólicas decorrentes do *inflammaging* agravam de maneira significativa o declínio da qualidade muscular, por envolverem mecanismos celulares que desregulam a homeostase entre a síntese e degradação proteica (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2015; BIAN et al., 2017). Durante esse estágio de inflamação crônica, verifica-se aumento sistêmico de citocinas inflamatórias, como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) envolvido no processo de atrofia muscular (KALINKOVICH; LIVSHITS, 2015).

Durante o *inflammaging*, verifica-se a elevação de TNF- α citocina responsável por acionar o fator nuclear kappa (NF κ B) contribuindo na ativação dos genes responsáveis por desencadear as vias de atrofia muscular como por exemplo a MURF1 e Atrogin-1 (SCHAAP et al., 2009; BIAN et al., 2017; HENDERSON et al., 2016; WELCH et al., 2018). Além disso, o TNF- α retira o NF κ B do citoplasma por meio de proteínas inibitórias I κ B, em seguida a fosforilação de I κ B desencadeia o processo de ubiquitinação e de degradação proteossomal responsável pela remoção de proteínas sarcoméricas (BONALDO; SANDRI, 2013). Por sua vez, a ubiquitinação é regulada por três enzimas: a enzima ativadora (E1), a conjugadora (E2) e a ligase (E3), a degradação de proteína envolve a marcação do substrato por múltiplas moléculas de ubiquitina e pela posterior degradação da proteína marcada (DRESCHER et al., 2016;

SAKUMA et al., 2017). No músculo sarcopênico as E3 são responsáveis por ativar os genes de atrofia muscular (HENDERSON et al., 2016; BONALDO; SANDRI, 2013). Esse processo está exemplificado na Figura 6.

A relação entre o NF- κ B e a ação inibitória miogênica foi demonstrada *in vitro*, no experimento de Bonewald et al. (2015) verificou-se que quando ligado ao fator regulador de massa muscular (METTL21C), o NF- κ B aciona proteínas como p53, Foxo e p38 resultando na ação da via MAPK quinase dando início à cascata de atrofia muscular verificada na sarcopenia (SHARMA et al., 2015).

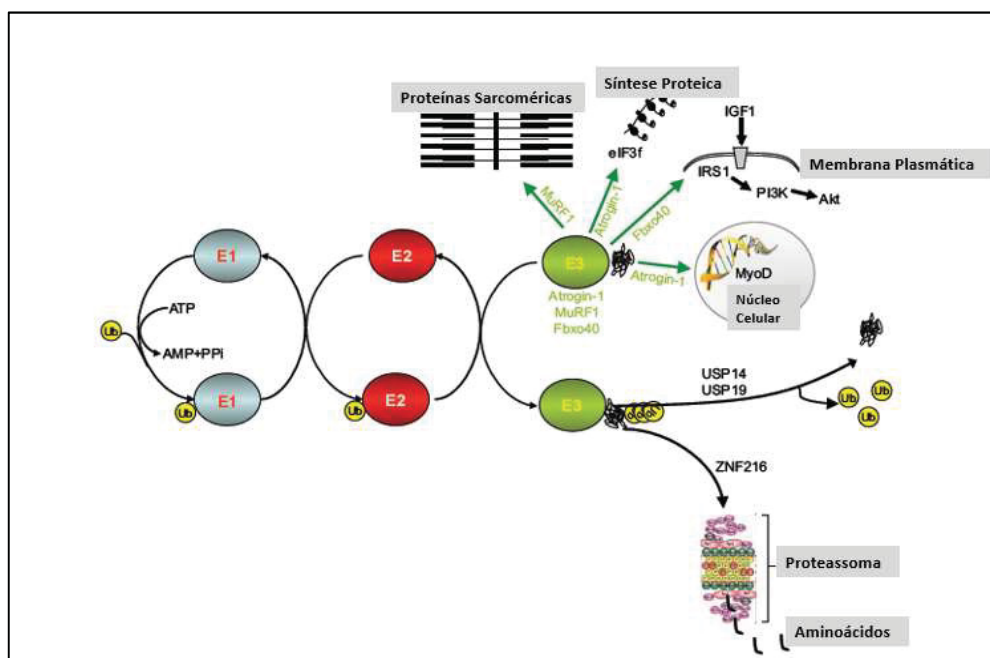


Figura 6. Sistemas de ubiquitina-proteassoma na homeostase muscular: As enzimas E1 ativam as proteínas ubiquitina após a clivagem do ATP. A ubiquitina é então movida de E1 para membros da classe de enzimas E2. A reação final de ubiquitilação é catalisada por membros da classe de enzimas E3. E3 liga-se a E2 e a proteína substrato, induzindo a transferência de ubiquitina de E2 para o substrato. Uma vez que o substrato ele é encaixado no proteassomal para degradação. Adaptado de Bonaldo e Sandri (2013).

Portanto, o aumento de TNF- α circulante, regula positivamente o NF- κ B, gerando ciclo de resposta inflamatória crescente, contribuindo para a apoptose celular além de inibirem vias de miogênese muscular como a MyoD e Mef2 por meio da via Atrogin-1 no núcleo celular, agravando o declínio de massa muscular (BRZESZCZYNSKA et al., 2018).

Portanto, a influência do aumento da citocina TNF- α devido ao processo de envelhecimento, favorece o desenvolvimento de sarcopenia (BIAN et al., 2017; SHARMA et al., 2015; MORLEY et al., 2014).

Outra função da citocina TNF- α é a indução da expressão de fatores de crescimento (TGFs) como a miostatina, favorecendo o ciclo inflamatório constante durante o processo de envelhecimento (SRIRAM et al., 2011). A superfamília do fator beta de crescimento (TGF- β) é composta por mais de 30 membros, desses destacam-se as subclasses de TGF- β s e as activinas/MSTN (FAN et al., 2017). A miostatina (MSTN) pertence ao grande grupo TGF- β que regula negativamente a síntese proteica, bloqueando a ação do ciclo G1 na fase de diferenciação celular de miócitos (SHARMA et al., 2015). Os fatores regulatórios miogênicos (MRFs) são os principais reguladores de células precursoras miogênicas e diferenciação terminal de mioblastos (JHENG et al., 2018).

Além disso, a miostatina apresenta papel importante na ativação da via do TNF- α , primeiramente acionando as vias E3 ligases (SRIRAM et al., 2011). Em seguida, ativando a cascata de degradação muscular a partir das vias de MURF1 e atrogin-1 (SRIRAM et al., 2011; DRESCHER et al., 2016). No entanto, a Myf5 e MyoD promovem a proliferação e diferenciação miogênica, nas primeiras fases de diferenciação celular (GIANAKOPOULOS et al., 2011). Assim, são os principais MRFs e funcionam ativando a via de proteína quinase (Akt), que por sua vez, pode desencadear processos de síntese proteica quando ativa mTOR ou vias de atrofia muscular quando ativa a FOXO1 (JHENG et al., 2018).

Nesse contexto, mTOR é membro da proteína fosfoinositida 3-quinase (PI3K) família de proteínas que constitui dois complexos distintos: mTOR 1 (mTORC1) e mTOR 2 (mTORC2) (ANTIKAINEN et al., 2017). mTOR1 é encontrado exclusivamente na membrana lisossomal atuando na síntese proteica e autofagia lisossomal, enquanto mTOR2 comanda os ciclos de apoptose e proliferação celular (ANTIKAINEN et al., 2017). Nesse sentido, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α modulam a sinalização de mTORC1 e, conseqüentemente, contribuem na proliferação, diferenciação ou apoptose lisossomal (LEE et al., 2007).

Dessa maneira, o aumento do TNF- α circulante decorrente do *inflammaging* contribui de duas maneiras para desregulação da massa muscular: (1) ativando vias como AKT responsáveis pela degradação proteica e (2) acionando a via mTOR, a mTORC1 responsável por apoptose e degradação celular lisossomal.

Além da degradação da massa muscular, durante o envelhecimento verifica-se a deterioração da matriz extracelular (MEC), essas modificações serão abordadas na próxima sessão.

4.4 Envelhecimento da matriz extracelular (MEC)

Além da desregulação da síntese e degradação proteica, o processo sarcopênico parece ter relação importante com as modificações estruturais verificadas na matriz extracelular (MEC) (LI et al., 2018).

Conforme verificado por Wood e colaboradores, demonstrando que o efeito molecular de remodelação verificado no processo de envelhecimento, repercute maior deposição de colágeno na MEC, tornando as ligações cruzadas de camundongos mais velhos mais densas do que as de animais jovens, devido à maior quantidade de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (WOOD et al., 2014).

Como descrito na sessão anterior, os componentes da MEC incluem dois tipos principais de colágeno, o do tipo I e do tipo III. Embora as anormalidades decorrentes da desregulação da qualidade de colágenos ainda não estejam claras, a degradação ineficiente em animais mais idosos, parece estar relacionada com a consequente maior deposição de colágeno na MEC e portanto, maior rigidez muscular (Kragstrup et al., 2011).

Durante o processo de envelhecimento, a eficiência do RER é suprimida devido à alta concentração de citocinas inflamatórias que desregulam a sinalização de UPR (GHOSH et al., 2016). Somado a redução de atividade do ER, o aumento de AGEs responsáveis pela regulação do TGF β em fibroblastos, favorecem a deposição de tecido conjuntivo em idosos pois acionam de forma mais expressiva a via de TGF β (JHENG et al., 2018). Essa modificações estão exemplificadas na Figura 7.

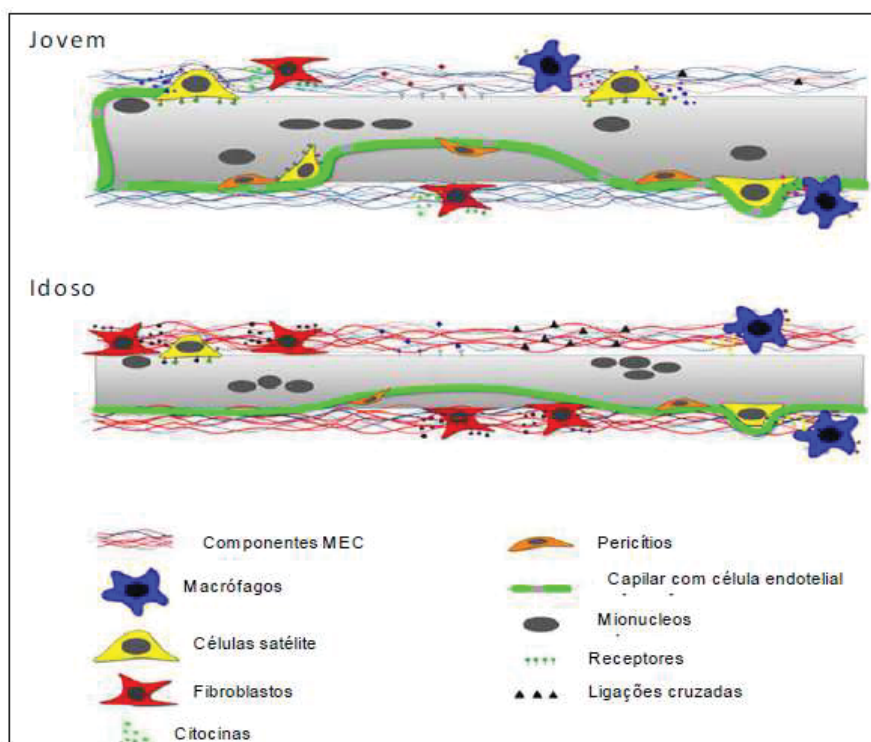


Figura 7. Mudanças da MEC com o processo de envelhecimento. Adaptado de KRAGSTRUP et al., (2011).

Dessa forma, a fibrose no músculo é caracterizada por aumento da deposição de colágenos no endomísio e perimísio principalmente (GILLIES; LIEBER, 2011). O mecanismo que envolve a deposição de tecido fibrótico na MEC depende da ativação de marcadores específicos do envelhecimento biológico.

Tais marcadores recebem a denominação de MARK-AGE, e são capazes de alterar eventos pós traducionais ao passo que reduz a eficiência do processo de glicosilação de Golgi na estruturação de proteínas presentes na MEC por exemplo (DESPRES et al., 2019). A via de sinalização responsável pela fibrogênese é a *Wnt* / β -catenina, na qual a conversão de SCs devido a regulação

positiva da expressão de TGF- β ativando Wnt3 e aumentando a deposição de colágeno intramuscular (MAHDY, 2018).

Em meios envelhecidos, o TGF- β é regulado positivamente, aumentando a expressão de Smad2 / 3 fosforilado, β - catenina e colágeno I (MAHDY, 2018; GILLIES; LIEBER, 2011). Além disso, os fibroblastos isolados do músculo envelhecido mostram que níveis maiores de TGF- β , colágeno IV e laminina, ao mesmo tempo que suprimem a ação das metaloproteinases (TIMP) -1 e 2, inibidores da degradação da MEC (STEARNS- REIDER et al., 2017). Portanto, a deposição de colágeno aumenta em músculo intacto com avanço da idade (KRAGSTRUP et al., 2011; MAHDY, 2018).

Assim, de maneiras distintas o TGF- β é considerado fator de crescimento de “*faca de dois gumes*”, pois o aumento agudo precoce de TGF- β é considerado fisiológico, enquanto aumento prolongado de TGF- β está associado a descontrolada formação de tecido fibrótico (KRAGSTRUP et al., 2011).

4.5 Mecanotransdução durante o envelhecimento

A regeneração de tecidos, processo intensivo, depende da capacidade de ativação das células satélite em entrar e sair do estado de inatividade proliferativa, conhecido como quiescência (SUN et al., 2016; LI et al., 2018).

Evidências sugerem que o estímulo mecânico externo é capaz de acionar mecanismos de interação celular que ativam as células satélite e contribuem no desenvolvimento da miogênese (STEARNS-REIDER et al., 2017). No entanto, as modificações estruturais decorrentes da sarcopenia influenciam na resposta tecidual, principalmente por contribuírem na alteração estrutural da matriz extracelular (MEC) (LI et al., 2018; WOOD et al., 2014).

A arquitetura dos fibroblastos e sua interconexão fornece suporte tridimensional que envolve as fibrilas de colágeno e estabelece a base de interação celular (KJAER, 2004). Essa interação está demonstrada na Figura 8. Conforme descrito por Wood e colaboradores (2014), as mudanças provocadas pelo processo de envelhecimento na MEC, reduzem a eficiência da transmissão de força e resposta mecânica muscular.

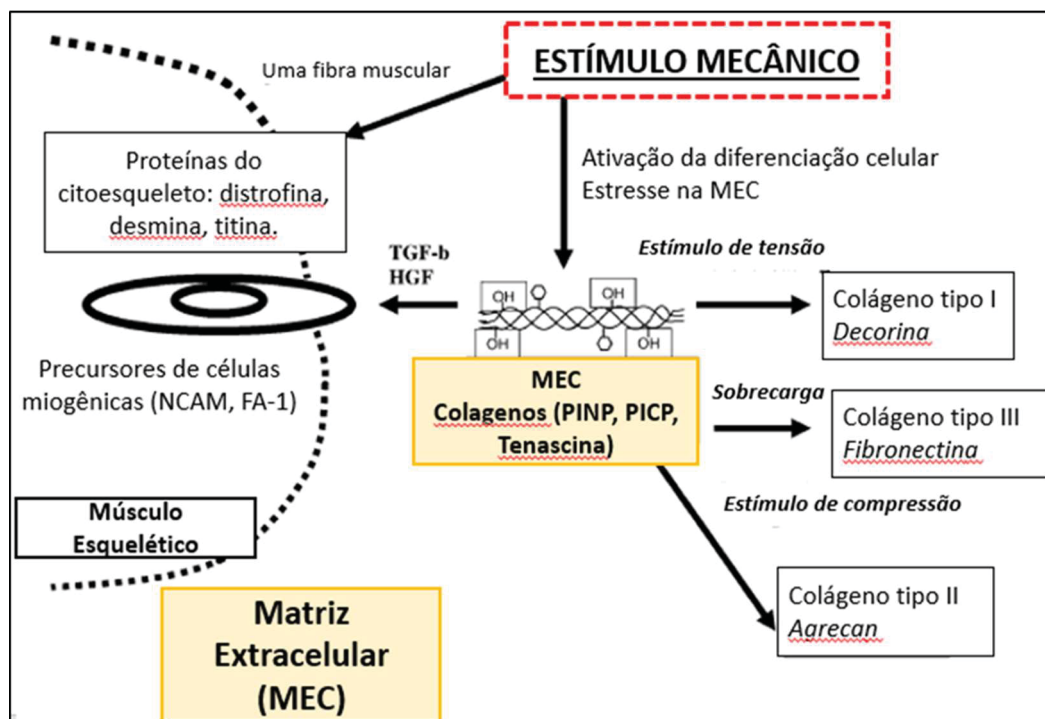


Figura 8. Modelo de dissipação de carga no músculo esquelético e respostas adaptativas na matriz extracelular (MEC). Interação hipotética, modelo adaptado de KJAER e colaboradores (2004).

Além disso, em músculo sóleo de camundongos de 24 meses verificou-se duplicação do tamanho da junção miotendínea (JMT), associada com o aumento da deposição de tecido fibrótico da MEC (NIELSEN et al., 2018). O que sugere que o declínio de função da JMT pode estar associado à má qualidade da MEC devido à redução da eficiência de transmissão do estímulo mecânico.

Em células musculares jovens, em ensaio *in vitro*, Lee e colaboradores (2000), verificaram que o aumento da deposição de colágeno se deve a interação produzida pelas junções miotendíneas (JMT) sob carga cíclica mecânica. Porém a regulação dos tipos de colágeno é realizada pela transdução de genes nucleares, portanto, as vias de sinalização para jovens e idosos podem

ativar diferentes cascatas de diferenciação celular (KJAER et al., 2004; LI et al., 2018).

A integridade estrutural do tecido muscular é determinada pela rede de citoesqueleto extrasarcômeral, isso inclui os discos Z e bandas M, portanto maior rigidez no disco Z é verificada durante o processo de envelhecimento celular (OGNEVA et al., 2010).

Nos discos Z, encontra-se a proteína denominada NRIP, responsável por ligar-se ao CaM em meio de Ca^{2+} ativando a ligação de CaN ao NFAT para realização de contração muscular lenta. A presença dessa proteína confere alta resistência à fadiga (CHEN et al., 2015). Tal proteína é reduzida durante o processo de envelhecimento, conforme verificado por Chen e colaboradores (2015), que ao avaliarem o músculo sóleo de camundongos de 10 meses verificaram que a redução de NRIP associou-se à menor desempenho funcional desses animais, bem como redução da atividade elétrica muscular e menor resistência à fadiga.

Dessa forma a redução da qualidade muscular, associada à modificação estrutural da MEC decorrentes do processo de envelhecimento, influenciam diretamente na geração de força e função musculares. O que compromete a contratilidade celular e desempenha papel importante na polarização da rede miofibrilar (GROSBURG et al., 2011).

Tal fato pode ter relação entre força vetorial e ativação dos receptores de integrinas conforme demonstrado por Groosberg e colaboradores (2011), em experimento *in vitro*, no qual verificaram que quanto maior a força de tração nas extremidades de fibroblastos jovens, maior a resposta tecidual de recrutamento miofibrilar, demonstrando a interferência da carga mecânica externa e da condição da MEC na deformação tecidual. Conforme demonstrado na Figura 9.

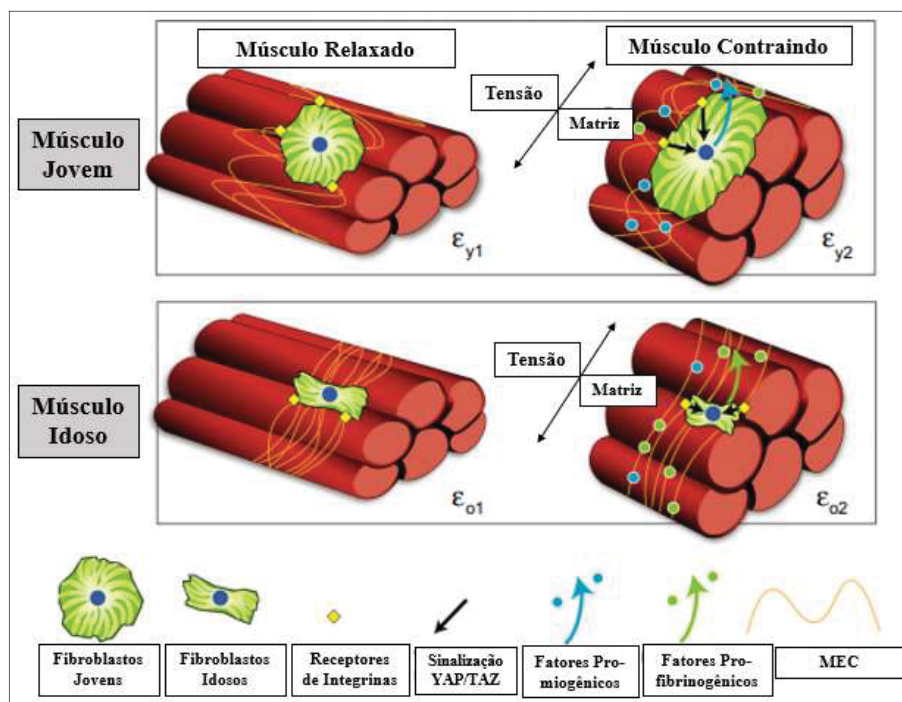


Figura 9. Diagrama de hipótese proposto para explicar interação da MEC na ativação de fatores fibrinogênicos e miogênicos durante a contração muscular. Adaptado de Stearns-Reider e colaboradores., (2017). Legenda: ϵ_{y1} : delta inicial do músculo jovem em repouso; ϵ_{y2} : delta de deformação em músculo jovem contraído; ϵ_{o1} : delta inicial do músculo idoso em repouso; ϵ_{o2} : delta de deformação em músculo idoso contraído.

Alternativamente, o bloqueio da formação de prostaglandinas inflamatórias inibiria a estimulação imediata de colágeno mediada por TGF- β 1 e levaria à recuperação sub-ótima, após exercício físico (KJAER et al., 2004). Dessa forma, investigar as repercussões do exercício de alongamento na estrutura muscular em jovens e idosos seria interessante.

4.6 Prescrição do exercício crônico de alongamento para indivíduos jovens

A organização mundial da saúde, classifica como pessoas jovens aquelas que se encontram entre os 10 e 24 anos e, ainda, sugere subdivisão dessa estratificação quando necessária. Dessa maneira, é possível classificar como jovens os indivíduos entre os 15 e 19 anos e como adultos jovens aqueles entre 20 e 24 anos. Portanto, considera-se que os estudos aqui elencados, apresentaram indivíduos jovens e adultos jovens em sua amostra, conforme classificação da OMS (1980).

A aplicação do exercício de alongamento passivo estático envolve alongar lentamente o grupo muscular, mantendo a posição durante o período denominado volume (ACSM, 2011). Durante a realização de alongamento passivo estativo realiza-se a aplicação de força externa de intensidade constante, nesse sentido, a intensidade do exercício de alongamento em humanos é realizada até o ponto em que o indivíduo relata dor ou desconforto leve (ACSM, 2011). Para adultos, a recomendação de volume de 10 a 30 segundos de alongamento, de 2 à 3 vezes por semana, parece ser efetiva para estimular a mecanotransdução em músculo jovem (ACSM, 2011).

Conforme descrito na introdução, os exercícios de alongamento estão subdivididos em efeitos agudos (imediatos) e crônicos (verificado após um período de dias ou semanas). Os efeitos agudos do exercício de alongamento envolvem adaptações funcionais musculo esqueléticas (HIRATA et al., 2017), porém as modificações estruturais são verificadas somente após semanas (e dependem da intensidade do estímulo de alongamento (GROSBERG et al., 2011; CORNACHIONE et al., 2013). Portanto, compreender os mecanismos que influenciam na resposta ao exercício de alongamento crônico é essencial para prática clínica baseada em evidências.

Em estudo realizado com homens e mulheres jovens com idade média de 20 ± 3 anos de idade, sedentários aplicou protocolo de exercício de alongamento de 5 repetições com 30 segundos de manutenção e 30s de intervalo, durante 8 semanas para o grupo muscular isquiotibiais, demonstrou que a melhora da amplitude de movimento (ADM) ocorre a partir da 3ª semana de treinamento (CHAN et al., 2001).

Em protocolo de exercício de alongamento executado durante 5 semanas em homens jovens, verificou-se o aumento de ADM (AKAGI et al., 2014). Com o objetivo de tentar elucidar os mecanismos celulares envolvidos na melhora da ADM, os autores realizaram avaliação do músculo gastrocnemio utilizando o ultrassom para mensurar a onda de cisalhamento decorrente do exercício de alongamento (AKAGI et al., 2014). Entretanto, não encontraram diferenças nas medidas pré e pós exercício de alongamento, nesse desfecho. Os autores

justificam que tal fato se deve, provavelmente, por não terem avaliado o músculo sóleo, devido à sua profundidade anatômica. E, também ao fato de essa medida ser variável e influenciada pelos componentes passivos musculares da matriz extracelular (MEC), que não podem ser avaliados por meio do ultrassom (AKAGI et al., 2014).

Embora os estudos com indivíduos jovens tenham demonstrado aumento do ângulo articular após, pelo menos, 3 semanas de exercício de alongamento mecânico passivo estático (CHEN et al., 2001; AKAGI et al., 2014), eles não demonstram como os componentes visco elásticos contribuem para o ganho de ADM apesar de atribuírem à eles os efeitos verificados em seus experimentos.

Além disso, alguns estudos não estratificam os grupos entre homens e mulheres (CHAN et al., 2001; JEON et al.), o que pode prejudicar a interpretação dos dados, pelo fato de as mulheres apresentarem fisiologicamente maior flexibilidade do que os homens, especialmente em membros inferiores (CARVALHO et al., 1998; LOPES et al., 2018).

Portanto, estudos que demonstrem as adaptações dos componentes visco elásticos musculares são necessários, com a finalidade de elucidar quais adaptações estruturais contribuem para o ganho de ADM.

4.7 Estudos com protocolos de alongamento crônico em animais jovens e seus desfechos

A aplicação de alongamento estático em músculos de ratos jovens, demonstrou-se efetiva na adição de sarcômeros em série (COUTINHO et al., 2004; SECCHI et al., 2008), aumento de área de secção transversa muscular (SECCHI et al., 2008) e do comprimento muscular (MENON et al., 2007). O mecanismo de aumento de sarcômeros em série e área de secção transversa ao longo da fibra muscular após exercícios de alongamento, é mediado pela liberação de fatores de crescimento dentre eles, pode-se citar o fator beta de crescimento (TGF- β) (MENON et al., 2007).

Nesse contexto, 4 semanas de protocolo de alongamento em coelhos jovens demonstrou modificações estruturais no músculo sóleo, com aumento dos sarcômeros em série e da área de secção transversa muscular, embora não tenha representado alterações significativas no torque passivo e ADM desses animais, sugerindo que as modificações estruturais musculoesqueléticas precedem as adaptações funcionais (DE JAEGER et al., 2015).

Experimentos com animais jovens tem demonstrado que 15min de exercício de alongamento estático realizado 2x por semana, por 2 semanas foi efetivo para reverter a atrofia muscular causada por denervação do músculo sóleo de ratos jovens, ativando a via Akt/ MtOR/ p70s6k e suprimindo a ação da degeneração muscular (AGATA et al., 2009).

Além disso, Aro e colaboradores (2008), demonstraram que o exercício de alongamento com 180 segundos de volume, realizado 3 vezes por semana ao longo de 3 semanas, pode induzir maior organização de fibras colágenas em músculo sóleo de ratos jovens previamente imobilizados.

O volume de alongamento de 3 repetições com 30 segundos de manutenção e 30 segundos de intervalo, realizado por 10 dias consecutivos, com o objetivo de reverter os efeitos deletérios da imobilização em ratos jovens, não foi capaz de promover benefícios estruturais como adição de sarcômeros em série, por exemplo (AIRTFON et al., 2012).

Em protocolo de alongamento dinâmico aplicado em ratos jovens comparou os efeitos de alongamento rápido e alongamento lento, demonstrando que a força gerada por plantiflexores e dorsiflexores é maior após protocolos com contrações isométricas rápidas (WILLEMS; STAUBER, 2000).

Já em animais machos jovens e previamente imobilizados, submetidos a posterior alongamentos diários por 3 dias consecutivos composto por 10 repetições de 30 segundos de manutenção e 30 segundos de intervalo não repercutiu em modificações estruturais nos colágenos I e III quando comparados os grupos intervenção e controle (GIANELO et al., 2016).

Ainda, em ratos jovens submetidos à denervação, o protocolo de alongamento realizado por 7 e 15 dias composto por 10 repetições de 60 segundos de manutenção, com 30 segundos de intervalo, foi suficiente para aumentar a expressão gênica de TGF- β 1, embora não tenha evitado a atrofia no músculo sóleo (GIGO-BENATO et al., 2016).

O remodelamento da MEC também foi verificado por Benedini Elias e colaboradores (2013), que após 21 dias de alongamentos diários mantidos por 40 minutos, demonstraram que o alongamento passivo é capaz de promover remodelamento positivo da MEC músculos previamente imobilizados.

Protocolos de 21 dias de alongamento mantido após período de 10 dias de imobilização do membro posterior de ratas, é indicado para a reabilitação musculo esquelética pois demonstra melhora das características morfológicas, tamanho e distribuição das fibras musculares (CORNACHIONE et al., 2014). Nesse experimento os autores realizaram o mesmo protocolo de alongamento mantido por 10 dias e por 21 dias com o objetivo de comparar o tempo resposta do tecido muscular. Contudo, 10 dias de alongamento mantido foram insuficientes para restabelecer a distribuição de fibras do tipo I reduzidas anteriormente por desuso muscular em ratas imobilizadas. Além disso, verificaram que as modificações celulares da MEC ocorrem de maneira mais intensa após os 21 dias quando comparados a 10 dias de alongamento em ratas jovens (CORNACHIONE et al., 2014).

Em animais previamente imobilizados, a transmissão do estímulo de alongamento parece estar prejudicada pela má organização dos componentes celulares, assim como verificado por Cação Benedini e colaboradores (2014), que demonstraram que o processo de remodelamento da MEC a partir do estímulo de alongamento depende da qualidade da transmissão de carga externa aplicada.

Estudos que avaliaram as vias de atrofia muscular, assim como Peviani e colaboradores (2007), encontraram aumento nos níveis de RNAm MyoD, miostatina e atrogina-1 em músculos sóleo de ratos jovens após única sessão

de 10 repetições de alongamento passivo manual, mantendo cada repetição 1 min.

Tabela 1. Desfechos do efeito crônico do alongamento em animais jovens.

Autores / Ano	Protocolo de Alongamento	Amostra	Desfechos
Agata et al., 2009	1 repetição de 15min 2x por semana 2 semanas	Ratos Jovens	Amenizou atrofia
Aro et al., 2009	10 repetições de 30s, 30s de intervalo 3x por semana 3 semanas	Ratos Jovens	Organizou fibras colágenas
Gigo Benato et al., 2016	3 repetições de 30s, 30s de intervalo 10 dias consecutivos	Ratos Jovens	Não modificou a histomorfometria
Gianelo et al., 2016	10 repetições de 30s, 30s de intervalo 3x por semana 3 dias consecutivos	Ratos Jovens	Organização das fibras colágenas
Benedini-Elias et al., 2013	1 repetição de 40min 10 e 21 dias consecutivos	Ratas Jovens	Organização das fibras colágenas Hipertrofia
Cação-Benedini et al.,	10 repetições de 30s, com 30 s de intervalo por 10 dias	Ratas Jovens	Organização das fibras de colágeno
2 protocolos:			
Cornachione et al.,	10 dias e 21 dias começou com 10min diários de alongamento, sendo adicionados 5min por dia, até completar 40min de alongamento por dia.	Ratas Jovens	Modificação da quantidade de fibras e qualidade da MEC
Coutinho et al., 2004	1 repetição de 40min a cada 3 dias	Ratas Jovens	Aumento do comprimento muscular, sarcômeros em série e atenuou a atrofia
Peviani et al., 2007	10 repetições de 60s	Ratos Jovens	Aumento de MyoD, miostatina e atrogina-1

Dessa forma, a maior parte de estudos com animais utiliza amostras previamente imobilizadas (AGATA et al., 2009; ARO et al., 2009; GIANELO et al., 2016; COUTINHO et al., 2004) o que dificulta a interpretação da efetiva resposta do tecido muscular ao exercício de alongamento. Portanto, investigar os efeitos do exercício de alongamento em animais sem previa imobilização é importante para compreender os mecanismos adaptativos celulares.

4.8 Prescrição do exercício de alongamento para indivíduos idosos

As diretrizes mundiais da OMS recomendam a prática de exercícios de flexibilidade, pois apesar de baixa evidência científica sobre seus benefícios os mesmos auxiliam na manutenção funcional e melhora da mobilidade (WHO, 2017).

A prática regular de exercícios de flexibilidade pode contribuir na manutenção de ADM, além de contribuir na redução do risco de quedas em idosos (ASCM, 2011). O volume de alongamento para idosos é de 30 a 60 segundos de estímulo de estiramento parece ser efetiva na manutenção d estímulo mecânico (ACSM, 2009). A intensidade do exercício de alongamento em humanos é realizada até o ponto em que o indivíduo relata dor ou desconforto leve (ACSM, 2011).

Além disso, a redução da resistência passiva e aumento da amplitude de movimento do tornozelo, foram verificas após protocolo de alongamento de em estudo desenvolvido com homens jovens e idosos (PALMER, 2017). Nesse sentido, os estudos têm preconizado a comparação dos efeitos do mesmo protocolo de alongamento em indivíduos de diferentes faixas etárias. Como por exemplo, Haab e colaboradores (2017), que investigaram os efeitos de 10 semanas de alongamento passivo em isquiotibiais de jovens e idosos, no qual o protocolo era composto por 3 seções semanais, 1 série de 3 repetições com duração de 60 segundos cada perna, direita e esquerda. Embora 10 semanas de alongamento tenham contribuindo para aumento de ADM em jovens e idosos, não modificaram a rigidez passiva. Os resultados desse estudo demonstraram que a idade crescente tem efeito negativo nas propriedades passivas musculares, e que os indivíduos mais velhos se beneficiam do treino de alongamento regular tanto quanto, os jovens (HAAB et al., 2017).

Os efeitos de protocolos de 2 repetições 60 segundos e 120 segundos de alongamento passivo estático, com 30 segundos de intervalo em flexores e extensores de joelho de mulheres jovens e idosas, não tenha repercutido em nenhuma alteração da força muscular passiva (LUSTOSA et al., 2017). Além

disso, em estudo desenvolvido com homens jovens e idosos demonstrou-se que a amplitude de movimento passiva, das articulações do membro inferior, é menor em idosos do que em jovens (ARK et al., 2004).

Em geral, os estudos com humanos utilizam a ADM como desfecho primário após protocolo de exercício de alongamento (BATISTA et al., 2008; RYAN et al., 2014; GAJDOSIK, 2002). Embora realizem a avaliação da contração isométrica por meio do dinamômetro isocinético, somente a avaliação dessas variáveis não é suficiente para demonstrar as alterações teciduais estruturais decorrentes do exercício de alongamento.

Dentre os fatores que contribuem para a modificação da ADM articular após o exercício de alongamento, pode-se citar as propriedades visco-elásticas do tecido muscular que influenciam na resposta tecidual frente a deformação imposta pelo exercício de alongamento (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1983; WILLIAMS et al., 1988; LI et al., 2018).

Portanto, estudos com animais são realizados com o objetivo de avaliar de maneira mais profunda os efeitos morfológicos do exercício de alongamento no tecido muscular esquelético.

4.9 Estudos com protocolos de alongamento em animais idosos e seus desfechos

Durante o processo de envelhecimento observa-se a redução fisiológica do comprimento dos sarcômeros (TRAEGUER; GOLDSTEIN, 1983), o aumento da deposição de colágeno do tecido muscular (WOOD et al., 2014), fator que contribui para redução da tensão passiva muscular (GAJDOSIK et al., 1999), e redução de força muscular (WOOD et al., 2014).

Diferentes achados estruturais dos componentes da MEC, após exercício de alongamento estão descritos na literatura e variam conforme a idade da amostra e protocolo utilizado (COUTINHO et al., 2002; GOMES et al., 2006; FOSCHINI et al., 2004; ZOTZ et al., 2016).

De acordo com Zotz e colaboradores (2016), o efeito agudo do exercício de alongamento no músculo sóleo de ratas idosas, realizado 3 vezes por semana durante 1 semana, com protocolo de 1 repetição, 60 segundos de manutenção e 30 segundos de intervalo apresentou efeito antifibrótico na MEC. Nesse estudo verificou-se atrofia muscular no grupo de ratas idosas submetidas ao exercício de alongamento, sugerindo que o exercício ativou as vias de sinalização pertencentes à atrofia muscular (ZOTZ et al., 2016).

Kodama e Colaboradores (2012) verificaram o efeito do exercício de alongamento em ratos machos, e consideraram que a idade da 15 meses representariam ratos idosos. Nesse experimento, os animais foram previamente imobilizados, para em seguida realizarem exercício, até que finalmente o músculo gastrocnêmio foi submetido à ensaio de tração mecânica (KODAMA et al., 2012). Concluindo que o protocolo de exercício físico apresenta tendência a restabelecer a qualidade no tecido muscular, tanto nos animais adultos como nos idosos. Porém, não realizou análise do tecido muscular quanto à sarcômeros em série ou paralelo, nem análise dos componentes da MEC ou mesmo de transcrição de fatores genéticos envolvidos nessa adaptação ao exercício.

Dessa forma, poucos estudos descrevem quais as adaptações musculoesqueléticas em resposta ao exercício de alongamento são verificadas em animais realmente envelhecidos.

Portanto, para que seja possível estabelecer qual a dose tempo/resposta do exercício de alongamento em animais idosos, o objetivo do presente estudo será avaliar as adaptações crônicas induzidas por protocolo de exercício de alongamento.

5. METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC-PR, sob número de protocolo 992/15 (anexo 01) e seguiu em conformidade a Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e Resolução nº1, de 09 de julho de 2010, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação

Animal (CONCEA). Realizou-se estudo do tipo analítico experimental, controlado e de caráter longitudinal.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas de medidas 32cm de largura x 17cm de altura x 37 cm de comprimento, da cor branca em condições adequadas à espécie e temperatura ambiente controlada com mínimo de 20° e máximo de 25° e ciclagem além de luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro, com livre acesso à água e ração peletizada, no biotério da PUC-PR, sendo as trocas maravalha realizadas pelos técnicos do biotério que seguiam sob direção do zootecnista Rafael Zotz.

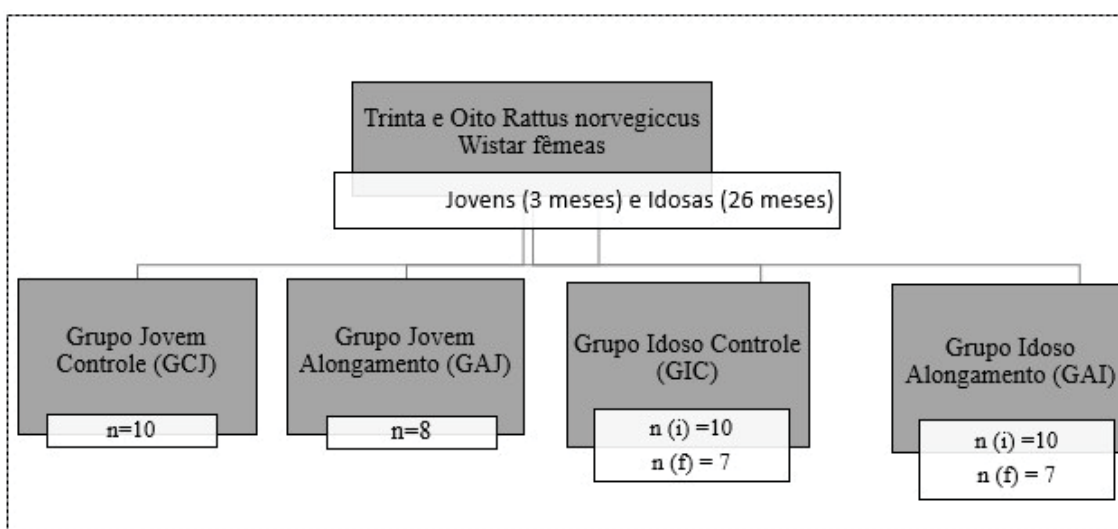


Figura 10. Esquema ilustrativo do processo de divisão dos animais do estudo.

5.1 Divisão dos animais

A amostra compunha 38 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar albino, sendo, 18 fêmeas jovens (com 3 meses de idade) e 20 idosas (com 26 meses de idade) conforme descrito por Andreollo et al. (2012). As ratas foram divididas em 04 grupos, conforme a Figura 10, apresentada abaixo:

Os animais foram distribuídos em 11 caixas (numeradas de 1 a 11), cada caixa continha de 3 a 4 animais. Para a definição dos grupos, foi realizado o método de aleatorização simples, por meio de sorteio (THOMAS; NELSON, 2005). Durante o experimento houve perdas amostrais de 3 animais no GCI e de

3 animais no GAI. As perdas amostrais ocorreram por parada cardiorrespiratória durante a administração do protocolo anestésico.

5.2 Protocolo de alongamento do experimento

Essa etapa do experimento foi realizada no laboratório de Cultivo Celular na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), nas segundas, quartas e sextas-feiras, pelo período de 3 semanas. O protocolo anestésico foi administrado pela aluna de Iniciação Científica do curso de graduação em Medicina Veterinária, Daniele Moro Santana, sob a orientação do professor Dr. Luiz Guilherme Achcar Capriglione.

O protocolo de alongamento foi constituído das seguintes etapas: 1) pesagem da massa corporal do animal em balança (Mettler/Toledo com capacidade de 25g a 3 Kg); 2) aplicação da anestesia por via intraperitoneal (anestésicos ketamina e xilasina); 3) realização do alongamento em aparato desenvolvido por Zotz et al. (2014) e 4) repouso e observação do animal para retorno do protocolo de anestesia (em placa aquecida e com suporte de oxigênio à 1mL/s).

Protocolo Xilazina	Protocolo Ketamina
<u>Peso do animal em kg x 5 (constante)</u>	<u>peso do animal em kg x 20 (constante)</u>
20	100

Figura 11. Demonstração da fórmula para conta da dosagem anestésica. Fonte: adaptado de CREAL, 2013.

A anestesia administrada por via intraperitoneal constituiu-se pelo anestésico Quetamina (marca Vetnil®) na dose 60mg/kg de peso corporal e relaxante muscular Xilazina (marca Rompun®) 10 mg/kg de peso corporal. O cálculo anestésico foi elaborado a partir da massa corporal de cada animal levando em consideração a concentração de cada medicamento, assim, os dois medicamentos foram misturados em seringa para com capacidade para 1ml e posteriormente aplicados no quadrante abdominal inferior esquerdo do animal. Abaixo a descrição da fórmula para cálculo anestésico.

O aparato de alongamento era constituído por célula de carga, capaz de aferir a força necessária para induzir o alongamento do músculo sóleo, e possui pedido de registro de patente BR1020150205740. Assim, a força aplicada para induzir o alongamento do músculo sóleo, foi monitorada durante cada repetição de exercício de alongamento passivo mecânico estático (ZOTZ et al., 2016). As imagens do aparato de alongamento e o procedimento para indução do alongamento estão demonstrados na Figura 12. O alongamento foi realizado no músculo sóleo esquerdo, 3 vezes por semana (GALLON et al., 2011; ACSM, 2011), durante três semanas, sempre no mesmo horário do dia, isto é, no período da tarde, pela mesma pessoa posicionando o animal no aparato de alongamento. E, constitui-se em 1 série de 4 repetições (CRISTOPOLISKI et al., 2009; GALLON et al., 2011) com duração de 60 segundos cada repetição (FELAND et al., 2001; GALLON et al., 2011; CRISTOPOLISKI et al., 2009), com intervalo de 30 segundos entre elas (KERRIGAN et al., 2003), monitorado por cronômetro (*Technos*).

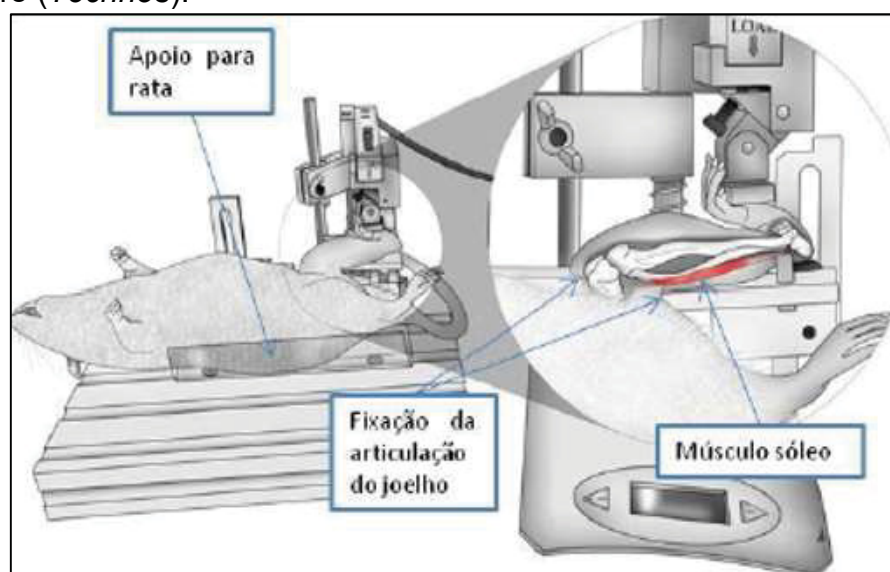


Figura 12. Desenho esquemático do aparato de alongamento apresentando detalhes da posição da rata durante o alongamento do músculo sóleo esquerdo, adaptado de Zotz et al., (2014).

Os animais do grupo controle passaram por todo o procedimento de manipulação e posicionamento no aparato de alongamento, pelo mesmo período, isto é, 330 segundos, porém sem aplicação do alongamento.

5.3 Métodos de coleta e avaliação

Após três semanas de alongamento, isto é, no 20º dia do experimento e 24 horas após a última sessão de alongamento, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de 80mg/kg de quetamina 10ml (marca Vetnil®, concentração de 10g) e 8mg/kg de xilazina 10ml (marca Rompun®, concentração de 2g) para coleta do músculo sóleo esquerdo. Em seguida, e ainda sob efeito anestésico, foi aplicada injeção intracardíaca de 240mg/kg de quetamina e 24 mg/kg de xilazina para ortotanásia.

Após dissecação, o músculo foi pesado em balança analítica de precisão (Mettler/Toledo) com capacidade mínima de 10 mg e máxima de 210 g, e posteriormente os músculos foram gotejados periodicamente com solução salina (NaCl 0,9%) para evitar ressecamento tecidual. Foi observada a massa absoluta (expressa em gramas) e sua relação com a massa corporal do respectivo animal (massa relativa, expressa em porcentagem).

Na sequência, os músculos foram divididos longitudinalmente, com lâmina (Feather) em duas partes iguais. A porção medial do músculo foi cortada transversalmente em duas partes iguais, em que a porção proximal foi destinada para a técnica de imunohistoquímica e mensuração da área de secção transversa, enquanto a porção distal foi destinada à contagem dos sarcômeros em série.

Toda a porção lateral restante foi utilizada para avaliação da expressão gênica, e armazenada em freezer a -80º C, para posterior análise que será contemplada na tese de doutorado de Hilana Rickli Fiuza Martins.

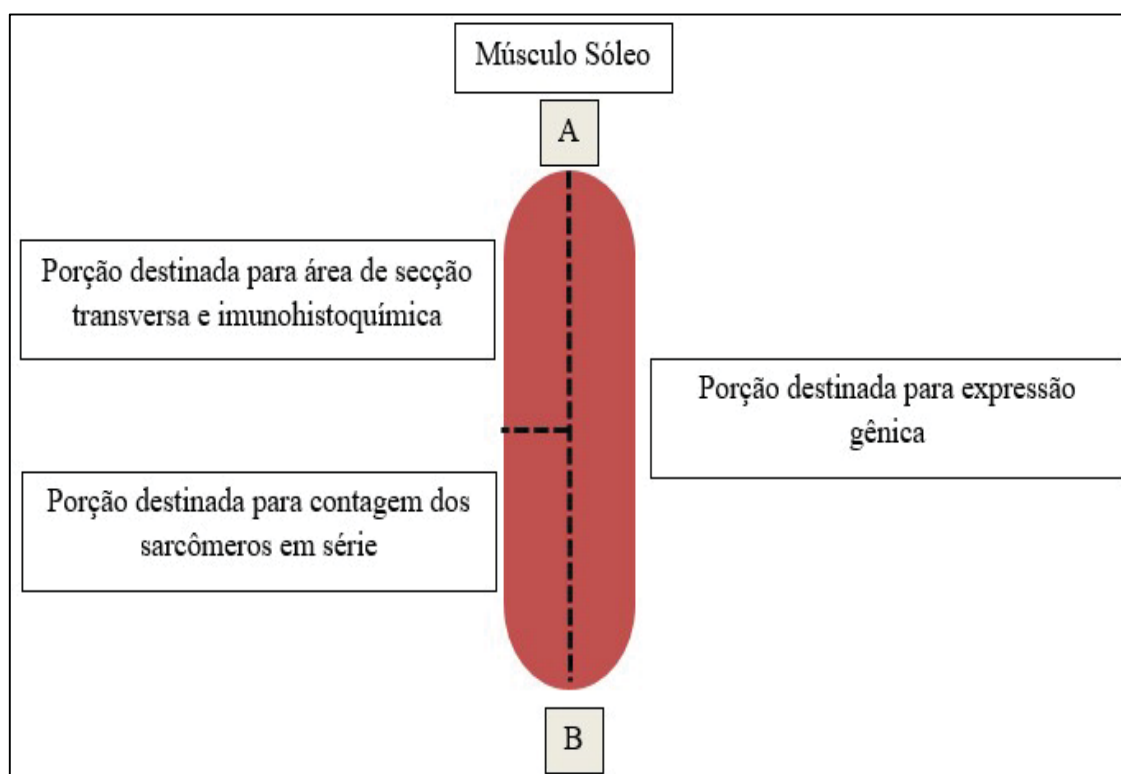


Figura 13. Descrição de como foi realizada a secção do músculo sóleo esquerdo coletado. A: região musculotendínea proximal; B: região musculotendínea distal. Adaptado de Martins (2015).

5.4 Avaliação da Área de Secção Transversa

As lâminas de área de secção transversa muscular foram produzidas no Laboratório de Patologia da PUCPR pelos técnicos Seigo Nagashima e Ana Paula.

Para fotomicrografia dos cortes histológicos foi utilizado o fotomicroscópio de Luz (Olympus BX50) capturadas em sistema de vídeo-imagem (câmera Sony CCD IRIS) por meio do Software Image Pro Plus 4.5. Foram avaliados os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. Para análise da área de secção das fibras musculares (ASTFM) foi escolhido um campo contendo um corte histológico de cada músculo.

A escolha do corte foi baseada na ausência de artefatos, isto é, maior quantidade de fibras musculares, menor quantidade de depósitos de reagentes, presença de fibras dobradas, rasgadas ou mal focalizadas. Em seguida, o corte selecionado foi focalizado em objetiva de 10x em microscópio de luz (Olympus BX50) e fotografado em câmera digital (Camera Sony CCD IRIS). Posteriormente, a imagem foi transferida para computador, na qual 100 fibras foram selecionadas de modo aleatório, sem o conhecimento do grupo experimental, para tornar a análise com caráter cego, na região central da secção histológica como descrito por Coutinho et al. (2004) e Gomes et al. (2004). As ASTFM foram mensuradas com o auxílio do programa Image J (versão 1.52^a, USA), como representado na figura 14.



Figura 14. Corte histológico transversal do músculo sóleo em objetiva 10x. O contorno na cor amarela representa o método utilizado para mensuração da área de secção transversa de cada fibra muscular por meio do software Image J. Barra = 100 μ m.

5.5 Imunohistoquímica

As lâminas de imunohistoquímica foram preparadas no laboratório de Patologia Experimental, da PUC-PR pela técnica Marina Azevedo sob direção da prof.^a Dr^a Lúcia Noronha. E, a mascaragem para realização das análises por meio do software Image Proplus foram desenvolvidas pela prof.^a Dr^a Talita Gianello Gnoato Zotz.

A porção lateral proximal do músculo sóleo esquerdo coletado de cada rato foi fixado em formalina 10% durante 48 horas. Posteriormente, a porção foi desidratada e diafanizada seguindo o protocolo: álcool 70%, 80%, 90%, 95% por 30 min; álcool 100% (I e II) por 30 min e xilol (I e II) por 15 min.

Após o emblocamento final em parafina, a amostra foi então seccionada transversalmente em micrótomo (Olympus), em cortes de 4µm, posteriormente transferidos para lâminas próprias para imunohistoquímica (Starfrost Advanced 76 X 26 mm) que passaram pelo processo de secagem *overnight* à 60°C em estufa (Orion-modelo 502).

O primeiro passo para iniciar a etapa de imunohistoquímica é denominado desparafinização, o qual é composto por 3 etapas: xilol puro (2 vezes por 10 minutos), álcool etílico absoluto (3 vezes por 01 minuto), álcool etílico 80% (1 vez, por 03 minutos).

Em seguida realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, composta por 2 etapas: solução de peróxido de hidrogênio e água ultrapura (1 vez, por 15 minutos), água destilada e em seguida, recuperação antigênica com as lâminas imersas em ImunoRetriver (Dako®) e em seguida mantidos em cuba de banho-maria (Ancap), à 98°C, por 20 minutos.

Após serem retiradas da etapa de banho maria, as lâminas foram deixadas esfriar à temperatura ambiente, lavadas com água destilada e em seguida a área na qual a mostra estava posicionada foi circundada com caneta hidrofóbica *Dako pen* (Dako®) em cada lâmina (A, figura 15). As lâminas permaneceram em tampão PBS (tampão fosfato-salino) tris pH 7.3, até que as alíquotas de anticorpo fossem gotejadas, evitando a secagem do corte (B, figura 15). Os anticorpos primários específicos (C, figura 15) para reações imunohistoquímicas foram Rabbit Polyclonal Anti-Human Transforming Growth Factor *beta1* (1:100), Spring Science, Pleasanton, California, EUA (POKRYWCZYNSKA et al., 2013), Rabbit Polyclonal Collagen Type I, AB34710 (1:200), Abcam, Cambridge, MA, USA (YU et al., 2018), Rabbit Polyclonal Collagen Type III, AB7778 (1:200), Abcam, Cambridge, MA, USA (SEGOVIA-SILVESTRE et al., 2011) and Mouse Monoclonal Antibody TNFα, sc-52252 (1:100), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany (BLANKENSTEIN, 1995). Todos os anticorpos usados nesse experimento têm reatividade com ratos.

Para detectar a imunoreatividade, o *ImmPRESS*[™] kit (Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase Reagent, MP 7500, Vector Labs, USA) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. As alíquotas (100 µl) das soluções dos anticorpos Colágeno I (Rabbit Polyclonal Collagen Type I, AB34710, Abcam, Cambridge, MA, USA), Colágeno III (Rabbit Polyclonal Collagen Type III, AB7778, Abcam, Cambridge, MA, USA), TGF-β1 (Mouse Monoclonal TGFβ-1, 2C5: sc-52891, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany), TNFα (Human Monoclonal TNF alpha (MA-091-5, ImunyBiothechnology, Campinas, SP, BR) foram gotejadas sobre os cortes e levadas para câmara úmida (Easy path) e à geladeira (Consul) *overnight* (E, figura 15).

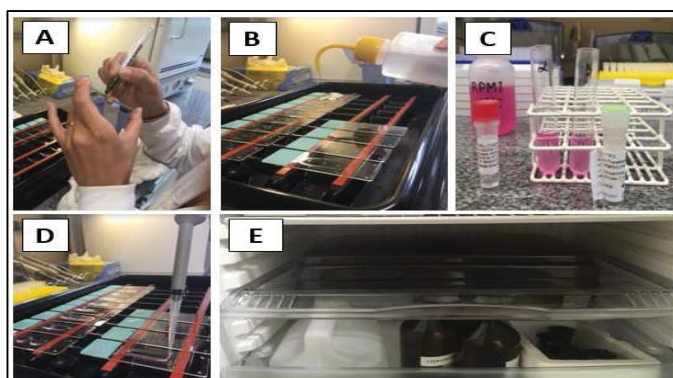


Figura 15. Preparo da imunohistoquímica, primeira etapa, aplicação dos anticorpos primários. A: circunscção da área de corte na lâmina utilizando caneta hidrofóbica Dako Pen; B: gotejamento de solução tampão PBS (tampão fosfato-salino) tris pH 7.3. C: processo de diluição dos anticorpos primários preparados com *ImmPRESS*[™] kit (Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase Reagent, MP 7500, Vector Labs, USA). D: etapa de pipetagem dos anticorpos primários no corte em cada lâmina, somente na área circundada. E: lâminas em câmara úmida hermética, levada em geladeira (Consul) *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em tampão TBS tris pH 7.3 e deixadas no tampão por 15 min. Novamente foram lavadas em tampão, secadas e então foi administrado revelador HRP Conjugate (Spring) e deixado por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão e secas para posteriormente ser gotejado cromógeno DAB (1:1) e acompanhado até a visualização da cor castanha, na sequência lavadas rapidamente em água destilada. Após, foram contra coradas com Hematoxilina de Gill por 5 min, lavadas em água da torneira e deixadas por 5 minutos, desidratadas com álcool etílico absoluto (3x 1 min.), diafanizadas com xilol (3 x 5 min) e então realizada montagem da lâmina com Entellan® (Merck, Germany). A coloração foi desenvolvida por meio do Kit *ImmPACT*[™] DAB (Vector Labs, US).

Após finalizada a secagem, as lâminas dos anticorpos TNF α , TGF β , colágeno I, colágeno III, foram analisadas por meio do método quantitativo morfométrico (KONDO et al., 2011). Por meio do software Axion Vision SE64 e utilizando o Scanner Axio ScanZ1. E as imagens analisadas utilizando o software Image Pro Plus®, fotografadas em objetiva de 40x para posteriormente serem analisadas. Os critérios utilizados para realização da fotografia foram fotos preenchidas, sem dobra, sem rasgo, sem artefato de coloração, homogeneidade em relação à coloração e sem sobreposição de foto. Após aplicação desses critérios, foram fotografadas 10 imagens por animal utilizando a técnica de varredura.

Para quantificar as quantidades de anticorpos TNF α , TGF β , colágeno I, colágeno III marcados nas lâminas, foi fornecido ao programa amostra da coloração castanha considerada positiva para permitir a quantificação pelo método de colorimetria (REICHERT-FARIA et al., 2013). Esta fotomicrografia passou a ser a “máscara”, de acordo com Calvi e colaboradores (2012).

Dessa forma, após selecionar a estrutura específica, o programa identificou os pixels da estrutura e, a partir disso, o software selecionou pixels adjacentes com cores similares e identificou a área da imunomarcação (CALVI et al., 2012). 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.

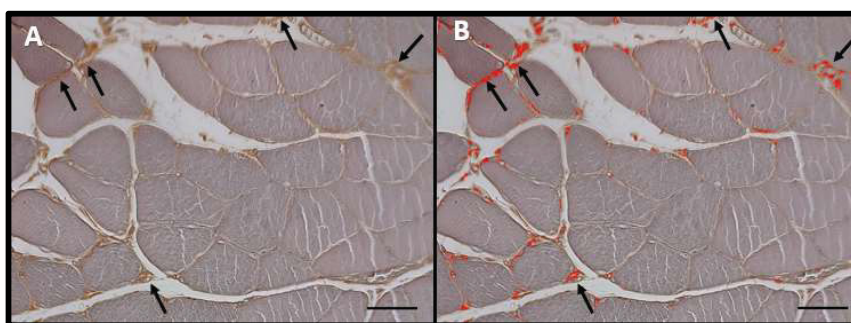


Figura 16. Fotomicrografias, objetiva 40x, de corte transversal do músculo sóleo e análise realizada por meio do Image Pro Plus®. A: setas demonstram imunomarcação, sinalizada pela cor castanha. B: setas indicam marcação em cor vermelha indicando imunopositividade verificada pelo software. Barra 20 μ m.

5.6 Sarcômeros em Série

Essa etapa da pesquisa foi desenvolvida no laboratório de bioquímica na PUCPR e foi realizada pela mestrandia Kátia Janine Veiga Massenz.

A porção medial do músculo sóleo animal foi cortada transversalmente em duas partes iguais, dessa divisão a porção distal destinou-se para a contagem do sarcômeros em série. O fragmento muscular foi mantido fixado com agulhas de acupuntura em placa de isopor a partir de suas extremidades de forma linear e longitudinal.

Feito isso, a porção coletada foi mantida em solução de glutaraldeído 2,5% pelo tempo de três horas, em seguida, foi armazenado em solução de ácido nítrico 30% pelo tempo de 48 horas e por fim, imerso em solução de glicerol 50% (GOLDSPINK, 1968).

Realizou-se o processo de isolamento de 10 fibras musculares, por animal, por meio da lupa (Olympus), na qual o músculo foi posicionado utilizando placa de petri e hidratado com solução salina (Na Cl 0,9%). Nessa etapa o fragmento muscular foi manipulado utilizando pinça de ponta ultrafina (Roney), que foi realizada a partir da junção musculotendínea com o objetivo de manter a integridade estrutural do ventre muscular.

As fibras musculares isoladas foram fixadas em lâmina histológica por meio de esmalte incolor (Risqué). Posteriormente as lâminas dos sarcômeros em série, foram fotografadas e a régua calibrada foi posicionada ao longo de 300 μm por fibra muscular conforme descrito por Williams; Goldspink (1971) em microscópio de luz (objetiva 100x em imersão; microscópio Nikon, modelo eclipse E 200®) (Figura 17). E, realizou-se a contagem dos sarcômeros em série ao longo de 300 μm , utilizando-se o programa ImageJ (versão 1.52a, EUA).

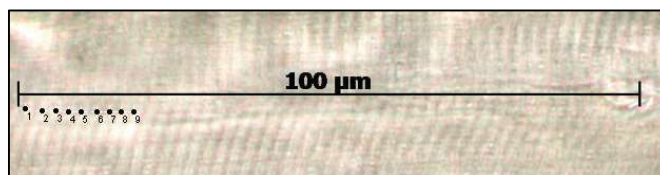


Figura 17. Fotomicrografia (100x em imersão) de fibra isolada de músculo sóleo de rato, preparada para contagem do número de sarcômeros em série. Traçado preto representa 100 μm por meio do software Image J (versão 1.52a, EUA).

5.7 Análise do tecido intramuscular não contrátil: epimísio, perimísio e endomísio.

Para a mensuração do epimísio, perimísio e endomísio foi utilizada a porção proximal do músculo sóleo para avaliação e fixação em solução de formalina a 10%, embebida em parafina, seccionada transversalmente (8 μ m) em micrótomo (Olympus) e corada com hematoxilina e eosina (HE).

As fotomicrografias das lâminas foram realizadas utilizando o microscópio de luz (Olympus BX50) e fotografadas em câmera digital (Sony CCD IRIS Camera) com objetiva de 20x em ampliação máxima (200x), foram considerados os seguintes critérios para escolha dos campos para fotomicrografia: aqueles que incluíram epimísio, perimísio e endomísio; campos livres de artefatos, dobras, fissuras, como descrito por Kurose et al. (2006).

A coloração das estruturas de epimísio e perimísio foi realizada utilizando o software *Photoshop CS6 Portable* (versão 13.0, BRA) Figura 18A. As estruturas do epimísio e perimísio foram coradas com diferentes cores (pantone verde 802C e pantone laranja 715C respectivamente) Figura 18B.

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 18B).

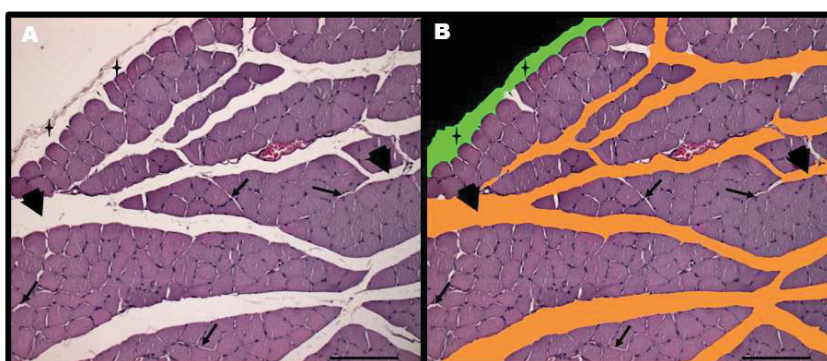


Figura 18. Fotomicrografia de corte transversal do músculo sóleo, corado com hematoxilina e eosina (HE), objetiva 20x. (A) Fotomicrografia antes de editar no Photoshop CS6 Portable (versão 13.0, BRA). (B) Fotomicrografia após marcação do epimísio e perimísio (pantone verde 802C e pantone laranja 715C, respectivamente) e coloração de fundo preto. (+) epimísio; (cabeça de seta) perimísio; (setas) endomísio. Barra de escala: 50 μ m.

Dois examinadores independentes identificaram e marcaram epimísio e perimísio para confirmar a topografia onde estas estruturas foram alocadas na fotomicrografia. Posteriormente, foram analisadas 5 fotomicrografias idênticas para ambos os avaliadores, considerando os seguintes critérios: epimísio (porção externa envolvendo todo o feixe muscular) e perimísio (porções de tecido conjuntivo envolvendo um feixe de fibras musculares), conforme descrito por Kurose et al. (2006) e Murphy & Ohlendieck (2016).

Em seguida, calculou-se o coeficiente de correlação intraclassa (ICC) inter avaliador, ou seja, para confirmar se o epimísio e o perimísio estavam corretamente identificados. Com relação ao epimísio, houve forte concordância de 87%, intervalo de confiança (-0,22-0,98) e erro padrão de medida (SEM = 0,36). Assim como para a marcação do perimísio, o ICC inter avaliador foi de 97%, intervalo de confiança (0,72-0,99; SEM = 0,17). Como o endomísio não foi marcado manualmente, não foi calculado o ICC.

Posteriormente, apenas um avaliador realizou as medições de epimísio, perimísio e endomísio. Para aplicação da máscara, foi considerada a cor de fundo da fotomicrografia, ou seja, branco. A seguir, as áreas de epimísio, perimísio e endomísio foram marcadas pela máscara e analisadas com o software *Image ProPlus*, devidamente calibrado.

5.8 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software SPSS 2.0. Os resultados foram descritos como média±desvio padrão. A análise de normalidade dos dados foi realizada por meio do teste Shapiro-Wilk e caso apresentassem normalidade, a homogeneidade foi conferida pelo teste Levene.

Quando os dados apresentaram distribuição normal e homogênea para avaliação do peso corporal inicial (1º dia) e final (9º dia) aplicou-se os testes *T-student* pareado, enquanto que para os dados não normais, optou-se pelo teste Wilcoxon.

Para comparação dos dados intergrupos e intragrupos de dados normais aplicou-se o teste paramétrico ANOVA- *one way, post hoc Tukey*. Enquanto que para os dados não normais, aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

A correlação entre as variáveis paramétricas foi analisada pelo teste de Pearson e para as variáveis não paramétricas pelo teste de Sperman. Foram adotados os seguintes critérios: Correlação fraca (0–0,3); Correlação moderada (0,31 – 0,6); Correlação forte (> 0,6). A regressão linear simples foi utilizada caso as variáveis apresentem correlação moderada ou alta e significativa, com a finalidade de verificar a associação de um desfecho em relação ao outro.

Ainda, foi calculada a relação entre a proporção de colágeno I e colágeno III intra e intergrupos, para este cálculo foi considerada a média da porcentagem de colágeno I como numerador, e a média da porcentagem de colágeno III como denominador, assim, a razão numerador e denominador do grupo controle foi considerada como valor de referência. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Massa corporal, massa muscular absoluta e relativa e histomorfometria

6.1.1 Massa Corporal

Os dados iniciais e finais da massa corporal para todos os grupos mostraram normalidade ($p > 0,05$, Shapiro Wilk) e homogeneidade ($p > 0,05$, Levene). Todos os grupos, exceto o GCJ, reduziram a massa corporal após 3 semanas, mas a porcentagem de redução da massa corporal não foi diferente entre os grupos. Conforme descrito na tabela 02.

Tabela 2. Comparação da massa corporal inicial (1º dia de alongamento) vs massa corporal final (9º dia de alongamento).

Grupo	Massa Corporal Inicial (g)	Massa corporal final (g)	Redução de massa corporal relativa (%)
GCJ	300.00±43.05	274.50±22.35	3%
GAJ	270.87±19.45	253.75±12.42*	5%
GCI	356.57±41.91	335.28±39.76*†	6%
GAI	344.28±39.70	321.42±32.67*‡	6%

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os resultados estão descritos como média e desvio padrão. *0,01 (teste t pareado) em relação à massa corporal inicial. †0,00 (ANOVA one way Post Hoc Tukey) em comparação com o GCJ. ‡0,00 (ANOVA one way Post Hoc Tukey) em comparação com GAJ.

6.1.2 Massa Muscular

A massa muscular final absoluta apresentou distribuição normal ($p > 0,05$ Shapiro Wilk), mas não homogênea ($p < 0,05$ Levene). Os dados de massa muscular em relação à massa corporal final não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$ Shapiro Wilk) ou homogênea ($p < 0,05$ Levene). Os grupos alongamento jovem, controle idoso e alongamento idoso demonstraram redução de massa corporal final em relação a massa corporal inicial. Quando comparada a massa corporal final dos grupos controle, verificou-se que o GCI apresentou maior massa corporal final em relação ao GCJ. Além disso, o GAI demonstrou menor massa muscular relativa a massa corporal final quando comparado ao GAJ. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na análise da massa muscular.

Os dados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação da massa corporal inicial e final, massa muscular absoluta e massa muscular relativa entre os grupos.

Grupo	Massa corporal final (g)	Massa muscular (g)	Massa muscular relativa a massa corporal final (%)
GCJ	274.50±22.35	0,14±0,02	0,05±0,00
GAJ	253.75±12.42*	0,16±0,02	0,06±0,00
GCI	335.28±39.76*†	0,14±0,03	0,04±0,00
GAI	321.42±32.67*‡	0,14±0,06	0,04±0,02*

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os resultados estão descritos como média e desvio padrão. *0,01 (Teste T-pareado) em relação a massa corporal inicial. †0,00 (ANOVA one-way Post-Hoc Tukey) em comparação ao GCJ. ‡0,00 (ANOVA one-way Post-Hoc Tukey) em comparação ao GAJ. †0,00 (*Kruskal-Wallis*) em comparação com o GAJ. ‡0,00 (*Kruskal-Wallis*) em comparação com o GAJ.

6.1.3 Área de secção transversa das fibras musculares (ASTFM)

Os dados da ASTFM não mostraram normalidade ($p < 0,05$, Shapiro Wilk) e homogeneidade ($p < 0,05$, Levene) em todos os grupos. Verificou-se ASTFM 18% menor no GCI quando comparado ao GCJ. Já no GAJ observa-se ASTFM 11% maior quando comparado ao GCJ. Em contraste, a ASTFM do GAI diminuiu 6% quando comparado ao GCI. Esses resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito do exercício de alongamento crônico na ASTFM do músculo sóleo de ratas jovens e idosas.

Grupo	ASTFM
GCJ	5.119,84±1.857,73
GAJ	5.681,15±1.943,61*
GCI	4.172,82±1.446,08 [†]
GAI	3.919,54±1.694,65 ^{‡†}

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os resultados estão descritos como média±desvio padrão. *0,00 (*Kruskal-Wallis*) em comparação com o GCJ. [†]0,00 (*Kruskal-Wallis*) em comparação com o GCJ. [‡]0,03 (*Kruskal-Wallis*) em comparação com o GCI. [†]0,00 (*Kruskal-Wallis*) em comparação com o GAJ.

6.2 Análise Longitudinal, comprimento muscular, comprimento dos sarcômeros em série e estimativa dos sarcômeros em série.

6.2.1 Comprimento muscular

Os dados não mostraram normalidade ($p < 0,05$, Shapiro Wilk) e homogeneidade ($p > 0,05$, Levene). O comprimento do sarcômero foi 17% menor no GAJ quando comparado ao GCJ. No entanto, 10% maior no GAI em relação ao GCI. Os dados estão demonstrados na Tabela 05.

Tabela 5. Efeito do exercício de alongamento crônico no comprimento do músculo sóleo de ratas jovens e idosas.

Grupo	Comprimento muscular (mm)
GCJ	22,34±1,58
GAJ	22,07±1,55*
GCI	22,14±2,56
GAI	25,12±2,46#

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os resultados estão descritos como média±desvio padrão. *0,03 (ANOVA *one way Post Hoc Tukey*), em relação ao GAI. #0,04 (ANOVA *one way Post Hoc Tukey*), em relação ao GCI.

6.2.2 Estimativa do número de sarcômeros em série

A distribuição dos dados foi normal ($p > 0,05$ Shapiro Wilk) e homogênea ($p > 0,05$ Levene). Foi detectado maior número de sarcômeros em série no GAJ do que no GCJ ($p < 0,05$ ANOVA *one way*, Post Hoc Tukey). Não houveram diferenças significativas quando comparados os grupos GCJ e GCI. Porém no GAJ verificou-se aumento em relação ao GCJ.

Os dados estão descritos na Tabela 06.

Tabela 6. Efeito do exercício de alongamento crônico na estimativa de sarcômeros em série.

Grupo	Estimativa de sarcômeros em série
GCJ	10070,39±1072,38
GAJ	12062,91±1564,68*
GCI	10959,38±1150,31
GAI	11475,42±2048,29

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os resultados estão descritos como média±desvio padrão. *0,03 (ANOVA *one way Post Hoc Tukey*), em relação a GCJ.

6.2.3 Comprimento dos sarcômeros em série

Os dados não mostraram normalidade ($p < 0,05$ Shapiro Wilk) e homogeneidade ($p > 0,05$ Levene). O comprimento do sarcômero foi 17% mais curto no GAJ comparado ao GCJ e 10% maior no GAI que no GCI. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos, a descrição dos dados na Tabela 07.

Tabela 7. Efeito do exercício de alongamento crônico na estimativa de sarcômeros em série.

Grupo	Comprimento dos sarcômeros (μm)
GCJ	2,23 \pm 0,26
GAJ	1,85 \pm 0,20*
GCI	2,02 \pm 0,16
GAI	2,24 \pm 0,38#

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os resultados estão descritos como média \pm desvio padrão. *0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GCJ. #0,02 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GAJ.

6.3 Imunohistoquímica

6.3.1 Imunomarcção para colágeno tipo I por área total de fibra muscular

A área do colágeno I está expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Os dados da imunopositividade para o colágeno tipo I mostraram distribuição não normal ($p < 0,05$ Shapiro Wilk), e não homogênea ($p < 0,05$ Levene). Não se verificou diferença significativa quando comparados os GCJ e GCI. Observou-se maior porcentagem de colágeno tipo I no GAJ quando comparado ao GCJ. Já no GAI, verificou-se menor porcentagem de colágeno tipo I quando comparado ao GCI e quando comparado ao GAJ. Os dados estão representados na Tabela 08.

Tabela 8. Comparação da área de Imunopositividade para Colágeno tipo I no músculo sóleo entre os grupos.

Grupos	Área Total de Imunopositividade (μm^2)	Área Total de Fibra Muscular (μm^2)	Porcentagem de Colágeno I por área total de fibra muscular (%)
GCJ	572 \pm 983	58115 \pm 32524	1,42 \pm 2,92
GAJ	2827 \pm 2670	51565 \pm 41225	7,44 \pm 7,18*
GCI	422 \pm 787	89660 \pm 63425	4,66 \pm 0,68
GAI	91 \pm 112	13061 \pm 22088	0,07 \pm 0,09*†

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. * $p = 0,00$ (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GCJ. # $p = 0,02$ (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GCI. † $p = 0,00$ (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GAJ.

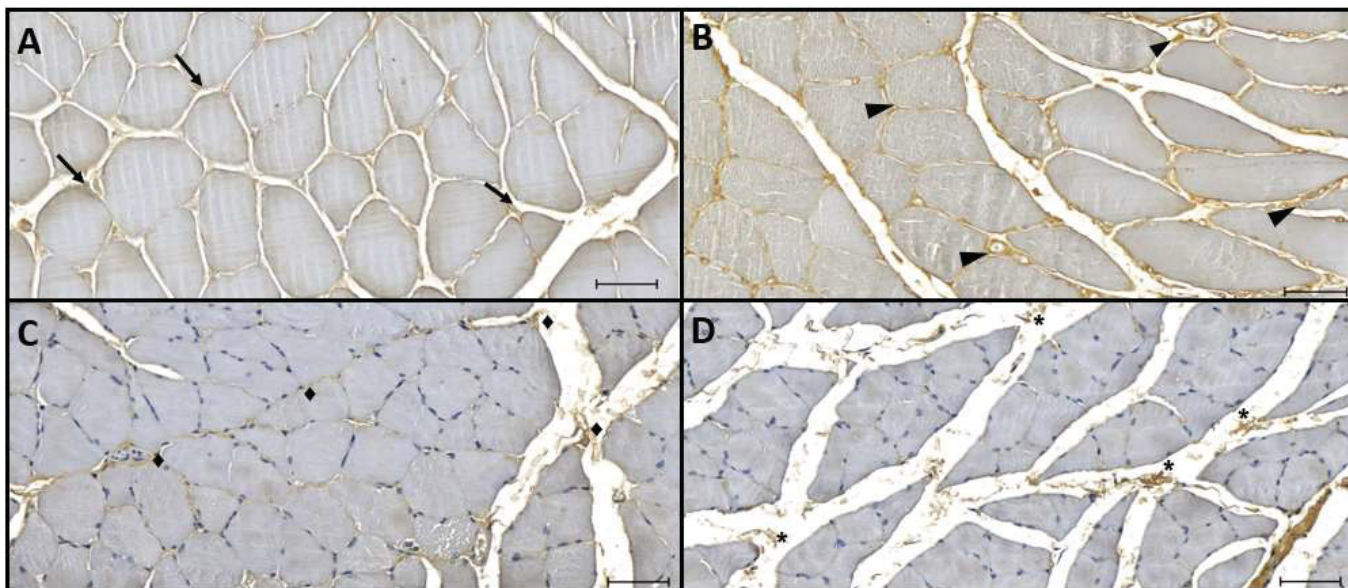


Figura 19. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcção de colágeno tipo I em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcção de colágeno tipo I marcada em coloração castanha (C) GCI \blacklozenge indicam de imunomarcção de colágeno tipo I em coloração castanha; (D) GAI * indicam imunomarcção de colágeno tipo I em coloração castanha. Barra de 50 μ m.

6.3.2 Imunopositividade para colágeno tipo III por área total de fibra muscular

A área do colágeno III está expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Os dados da imunopositividade para o colágeno tipo III mostraram distribuição não normal ($p=0<05$ Shapiro Wilk), e não homogênea ($p<0,05$ Levene). Conforme demonstrado na Tabela 09.

Tabela 9. Comparação da área de Imunopositividade para Colágeno tipo III no músculo sóleo entre os grupos.

Grupos	Área Total de Imunopositividade (μm^2)	Área Total de Fibra Muscular (μm^2)	Porcentagem de Colágeno III por área total de fibra muscular (%)
GCJ	7359 \pm 5949	69.072 \pm 51.885	13,61 \pm 10,24
GAJ	16704 \pm 9141	128.430 \pm 33.047	14,37 \pm 9,54
GCI	12977 \pm 8111	122.105 \pm 41.273	13,14 \pm 13,77
GAI	4763 \pm 2899	94.986 \pm 22.621	5,51 \pm 5,52**

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. *0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GAJ. #0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GCI.

O GAJ apresentou maior porcentagem de colágeno III por área total de fibra muscular, quando comparado ao GAI. Já, na comparação entre o GCI e GAI, verifica-se menor porcentagem de colágeno III por área total de fibra muscular.

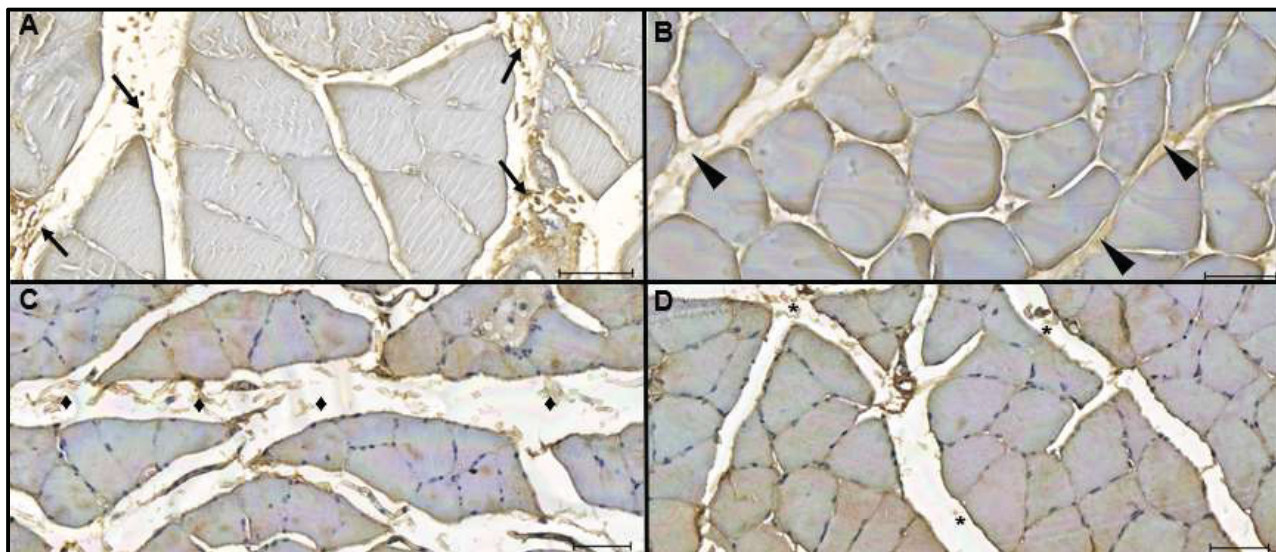


Figura 20. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcagem de colágeno tipo III em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcagem de colágeno tipo III marcada em coloração castanha (C) GCI ♦ indicam de imunomarcagem de colágeno tipo III em coloração castanha; (D) GAI *indicam imunomarcagem de colágeno tipo III em coloração castanha. Barra de 50 μ m.

6.3.3 Relação da porcentagem de colágeno I e III

A distribuição dos dados de relação da porcentagem entre colágeno I e III não apresentou normalidade ($p=0,00$ Shapiro Wilk). O GAJ demonstrou maior relação de colágeno tipo I em relação ao III, quando comparado ao GCJ. Enquanto, o GAI demonstrou menor relação de colágeno tipo I em relação ao III, quando comparado ao GCI. Os dados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação da Relação entre colágeno I e III no músculo sóleo entre os grupos.

Grupos	Porcentagem de Colágeno I por área total de fibra muscular (%)	Porcentagem de Colágeno III por área total de fibra muscular (%)	Relação entre I e colágeno III por área total de fibra muscular (%)
GCJ	1,42 \pm 2,92	13,61 \pm 10,24	0,11 \pm 0,18
GAJ	7,44 \pm 7,18	14,37 \pm 9,54	0,88 \pm 1,35*
GCI	0,56 \pm 0,68	13,14 \pm 13,77	0,14 \pm 0,26
GAI	0,07 \pm 0,09	5,51 \pm 5,52	0,02 \pm 0,03*†

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. *0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GCJ. #0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GCI. †0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GAJ.

Na análise intergrupos alongamento, verificou-se que o GAI demonstrou menor relação de colágeno tipo I em relação ao III, quando comparado ao GAJ.

Já a análise entre os grupos controles não se verificou diferença significativa ($p > 0,05$ Kruskal-Wallis).

6.3.4 Imunopositividade para fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por área total de fibra muscular

A área de porcentagem de TNF- α está expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Os dados da imunopositividade para TNF- α demonstraram distribuição não normal ($p < 0,05$ Shapiro Wilk), e não homogênea ($p < 0,05$ Levene). Os dados estão representados da Tabela 11.

Tabela 11. Comparação da área de Imunopositividade para TNF- α no músculo sóleo entre os grupos.

Grupos	Área Total de Imunopositividade (μm^2)	Área Total de Fibra Muscular (μm^2)	Porcentagem de TNF- α por área total de fibra muscular (%)
GCJ	278 \pm 332	99385 \pm 28776	0,30 \pm 0,39
GAJ	1558 \pm 1742	99814 \pm 25391	1,72 \pm 2,02*
GCI	12693 \pm 11977	67543 \pm 39955	26,29 \pm 22,98
GAI	20343 \pm 23003	74176 \pm 35655	41,87 \pm 40,19#

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. *0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GCJ. #0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação ao GAJ.

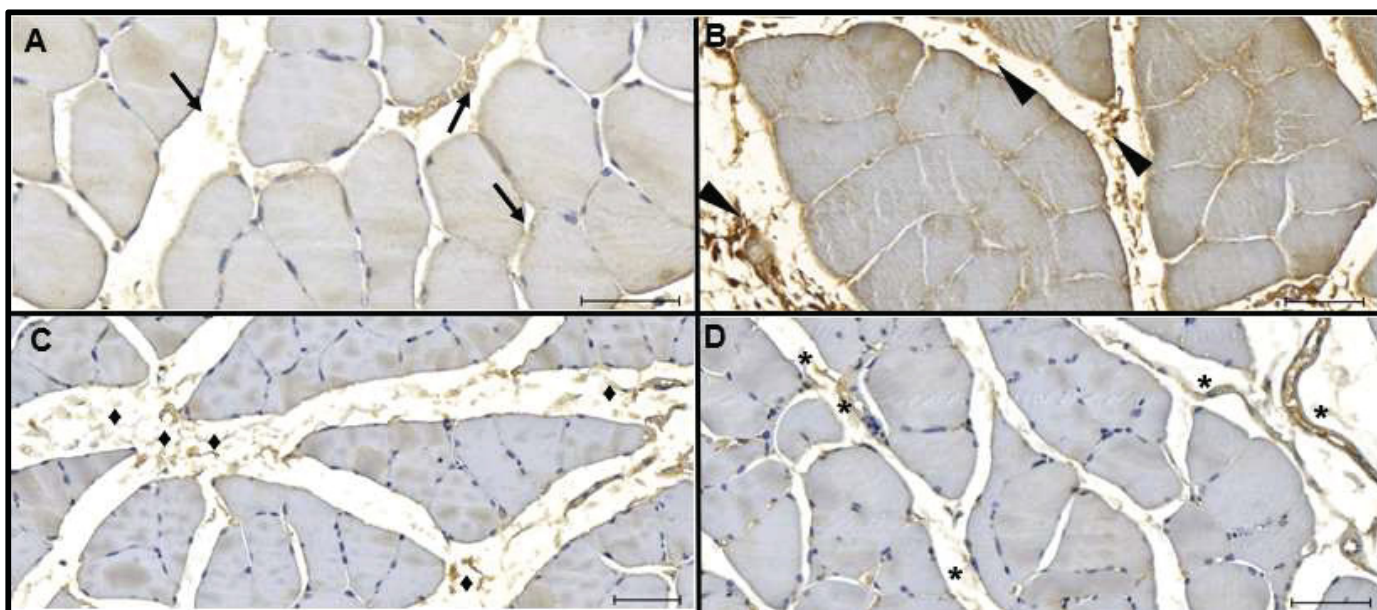


Figura 21. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcção de TNF- α em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcção de TNF- α marcada em coloração castanha (C) GCI \blacklozenge indicam de imunomarcção de TNF- α em coloração castanha; (D) GAI * indicam imunomarcção de TNF- α em coloração castanha. Barra de 50 μ m.

6.3.5 Imunopositividade para fator de transformação de crescimento beta (TGF β -1) por área total de fibra muscular

Os dados de imunopositividade para o fator de transformação de crescimento beta (TGF β -1), não demonstraram normalidade ($p < 0,05$ Shapiro Wilk) ou homogeneidade ($p < 0,05$ Levene). Não foram verificadas diferenças significativas. Os valores estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Comparação da área de imunopositividade para TGF β -1 no músculo sóleo entre os grupos.

Grupos	Área Total de Imunopositividade (μm^2)	Área Total de Fibra Muscular (μm^2)	Porcentagem de TGF β -1 por área total de fibra muscular (%)
GCJ	1967 \pm 1725	90524 \pm 92744	2,97 \pm 3,91
GAJ	14151 \pm 18112	109087 \pm 32525	10,68 \pm 12,73
GCI	2983 \pm 3969	102970 \pm 25132	3,89 \pm 7,37
GAI	3691 \pm 3211	98581 \pm 35375	5,91 \pm 10,36

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

Figura 20. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCI cabeças de seta indicam imunomarcção de TNF- α em coloração castanha; (B) GCJ cabeças de seta indicam imunomarcção de TNF- α marcada em vermelho, após aplicação de máscara no software *Image Pro Plus*; (C) GAI setas indicam imunomarcção de TNF- α em coloração castanha; (D) GAJ setas indicam imunomarcção de TNF- α marcada em vermelho, após aplicação de máscara no software *Image Pro Plus*. Barra de 50 μm .

Apesar de ter aumentado a porcentagem de TGF β -1 em ambos grupos, os testes estatísticos não demonstraram diferença significativas tanto intergrupos como intragrupos ($p > 0,05$ Kruskal Wallis).

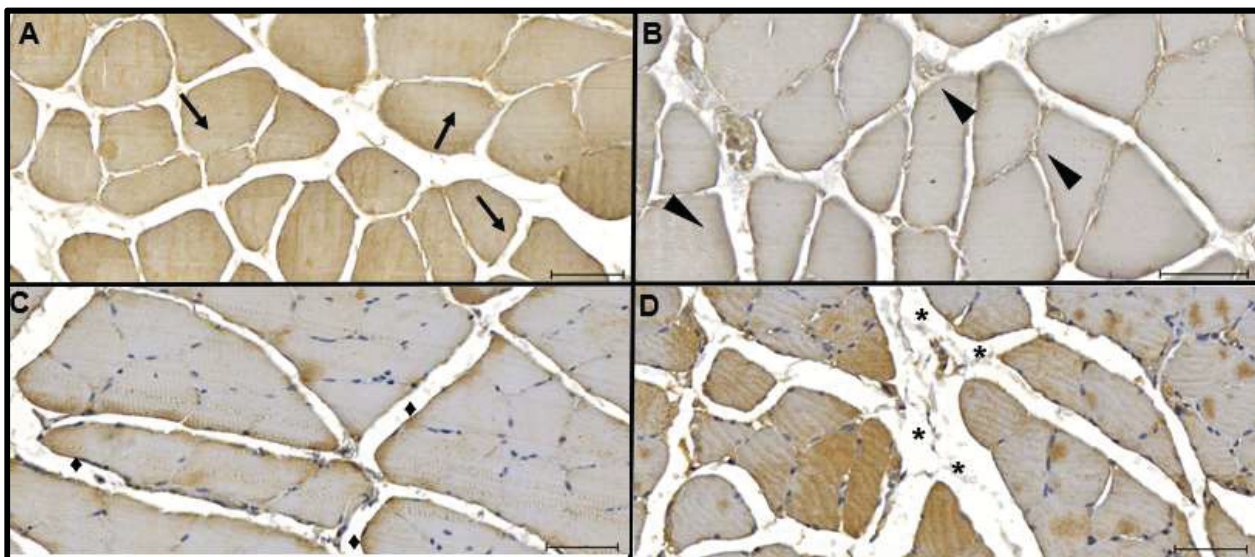


Figura 22. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo, em objetiva 40x. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam imunomarcção de TGF β -1 em coloração castanha; (B) GAJ cabeças de seta indicam imunomarcção de TGF β -1 marcada em coloração castanha (C) GCI \blacklozenge indicam de imunomarcção de TGF β -1 em coloração castanha; (D) GAI * indicam imunomarcção de TGF β -1 em coloração castanha. Barra de 50 μ m.

6.4 Dados de epimísio, perimísio e endomísio

A quantidade de epimísio, perimísio e endomísio está expressa em porcentagem em relação à área de fibras musculares em cada fotomicrografia. As porcentagens de epimísio, endomísio e perimísio não apresentaram normalidade ($p < 0,05$ Shapiro Wilk) ou homogeneidade ($p < 0,05$ Levene). Verificou-se menor porcentagem de epimísio, perimísio e endomísio em ratas do grupo controle idoso, quando comparadas ao controle jovem. O GAJ demonstrou diferença significativa na porcentagem de perimísio quando comparado ao GCJ. Em GAI não foram evidenciadas diferenças significativas. Os resultados estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Efeitos do exercício crônico de alongamento no epimísio, perimísio e endomísio de ratas jovens e idosas.

Grupos	Epimísio (%)	Perimísio (%)	Endomísio (%)
GCJ	83.19±116.14	181.09±147.04	66.64±46.40
GAJ	30.52±18.37	201.83±132.07#	34.68±30.23
GCI	14.04±6.51*	84.30±36.84†	17.49±12.03‡
GAI	16.81±13.74	83.98±63.43	30.17±26.89

GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo de alongamento jovem; GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo de alongamento envelhecido. *0,00 (*Kruskall Wallis*), em relação ao GCJ. #0,01 (*Kruskall Wallis*) em relação ao GCI. †0,00 (*Kruskall Wallis*) em relação ao GCJ. ‡0,00 (*Kruskall Wallis*) em relação ao GCJ.

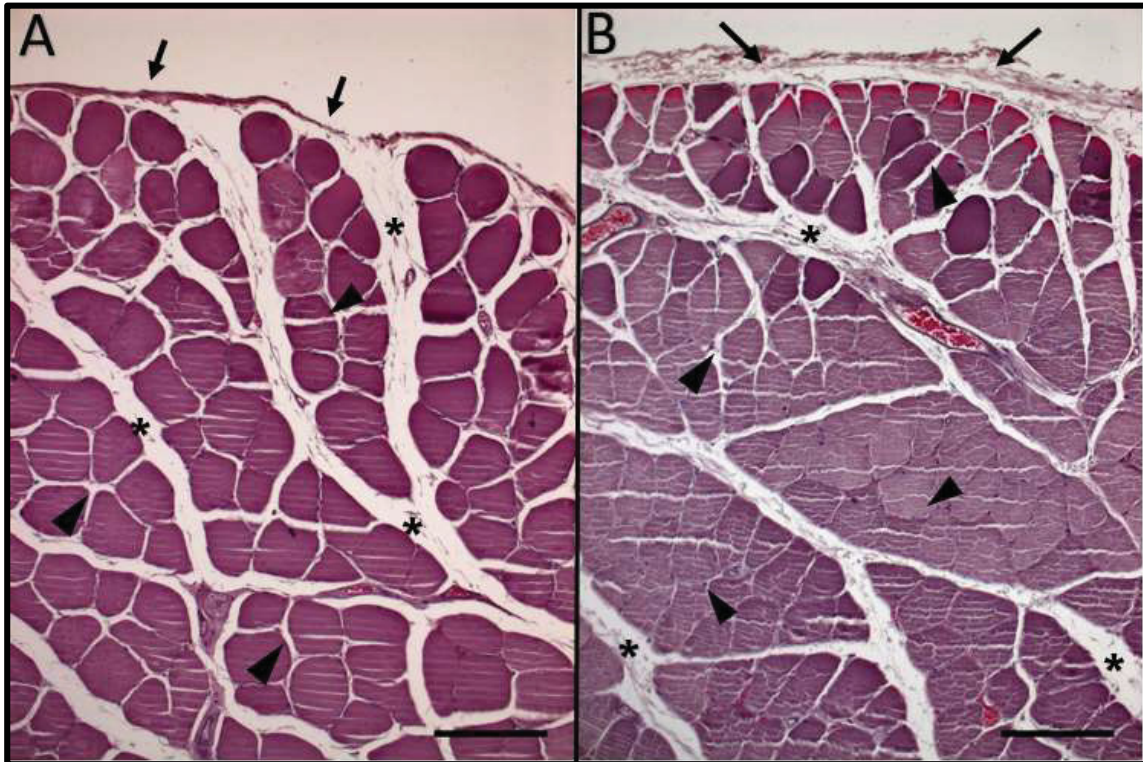


Figura 23. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo de ratas jovens, objetiva de 20x, coradas com HE. GCJ, grupo controle jovem; GAJ, grupo alongamento jovem. (A) GCJ setas indicam epimísio; (*) indicam perimísio; cabeças de seta indicam endomísio. (B) GAJ setas indicam epimísio; (*) indicam perimísio; cabeças de seta indicam endomísio. Barra: 50 μ m.

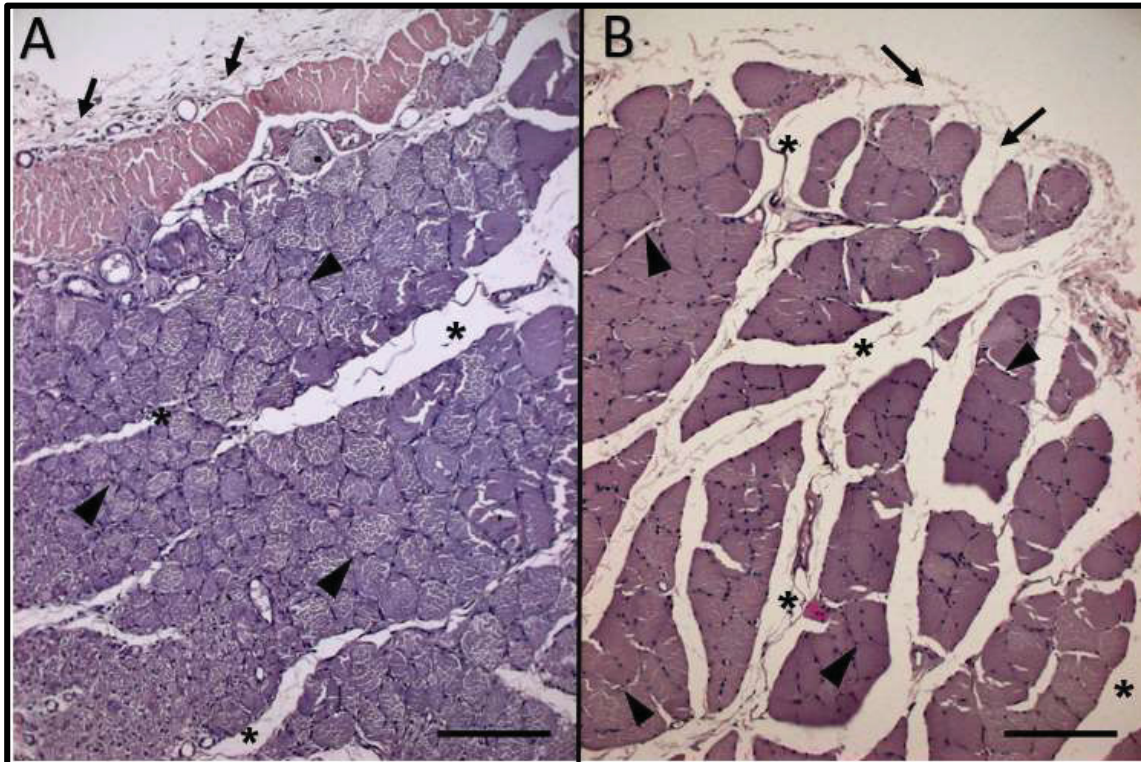


Figura 24. Fotomicrografias de corte transversal de músculo sóleo de ratas idosas, objetiva de 20x, coradas com HE. GCI, grupo controle idoso; GAI, grupo alongamento idoso. (A) GCJ setas indicam epimísio; (*) indicam perimísio; cabeças de seta indicam endomísio. (B) GAJ setas indicam epimísio; (*) indicam perimísio; cabeças de seta indicam endomísio. Barra: 50 µm.

6.5 Dados de força aferida

6.5.1 Resultado dos dados de força aferida pelo aparato de alongamento

Os dados de força não demonstraram distribuição normal ($p > 0,05$ Shapiro Wilk). Verificou-se que durante a última semana de exercício de alongamento a força aferida pela célula de carga foi menor do que quando comparada a primeira semana em ratas jovens. Os resultados estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de força em newton/metro aferidos pela célula de carga durante 3 semanas de exercício de alongamento.

Grupo	Repetição	Força aferida Primeira Semana (N)	Força aferida Segunda Semana (N)	Força aferida Terceira Semana (N)
Ratas Jovens	1 ^a	0,79±0,05	0,76±0,02	0,74±0,02*
	2 ^a	0,78±0,03	0,73±0,08	0,74±0,05#
	3 ^a	0,77±0,03	0,73±0,00	0,73±0,07†
	4 ^a	0,77±0,03	0,72±0,09	0,73±0,07‡

Os dados estão expressos em média±desvio padrão. *0,00 (*Kruskal-Wallis*), em relação a primeira semana #0,00 (*Kruskal-Wallis*) em relação a primeira semana. †0,05 (*Kruskal-Wallis*) em relação a primeira semana. ‡0,01 (*Kruskal-Wallis*) em relação a primeira semana.

Porém, no grupo alongamento idoso, constatou-se que durante a última semana de exercício de alongamento a força aferida pela célula de carga foi menor quando comparada a segunda semana. Os resultados estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de força em newton/metro aferidos pela célula de carga durante 3 semanas de exercício de alongamento.

Grupo	Repetição	Força aferida na primeira semana (N)	Força aferida na segunda semana (N)	Força aferida na terceira semana (N)
Ratas Idosas	1 ^a	0,79±0,32	0,80±0,31	0,78±0,31*
	2 ^a	0,80±0,32	0,85±0,33	0,78±0,31#
	3 ^a	0,79±0,32	0,85±0,34	0,78±0,30†
	4 ^a	0,78±0,32	0,81±0,36	0,77±0,30‡

Os dados estão expressos em média±desvio padrão. *0,03 (*Kruskal Wallis*) em relação a segunda semana #0,04 (*Kruskal-Wallis*) em relação a segunda semana. †0,04 (*Kruskal Wallis*) em relação a segunda semana. ‡0,03 (*Kruskal Wallis*) em relação a segunda semana.

A força média necessária para alongar o músculo envelhecido foi maior quando comparada com a força aplicada em jovens durante 3 semanas ($0,91 \pm 0,10\text{N}$ vs $0,75 \pm 0,06\text{ N}$, $p=0,00$ teste de Kruskal-Wallis).

6.5.2 Correlação entre força aferida pelo aparato e histomorfometria e imunohistoquímica

Os dados apresentaram distribuição não normal ($p<0,05$ Shapiro Wilk) e não homogênea ($p<0,05$ Levene) portanto, o teste de correlação aplicado foi de Spearman, os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 13. Correlação entre a força aferida em ratas jovens alongadas e medidas histomorfométricas e imuno-histoquímicas.

Grupo	Variável	r	R ²	Valor de p	β
GAJ	Massa muscular absoluta	-0,03	-0,13	0,92	-0,09
	Comprimento muscular	-0,12	-0,13	0,76	0,00
	Estimativa de Sarcômeros em série	-0,72	0,01	0,04*	3,68E006
	Área de Secção Transversa Muscular	0,25	-0,18	0,53	2,61E-006
	Porcentagem de imunomarcção de colágeno I	-0,43	0,65	0,27	-0,02
	Porcentagem de imunomarcção de colágeno III	-0,64	0,00	0,08	7,49E006
	Porcentagem de imunomarcção de TNF- α	0,18	-0,03	0,67	0,00
	Porcentagem de imunomarcção de TGF β -1	0,18	0,06	0,67	0,00
GAI	Massa muscular absoluta	-0,33	-0,06	0,45	-0,13
	Comprimento muscular	0,32	-0,14	0,47	-0,00
	Estimativa de Sarcômeros em série	0,48	0,50	0,26	-4,29E-0,06
	Área de Secção Transversa Muscular	0,20	-0,09	0,66	2,29E-006
	Porcentagem de imunomarcção de colágeno I	-0,77	-0,04	0,04#	-0,00
	Porcentagem de imunomarcção de colágeno III	-0,10	0,02	0,81	0,00
	Porcentagem de imunomarcção de TNF- α	-0,01	-0,12	0,96	0,00
	Porcentagem de imunomarcção de TGF β -1	0,34	-0,16	0,66	0,00

GAJ, grupo alongamento jovem; GAI, grupo alongamento idoso. *0,04 *Correlação de Spearman* forte entre sarcômeros em série e força aferida; *0,04 *Correlação de Spearman* forte entre colágeno tipo I e força aferida.

Quando realizada a regressão linear dos dados que apresentaram correlação, não se verificou relevância significativa para nenhuma das variáveis.

7. DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi detectar sarcopenia no músculo sóleo idoso, afinal a ASTFM do grupo controle idoso foi 18% menor quanto comparada ao grupo controle jovem. Além disso, a massa corporal final absoluta das ratas idosas controle foi maior do que à das jovens controle, sem ter sido encontrada diferença na massa muscular, o que sugere possível obesidade sarcopênica em ratas idosas controle (EZZAT-ZADEH et al., 2017). Outro achado que merece ser ressaltado é que em ratas idosas controle apresentaram maior imunomarcção de TNF- α do que ratas jovens controle, sugerindo o processo de *inflammaging* em idosas (OGAWA et al., 2016).

A inflamação sistêmica crônica conhecida como *inflammaging* é caracterizada por altas concentrações de TNF- α que desencadeiam cascata de degradação de proteínas sarcoméricas, resultando em atrofia muscular (BONALDO; SANDRI, 2013; OGAWA et al., 2016). No processo mediado por TNF- α a cascata de atrofia é regulada positivamente ativando o NF- κ B, responsável pela via de apoptose celular (BONEWALD et al., 2015). Dessa forma, a inflamação mediada pelo aumento do TNF- α pode contribuir para atrofia muscular ativando proteases dependentes de cálcio como calpaína, estimulando o sistema proteassoma via caspase-3 e, finalmente, acionando ligases E3-ubiquitina por atrogina-a / MAFbx e MuRF-1 (GORDON et al., 2013). Portanto, menor ASTFM somada à maior imunomarcção de TNF- α em ratas idosas controle, quando comparadas à jovens controle sugere que o grupo controle idoso apresenta sarcopenia provavelmente mediada por TNF- α .

O alongamento muscular induziu atrofia no músculo sóleo de ratas idosas. Vale ressaltar que ratas idosas controle e alongamento não demonstraram diferença na imunomarcção de TNF- α . No entanto, a magnitude da atrofia após 3 semanas foi de 6%, tal porcentagem foi menor quando comparada a Zotz et al., (2016) que observaram 21% de atrofia, após uma semana de alongamento. Este desfecho sugere que a hipotrofia induzida pelo alongamento, no músculo envelhecido, pode ser dependente do tempo, porque quando aplicada durante 3 semanas, a diminuição foi inferior a verificada no efeito agudo, ou seja, após uma

semana. Assim, sugere-se que sejam investigados os efeitos do alongamento realizado durante 2 e 4 semanas, para elucidar os mecanismos envolvidos na regulação do trofismo muscular.

No grupo alongamento idoso, foi encontrado comprimento muscular maior, sem diferença no número de sarcômeros em série, além de sarcômeros mais compridos do que o grupo controle idoso.

Nossos resultados demonstram que em ratas idosas foi necessária maior média de força para realização do alongamento, sugerindo maior resistência a tensão. No grupo alongamento idoso, verificou-se redução dos dois tipos de colágeno (I e III) e menor percentual de epimísio sugerindo reorganização topográfica do tecido conjuntivo em decorrência do processo de envelhecimento. Durante o envelhecimento, o mais comum é a degradação da MEC devido ao microambiente inflamado favorecendo ação das metaloproteinases de matriz (SAINI et al., 2016). Nesse sentido, o remodelamento do tecido conjuntivo em idosos pode contribuir para ineficiência da transmissão de força levando ao fenômeno denominado *durotaxis* (SUN et al., 2016). Assim, considerando que não houve diferença de TNF- α entre ratas idosas controle e alongadas, podemos sugerir que o exercício de alongamento não foi suficiente para prevenir ou atenuar a degradação da MEC decorrente do processo de envelhecimento, provavelmente mediada por essa citocina.

Além disso, nossos achados mostraram que o alongamento crônico, aplicado por 3 semanas, diminuiu os dois tipos de colágeno (I e III) sem alterações no TGF β -1, no grupo alongamento idoso. Resultados diferentes dos descritos por Zotz et al., que após protocolo de exercício de alongamento no músculo sóleo de ratas idosas, aplicado em volume de 240s (4 repetições de 60s), 3 vezes por semana, durante 1 semana, relataram efeito antifibrótico evidenciado pelo aumento do colágeno tipo III e diminuição no tipo I colágeno e TGF β -1.

Em ratas jovens, verificou-se aumento de 11% de ASTFM acompanhado por aumento na imunomarcação de TNF- α após o protocolo de alongamento de

4 repetições de 60s cada, ou seja, volume de 240s por sessão, 3 vezes por semana ao longo de 3 semanas. Resultados semelhantes foram reportados por Coutinho et al., após realizarem alongamento manual, 10 repetições de 60s cada, ou seja, volume de 600s por sessão, no músculo sóleo encurtado de ratos machos jovens, 3 vezes por semana durante 3 semanas, detectando aumento de 10% na ASTFM (COUTINHO et al., 2006). Além disso, em ratos machos jovens submetidos a alongamento mantido por 40 minutos, três vezes por semana, durante três semanas, foi encontrado aumento de 16% na ASTFM (COUTINHO et al., 2006).

Em nosso estudo demonstramos que sessões com volume menor de alongamento, 240s, também podem ser benéficas para a manutenção do trofismo muscular em ratas jovens. Além disso, esses achados sugerem que o TNF- α pode estimular NF-kB nos mioblastos, resultando em aumento da regulação da ciclina D1 reguladora de massa muscular por ativação da Akt / mTOR (SAINI et al., 2016; PAULSEN et al., 2012). Adicionalmente, o alongamento pode ativar a expressão gênica de fatores que regulam positivamente o crescimento muscular (myo-D) e ou negativamente, a atrofia (atrogina-1), remodelando a massa muscular por diferentes vias (PEVIANI et al., 2007).

No presente estudo, após 9 sessões de exercício de alongamento, com volume de 240s cada, verificou-se aumento de 20% no número de sarcômeros em série e diminuição no comprimento dos sarcômeros, sem alterações no comprimento muscular em ratas jovens. Em outro estudo no qual realizou-se alongamento manual intermitente, 10 repetições de 60s cada, ou seja, 600s volume por sessão, no músculo sóleo encurtado de ratas jovens, por 3 dias verificou-se aumento de 32% no número de sarcômeros sem modificação no comprimento do sarcômero (COUTINHO et al., 2006). Além disso, em protocolo de 10 repetições de 45s cada, ou seja, volume de 450s por sessão, no músculo sóleo encurtado de ratas jovens, ovariectomizadas e histerectomizadas, por 12 dias, resultou em aumento de 25% no número de sarcômeros sem modificação no comprimento do sarcômero (YWAZAKI et al., 2015). Dessa forma, mesmo

com volume de alongamento menor, verificou-se benefício do exercício de alongamento em músculo sóleo de ratas jovens.

Além disso a força aplicada para execução do alongamento correlacionou-se negativamente com a estimativa de sarcômeros em série. Sendo que 1% das mudanças no sarcômero podem ser explicadas pela variação de força aplicada. Além disso, a força na primeira semana de alongamento foi maior do que na última semana. Sendo que o mecanismo principal de ativação das integrinas é a aplicação de alongamentos repetidos (KONG et al., 2013; KONG et al., 2009). Assim, sugere-se que apesar da força ter reduzido ao longo das semanas, o estímulo de alongamento aplicado de maneira cíclica foi benéfico em contribuir para adição de sarcômeros em série em ratas jovens.

Em nosso estudo, o protocolo de 4 repetições de 30s cada, ou seja, 120s volume por sessão, no músculo sóleo de ratas jovens, por 9 dias, resultou em aumento de 20% no número de sarcômeros sem modificação no comprimento do sarcômero. Verificou-se que menor volume de alongamento diário, realizado por período maior, promoveu a sarcomerogênese em músculos que não estavam previamente encurtados por imobilização, demonstrando os benefícios do exercício de alongamento crônico em jovens.

No grupo alongamento jovem, houve aumento do colágeno tipo I, acompanhado por maior deposição de tecido conjuntivo no perimísio. A biossíntese de colágeno é caracterizada pela presença de extensa quantidade de fatores pós-traducionais de cadeias polipeptídicas, que contribuem para a qualidade e estabilidade da molécula de colágeno na MEC (HUANG et al., 2015; MURPHY; OHLENDIECK, 2016). Cação-Benedini (2013), realizaram exercício de alongamento em ratas jovens após 10 dias de imobilização, e demonstraram que maiores proporções de colágeno III em relação ao colágeno I. Dessa maneira, sugere-se que o aumento do colágeno tipo I em ratas jovens pode ter sido prejudicial.

O protocolo de exercício de alongamento realizado no músculo sóleo jovem, foi suficiente para induzir hipertrofia, sarcomerogênese e maior área de

perimísio em ratas jovens. Além disso houve aumento de imunomarcagem de TNF- α no músculo alongado jovem, sem mudanças na imunomarcagem do TGF- β . Assim, esses achados podem indicar que o TNF- α desencadeia múltiplas respostas celulares, dependendo do microambiente celular ativa diferentes vias, ou seja, em idosas apresentou efeito atrófico enquanto em jovens hipertrófico (SAINI et al., 2016).

A utilização de anestesia intraperitoneal com quetamina e xilasina, pode ter sido uma limitação, já que todos os grupos apresentaram redução de peso corporal. Em estudo que utilizou anestesia inalatória, em ratas envelhecidas (26 meses de idade), submetidas a exercícios de alongamento, três vezes por semana, por uma semana, não foi detectada mudança no peso corporal (ZOTZ et al., 2016). Portanto, sugere-se que durante a execução do experimento, ao longo de 3 semanas de protocolo de alongamento, a anestesia intraperitoneal possa ter interferido negativamente na massa corporal de ratas idosas. Por outro lado, em experimento realizado com ratos machos, submetidos a anestesia intraperitoneal com ketamina/xilazina, na mesma dosagem, e a exercícios de alongamento, 3x/semana, durante 3 semanas, foi detectado aumento de 17% no peso corporal (COUTINHO et al., 2004). Supõe-se que as respostas de ratos e ratas são diferentes aos anestésicos (ZAMBRICKI et al., 2004).

Além disso, estudos com ratos machos jovens anestesiados com quetamina e xilasina, não demonstraram diferença no peso corporal final (COUTINHO et al., 2004; COUTINHO et al., 2006). Sugerindo que o sexo também pode ter afetado o comportamento dessa variável.

Além da via anestésica, outras limitações foram verificadas, como ausência de avaliações funcionais como aferição de força passiva e desempenho da marcha para analisar os achados na ASTFM sobre a função musculoesquelética, tanto dos grupos controle como alongamento. Diferentes distribuições de tecido conjuntivo foram verificadas, assim, avaliações do arranjo do tecido, qualidade e distribuições dos tipos de colágeno poderiam elucidar os mecanismos do envelhecimento envolvidos nessa regulação. Além disso, a avaliação das vias de sinalização moleculares envolvidas na regulação do tecido

conjuntivo e tecido contrátil muscular, poderiam explicar os diferentes resultados encontrados em jovens e idosas.

8. CONCLUSÃO

A sarcopenia foi encontrada no músculo envelhecido e o protocolo de alongamento não foi suficiente para prevenir a atrofia muscular e a degradação da matriz modulada pelo TNF- α . Porém, no microambiente celular jovem, o alongamento crônico induziu hipertrofia, sarcomerogênese e provavelmente ativou as vias de colágeno I além de aumentar a deposição de tecido conjuntivo no perimísio.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DO MESTRADO (2017-2019)

Artigo Submetido

MASSENZ et al., Chronic Stretching in Soleous Muscle in Rats. *Calcified Tissue International And Musculoskeletal Research*. (2019).

Apresentação de trabalho

1. **MASSENZ, K. J. V.; GOMES, A. R. S. COMO ENSINAR FISIOTERAPIA TRAUMATO-ORTOPÉDICA COM PRÁTICA EM PACIENTES DE ALTA COMPLEXIDADE? UM RELATO DE EXPERIÊNCIA.**, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. **MASSENZ, K. J. V.; MARTINS, H. R. F.; GOMES, A. R. S.; LOUREIRO, A. P. C.; SANTANA, D. M.; CAPRIGLIONE, L. G. 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**, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. GOMES, A. R. S.; MARTINS, H. R. F.; **MASSENZ, K. J. V.**; BERTONCINI, N.; CAMPOS, T.; NORONHA, L.; AZEVEDO, M.; NAGASHIMA, S.; ZOTZ, T. G. G. **EFFECTS OF CHRONIC STRETCHING ON MUSCLE TROPHISM AND CONNECTIVE TISSUE IN AGED FEMALE RATS**, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. MARTINS, H. R. F.; **MASSENZ, K. J. V.**; BERTONCINI, N.; CAMPOS, T.; GOMES, A. R. S.; ZOTZ, T. G. G. **SKELETAL MUSCLE EXTRACELLULAR MATRIX (ECM) ADAPTATION AFTER CHRONIC STRETCHING EXERCISE IN AGED FEMALE RATS.**, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
5. RANK-FILHO, C. A; PEREIRA, C.H.; LAVEZZO-DIAS F.A.; GOMES, A.R., MARTINS, H.R.F; **MASSENZ, K.J.V**, CAMPOS T.M; BERTONCINI N.H.; STONOGA, E.; ZOTZ, T.G.G. **ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATAS IDOSAS.** XIII Jornada Acadêmica de Fisioterapia da UFPR e V Mostra de Trabalhos Científicos, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
6. RANK-FILHO, C. A; PEREIRA, C.H.; LAVEZZO-DIAS F.A.; GOMES, A.R., MARTINS, H.R.F; **MASSENZ, K.J.V**, CAMPOS T.M; BERTONCINI N.H.; STONOGA, E.; ZOTZ, T.G.G. **ANÁLISE DO TRAÇADO ELETROCARDIOGRÁFICO EM RATAS IDOSAS.** XIII Jornada Acadêmica de Fisioterapia da UFPR e V Mostra de Trabalhos Científicos, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
7. **MASSENZ, K. J. V.**; MARTINS, H. R. F.; GOMES, A. R. S.; SANTANA, D. M.; ZOTZ, T. G. G. **EFEITOS CRÔNICOS DO ALONGAMENTO: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA LONGITUDINAL DO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS IDOSAS**, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. SCHEWTCHIK, A. F.; **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 EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO MECÂNICO PASSIVO ESTÁTICO NA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS JOVENS E IDOSAS**, 2017. (Congresso/ Apresentação de Trabalho)
9. **MASSENZ, K. J. V.**; 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 SOLEO DE RATAS JOVENS**, 2017. (Congresso/ Apresentação de Trabalho)
10. ZOTZ, T. G. G.; **MASSENZ, K. J. V.**; SCHEWTCHIK, 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.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

11. MACI, J. F. B.; RIBEIRO, L. F. C.; MARTINS, H. R. F.; GOMES, A. R. S.; MASSENZ, K. J. V.; ZOTZ, T. G. G.; BRANCALHAO, R. M. C. **EFEITOS DO EXERCÍCIO DE ALONGAMENTO MECÂNICO PASSIVO ESTÁTICO NA CARTILAGEM ARTICULAR DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATOS WISTAR FÊMEAS., 2017.** (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

12. MACI, J. F. B.; RIBEIRO, L. F. C.; MARTINS, H. R. F.; GOMES, A. R. S.; MASSENZ, K. J. V.; ZOTZ, T. G. G.; BRANCALHAO, R. M. C. **EFEITOS DO EXERCÍCIO DE ALONGAMENTOMECÂNICO PASSIVO ESTÁTICO NA MEMBRANA SINOVIAL DA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE RATOS WISTAR FÊMEAS, 2017.** (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

13. MASSENZ, K. J. V.; SCHEWTCHIK, A. F.; MARTINS, H. R. F.; GOMES, A. R. S.; LOUREIRO, A. P. C.; SANTANA, D. M.; ZOTZ, T. G. G. **EFFETCS OF A CHRONIC STRETCHING PROTOCOL IN THE SOLEUS MUSCLE HISTOMORPHOMETRY OF AGED FEMALE RATS, 2017.** (Congresso, Apresentação de Trabalho)

14. MENEZES, F.; ZARDO, B. Q.; MARTINS, H. R. F.; CAMPOS, J.; AOKI, K. S.; VEIGA, K. J; MARTINS, M.; FUNKE, A.; DIAS, D. N.; RADOMINSKI, S.; KOWALSKI, S. C.; GOMES, A. R. S. **QUESTIONÁRIOS SOBRE O CONHECIMENTO DOS PACIENTES EM ARTRITE REUMATOIDE -REVISÃO DA LITERATURA, 2017.** (Congresso, Apresentação de Trabalho)

PREMIAÇÕES DE TRABALHOS NO PERÍODO DO MESTRADO (2017 – 2019)

1º Lugar na categoria tema livre na XXVII Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia e no V Simpósio do Idoso na Atenção Primária., Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia (SBGG).

REFERÊNCIAS

ACSM. Exercise and Physical Activity for Older Adults. **Medicine & Science in Sports & Exercised.**

ACSM. 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.

ADAMI ANDREOLLO, N.; FREITAS DOS SANTOS, E.; RACHEL ARAÚJO, M.; ROBERTO LOPES, L.; ADAMI ANDREOLLO, N. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 1, p. 49–51, 2012.

AKAGI, R.; TAKAHASHI, H. Effect of a 5-week static stretching program on hardness of the gastrocnemius muscle. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 24, n. 6, p. 950–957, 2014.

ANGULO, J.; EL ASSAR, M.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Frailty and sarcopenia as the basis for the phenotypic manifestation of chronic diseases in older adults. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 50, p. 1–32, 2016. Elsevier Ltd.

ANTIKAINEN, H.; DRISCOLL, M.; HASPEL, G.; DOBROWOLSKI, R. TOR-mediated regulation of metabolism in aging. **Ageing Cell**, v. 16, n. 6, p. 1219–1233, 2017.

ARO, A. A.; VIDAL, B. C.; TOMIOSSO, T. C.; GOMES, L.; MATIELLO-ROSA, S. M. G. Structural and Biochemical Analysis of the Effect of Immobilization Followed by Stretching on the Calcaneal Tendon of Rats. , p. 443–454, 2008.

BATISTA, L.; CAMARGO, P.; OISHI, J.; SALVINI, T. Efeitos do alongamento ativo excêntrico dos músculos flexores do joelho na amplitude de movimento e torque. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 3, 2008.

BENEDINI-ELIAS, O.; CALVENTE, M.; SILVA, A.; MARTINEZ, E. Z.;

MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Article in press. , 2013.

BIAN, A. L.; HU, H. Y.; RONG, Y. D.; et al. A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF- α . **European Journal of Medical Research**, v. 22, n. 1, p. 4–11, 2017. BioMed Central.

BILSTON, L. E.; TAN, K. Measurement of Passive Skeletal Muscle Mechanical Properties In Vivo: Recent Progress, Clinical Applications, and Remaining Challenges. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 2, p. 261–273, 2015.

BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013.

BONEWALD, F.; BROTTTO, M.; KARASIK, D. pathway. , v. 29, n. 7, p. 1531–1540, 2015.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. T h e use and abuse of muscle histochemistry. **Histochemistry**.

BROWN, N. H. Cell-cell adhesion via the ECM: Integrin genetics in fly and worm. **Matrix Biology**, v. 19, n. 3, p. 191–201, 2000.

BRZESZCZYŃSKA, J.; MEYER, A.; MCGREGOR, R.; et al. Alterations in the in vitro and in vivo regulation of muscle regeneration in healthy ageing and the influence of sarcopenia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 1, p. 93–105, 2018.

CAÇÃO-BENEDINI, L. O.; RIBEIRO, P. G.; PRADO, C. M.; CHESCA, D. L.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. 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.

CALVI, E. N. DE C.; NAHAS, F. X.; BARBOSA, M. V.; et al. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 681–686, 2012.

CARTER, E. E.; THOMAS, M. M.; MURYNKA, T.; et al. Slow twitch soleus muscle is not protected from sarcopenia in senescent rats. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 9, p. 662–670, 2010. Elsevier Inc.

CARVALHO, A. C. G.; PAULA, K. C. DE; AZEVEDO, T. M. C. DE; NÓBREGA, A. C. L. DA. Relação entre flexibilidade e força muscular em adultos jovens de ambos os sexos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 4, n. 1, p. 2–8, 1998.

CHAN, S. P.; HONG, Y.; ROBINSON, P. D. Flexibility and passive resistance of the hamstrings of young adults using two different static stretching protocols. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 11, n. 2, p. 81–86, 2001.

CHANG, K.-V.; WU, W.-T.; HUANG, K.-C.; JAN, W. H.; HAN, D.-S. Limb muscle quality and quantity in elderly adults with dynapenia but not sarcopenia: An ultrasound imaging study. **Experimental Gerontology**, p. #pagerange#, 2018. Elsevier Inc.

CHEN, H.-H.; CHEN, W.-P.; YAN, W.-L.; et al. NRIP is newly identified as a Z-disc protein, activating calmodulin signaling for skeletal muscle contraction and regeneration. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 22, p. 4196–4209, 2015.

CHHETRI, J. K.; DE SOUTO BARRETO, P.; FOUGÈRE, B.; et al. Chronic inflammation and sarcopenia: A regenerative cell therapy perspective. **Experimental Gerontology**, v. 103, p. 115–123, 2018. Elsevier Inc.

CHODZKO-ZAJKO, W. J.; PROCTOR, D. N.; FIATARONE SINGH, M. A.; et al. Exercise and physical activity for older adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 7, p. 1510–1530, 2009.

CORNACHIONE, A. S.; CAC, L. O.; BENEDINI-ELIAS, P. C. O.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Acta Histochemica Effects of 40 min of maintained stretch on the soleus and plantaris muscles of rats applied for different periods of time after hindlimb immobilization. , v. 115, p. 505–511, 2013.

COUTINHO, E. L.; DELUCA, C.; SALVINI, T. F.; VIDAL, B. C. 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, 2006.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1853–1861, 2004.

CRISTOPOLISKI, F.; BARELA, J. A.; LEITE, N.; FOWLER, N. E.; RODACKI, A. L. F. Stretching exercise program improves gait in the elderly. **Gerontology**, v. 55, n. 6, p. 614–620, 2009.

CRUZ-JENTOFT, A. J.; BAEYENS, J. P.; BAUER, J. M.; et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. **Age and Ageing**, v. 39, n. 4, p. 412–423, 2010.

DESPRES, J.; RAMDANI, Y.; DI GIOVANNI, M.; et al. Replicative senescence of human dermal fibroblasts affects structural and functional aspects of the golgi apparatus. **Experimental Dermatology**, p. 0–3, 2019.

DRESCHER, C.; KONISHI, M.; EBNER, N.; SPRINGER, J. Loss of muscle mass: Current developments in cachexia and sarcopenia focused on biomarkers and treatment. **International Journal of Cardiology**, v. 202, p. 766–772, 2016. Elsevier B.V.

EZZAT-ZADEH, Z.; KIM, J. S.; CHASE, P. B.; ARJMANDI, B. H. The Cooccurrence of Obesity, Osteoporosis, and Sarcopenia in the Ovariectomized Rat: A Study for Modeling Osteosarcopenic Obesity in Rodents. **Journal of Aging Research**, v. 2017, 2017. Hindawi.

FAN, X.; GAUR, U.; SUN, L.; YANG, D.; YANG, M. The Growth Differentiation Factor 11 (GDF11) and Myostatin (MSTN) in tissue specific aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 164, p. 108–112, 2017. Elsevier Ireland Ltd.

GAJDOSIK, R. L. Relationship between passive properties of the calf muscles and plantarflexion concentric isokinetic torque characteristics. , p. 220–227, 2002.

GALLON, D.; RODACKI, A. L. F.; HERNANDEZ, S. G.; 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, 2011.

GAO, Y.; WAAS, A. M.; FAULKNER, J. A.; KOSTROMINOVA, T. Y.; WINEMAN, A. S. Micromechanical modeling of the epimysium of the skeletal muscles. **Journal of Biomechanics**, v. 41, n. 1, p. 1–10, 2008.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; 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.

GESSMANN, R.; KOURTIS, N.; PETRATOS, K.; TAVERNARAKIS, N. Molecular modeling of mechanosensory ion channel structural and functional features. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–7, 2010.

GHOSH, A. K.; MAU, T.; O'BRIEN, M.; GARG, S.; YUNG, R. Impaired autophagy activity is linked to elevated ER-stress and inflammation in aging adipose tissue. **Aging**, v. 8, n. 10, p. 2525–2537, 2016.

GIANAKOPOULOS, P. J.; MEHTA, V.; VORONOVA, A.; et al. MyoD directly up-regulates premyogenic mesoderm factors during induction of skeletal myogenesis in stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 4, p. 2517–2525, 2011.

GIANELO, M. C. S.; POLIZZELO, J. C.; CHESCA, D. Three days of intermittent stretching after muscle disuse alters the proteins involved in force transmission in muscle fibers in weanling rats. , v. 49, p. 1–8, 2016.

GIGO-BENATO, D.; TURI, A. C.; SILVA-COUTO, M. A.; MESSA, S. P.; RUSSO, T. L. INTERMITTENT STRETCHING INDUCES FIBROSIS IN DENERVATED RAT MUSCLE. , , n. January, 2016.

GOLDSPINK, G. SARCOMERE LENGTH DURING POST-NATAL GROWTH OF MAMMALIAN MUSCLE FIBRES. , v. 548, p. 539–548, 1968.

GRANT, S.; AITCHISON, T.; HENDERSON, E.; et al. A comparison of the reproducibility and the sensitivity to change of visual analogue scales, Borg scales, and likert scales in normal subjects during submaximal exercise. **Chest**, v. 116, n. 5, p. 1208–1217, 1999.

GROSBURG, A.; KUO, P.-L.; GUO, C.-L.; et al. Self-Organization of Muscle Cell Structure and Function. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 2, p. e1001088, 2011.

H, T.; W, G. The effect of age on hamstring passive properties after a 10-week stretch training. , p. 1048–1053, 2017.

HENDERSON, R. M.; LOVATO, L.; MILLER, M. E.; et al. Effect of Statin Use on Mobility Disability and its Prevention in At-risk Older Adults: The LIFE Study. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 11, p. 1519–1524, 2016.

HIRATA, K.; KANEHISA, H.; MIYAMOTO, N. Acute effect of static stretching on passive stiffness of the human gastrocnemius fascicle measured by ultrasound shear wave elastography. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 3, p. 493–499, 2017. Springer Berlin Heidelberg.

HUANG, J.; XU, Y.; LI, Z.; et al. Tissue performance of bladder following stretched electrospun silk fibroin matrix and bladder acellular matrix implantation in a rabbit model. , p. 9–16, 2015.

DE JAEGER, D.; JOUMAA, V.; HERZOG, W. Intermittent stretch training of rabbit plantarflexor muscles increases soleus mass and serial sarcomere number. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 12, p. 1467–1473, 2015.

- JHENG, J.-R.; CHEN, Y.-S.; AO, U. I.; et al. The double-edged sword of endoplasmic reticulum stress in uremic sarcopenia through myogenesis perturbation. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, 2018.
- KALINKOVICH, A.; LIVSHITS, G. Sarcopenia - The search for emerging biomarkers. **Ageing Research Reviews**, v. 22, p. 58–71, 2015. Elsevier B.V.
- KAYAMA, T.; MORI, M.; ITO, Y.; et al. Gtf2ird1-Dependent Mohawk Expression Regulates Mechanosensing Properties of the Tendon. **Molecular and Cellular Biology**, v. 36, n. 8, p. 1297–1309, 2016.
- KERRIGAN, D. C.; XENOPOULOS-ODDSSON, A.; SULLIVAN, M. J.; LELAS, J. J.; RILEY, P. O. Effect of a hip flexor[ndash]stretching program on gait in the elderly. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 84, n. 1, p. 1–6, 2003.
- KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: A study in experimentally injured and mdx muscles. **Developmental Biology**, v. 205, n. 1, p. 158–170, 1999.
- 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.
- KONDO, W.; DAL LAGO, E. A.; FRANCISCO, J. C.; et al. Effect of the bone marrow derived-mononuclear stem cells transplantation in the growth, VEGF-R and TNF-alpha expression of endometrial implants in Wistar rats. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 158, n. 2, p. 298–304, 2011. Elsevier Ireland Ltd.
- KONG, F.; GARCÍA, A. J.; MOULD, A. P.; HUMPHRIES, M. J.; ZHU, C. Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. **Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 7, p. 1275–1284, 2009.
- KONG, F.; LI, Z.; PARKS, W. M.; et al. Errata to Cyclic mechanical

reinforcement of integrin-ligand interactions [Molecular Cell 49, (2013) 1060-1068]. **Molecular Cell**, v. 49, n. 6, p. 1176, 2013.

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.

KUROSE, T.; ASAI, Y.; MORI, E.; DAITOKU, D.; KAWAMATA, S. 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.

LARK, S. D.; BUCKLEY, Æ. J. G.; JONES, Æ. D. A.; SARGEANT, A. J. Knee and ankle range of motion during stepping down in elderly compared to young men. , p. 287–295, 2004.

LEMKE, S. B.; SCHNORRER, F. Mechanical forces during muscle development. **Mechanisms of Development**, v. 144, p. 92–101, 2017. The Authors.

LI, E. W.; MCKEE-MUIR, O. C.; GILBERT, P. M. **Cellular Biomechanics in Skeletal Muscle Regeneration**. 1^o ed. Elsevier Inc., 2018.

VAN LOOKE, M.; LYONS, C. G.; SIMMS, C. K. A validated model of passive muscle in compression. **Journal of Biomechanics**, v. 39, n. 16, p. 2999–3009, 2006.

LOPES, T. J. A.; SIMIC, M.; ALVES, D. DE S.; et al. Physical Performance Measures of Flexibility, Hip Strength, Lower Limb Power and Trunk Endurance in Healthy Navy Cadets. **Journal of Strength and Conditioning Research**, p. 1, 2018.

LUSTOSA, L. P.; BATISTA, P. P.; PEREIRA, D. S.; et al. Comparison between parameters of muscle performance and inflammatory biomarkers of non-sarcopenic and sarcopenic elderly women. **Clinical Interventions in Aging**, v. 12, p. 1183–1191, 2017.

- MAHDY, M. A. A. Skeletal muscle fibrosis: an overview. **Cell and Tissue Research**, 2018. Cell and Tissue Research.
- MCKAY, M. J.; BALDWIN, J. N.; FERREIRA, P.; et al. Normative reference values for strength and flexibility of 1 , 000 children and adults. **Neurology**, v. 88, p. 36–43, 2017.
- MEDEIROS, D. M.; LIMA, C. S. Influence of chronic stretching on muscle performance: Systematic review. **Human Movement Science**, v. 54, n. May, p. 220–229, 2017.
- 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, n. September 2017, p. 28–35, 2018.
- MENON, T.; CASAROLLI, L. M.; CUNHA, N. B.; et al. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 segundos a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 6, p. 407–410, 2007.
- MORLEY, J. E.; ANKER, S. D.; VON HAEHLING, S. Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology—update 2014. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 5, n. 4, p. 253–259, 2014.
- MOSER, M.; LEGATE, K. R.; ZENT, R.; FASSLER, R. The tail of integrins, talins, and kindlins. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 895–899, 2009.
- MURPHY, S.; OHLENDIECK, K. The Extracellular Matrix Complexome from Skeletal Muscle. “**Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body**”, 2016.
- NIELSEN, K. B.; LAL, N. N.; SHEARD, P. W. Age-related remodelling of the myotendinous junction in the mouse soleus muscle. **Experimental Gerontology**, v. 104, n. December 2017, p. 52–59, 2018. Elsevier.
- NILWIK, R.; SNIJDERS, T.; LEENDERS, M.; 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. Elsevier B.V.

NORDEZ, A.; GROSS, R.; ANDRADE, R.; et al. Non-Muscular Structures Can Limit the Maximal Joint Range of Motion during Stretching. **Sports Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1925–1929, 2017.

OGAWA, S.; YAKABE, M.; AKISHITA, M. Age-related sarcopenia and its pathophysiological bases. **Inflammation and Regeneration**, v. 36, n. 1, p. 17, 2016. Inflammation and Regeneration.

PALMER, T. B. Journal of Strength and Conditioning Research Publish Ahead of Print DOI: 10.1519/JSC.0000000000002157 1. .

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

POKRYWCZYNSKA, M.; JUNDZILL, A.; BODNAR, M.; et al. Do mesenchymal stem cells modulate the milieu of reconstructed bladder wall? **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 6, p. 483–493, 2013.

QIN, Z.; BLANKENSTEIN, T. Tumor Growth Inhibition Mediated by Lymphotoxin: Evidence of B Lymphocyte Involvement in the Antitumor Response. **Cancer Research**, v. 55, n. 21, p. 4747–4751, 1995.

RAYAGIRI, S. S.; RANALDI, D.; RAVEN, A.; et al. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.

REICHERT-FARIA, A.; JUNG, J. E.; MORESCHI NETO, V.; et al. Reduced immunohistochemical expression of Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) in vitiligo skin. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 8, p. 1057–1059, 2013.

ROBERTS, B. M.; LAVIN, K. M.; MANY, G. M.; et al. Human neuromuscular aging: Sex differences revealed at the myocellular level. **Experimental**

Gerontology, v. 106, p. 116–124, 2018. Elsevier Inc.

RYAN, E. D.; HERDA, T. J.; COSTA, P. B.; HERDA, A. A.; CRAMER, J. T.
Acute effects of passive stretching of the plantarflexor muscles on
neuromuscular function : the influence of age. , 2014.

SAINI, J.; MCPHEE, J. S.; AL-DABBAGH, S.; STEWART, C. E.; AL-SHANTI, N.
Regenerative function of immune system: Modulation of muscle stem cells.
Ageing Research Reviews, v. 27, p. 67–76, 2016. Elsevier B.V.

SAKUMA, K.; AOI, W.; YAMAGUCHI, A. Molecular mechanism of sarcopenia
and cachexia: recent research advances. **Pflugers Archiv European Journal
of Physiology**, v. 469, n. 5–6, p. 573–591, 2017. Pflügers Archiv - European
Journal of Physiology.

SARVER, D. C.; KHARAZ, Y. A.; SUGG, K. B.; et al. Sex differences in tendon
structure and function. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 10, p.
2117–2126, 2017.

SCHAAP, L. A.; PLUIJM, S. M. F.; DEEG, D. J. H.; et al. Higher inflammatory
marker levels in older persons: Associations with 5-year change in muscle mass
and muscle strength. **Journals of Gerontology - Series A Biological
Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 11, p. 1183–1189, 2009.

SCHILLER, H. B.; FÄSSLER, R. Mechanosensitivity and compositional
dynamics of cell-matrix adhesions. **EMBO Reports**, v. 14, n. 6, p. 509–519,
2013. Nature Publishing Group.

SECCHI, K.; MORAIS, C.; CIMATTI, P.; TOKARS, E.; GOMES, A. Efeito do
alongamento e do exercício contra-resistido no músculo esquelético de rato.
Revista Brasileira de Fisioterapia, v. 12, n. 3, p. 228–234, 2008.

SEGOVIA-SILVESTRE, T.; REICHENBACH, V.; FERNÁNDEZ-VARO, G.; et al.
Circulating CO3-610, a degradation product of collagen III, closely reflects liver
collagen and portal pressure in rats with fibrosis. **Fibrogenesis and Tissue
Repair**, v. 4, n. 1, p. 19, 2011. BioMed Central Ltd.

SHARMA, M.; MCFARLANE, C.; KAMBADUR, R.; et al. Myostatin: Expanding horizons. **IUBMB Life**, v. 67, n. 8, p. 589–600, 2015.

SILVA, N. DE A.; PEDRAZA, D. F.; MENEZES, T. N. DE. Desempenho funcional e sua associação com variáveis antropométricas e de composição corporal em idosos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, n. 12, p. 3723–3732, 2015.

SRIRAM, S.; SUBRAMANIAN, S.; SATHIAKUMAR, D.; et al. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- κ B. **Aging Cell**, v. 10, n. 6, p. 931–948, 2011.

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

SUN, Z.; GUO, S. S.; FÄSSLER, R. Integrin-mediated mechanotransduction. **Journal of Cell Biology**, v. 215, n. 4, 2016.

TAYLOR, P.; CADOT, B.; GACHE, V.; GOMES, E. R. Comparative evaluation of the medicinal activities of methanolic extract of seeds, fruit pulps and fresh juice of *Syzygium cumini* in vitro. **Journal of Coastal Life Medicine**, , n. September 2015, 2013.

WALSTON, J. D. Sarcopenia in older adults. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 623–627, 2012.

WELCH, C.; K. HASSAN-SMITH, Z.; A. GREIG, C.; M. LORD, J.; A. JACKSON, T. Acute Sarcopenia Secondary to Hospitalisation - An Emerging Condition Affecting Older Adults. **Aging and Disease**, v. 9, n. 1, p. 151, 2018.

WESSNER, B.; LIEBENSTEINER, M.; NACHBAUER, W.; CSAPO, R. Age-specific response of skeletal muscle extracellular matrix to acute resistance exercise: A pilot study. **European Journal of Sport Science**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2018. Taylor & Francis.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Longitudinal Growth of Striated Muscle

Fibres. **Journal of Cell Science**, v. 9, p. 751–767, 1971.

WOOD, L. K.; KAYUPOV, E.; GUMUCIO, J. P.; et al. Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 4, p. 363–369, 2014.

WORDS, K. Application of Passive Stretch and Its Implications for Muscle Fibers. , v. 81, n. 2, p. 819–827, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Integrated care for older people**. 2017.

YU, H.; CHEN, Y.; KONG, H.; et al. The rat pancreatic body tail as a source of a novel extracellular matrix scaffold for endocrine pancreas bioengineering. **Journal of Biological Engineering**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2018. *Journal of Biological Engineering*.

ZEMBRÓN-ŁACNY, A.; DZIUBEK, W.; ROGOWSKI; SKORUPKA, E.; DABROWSKA, G. Sarcopenia: Monitoring, molecular mechanisms, and physical intervention. **Physiological Research**, v. 63, n. 6, p. 683–691, 2014.

ZOTZ, T. G. G.; LOUREIRO, A. P. C.; VALDERRAMAS, S. R.; GOMES, A. R. S. Stretching—An Important Strategy to Prevent Musculoskeletal Aging. **Topics in Geriatric Rehabilitation**, v. 30, n. 4, p. 246–255, 2014.

ZOTZ TGG. Desenvolvimento de aparato de alongamento e seus efeitos no músculo esquelético de ratas idosas: avaliação histomorfométrica e molecular. Curitiba, Universidade Federal do Estado do Paraná, 2014.

ZOTZ et al., Acute effects of stretching exercise on the soleus muscle of female aged rats. **Acta Histochemica** (2015).

ANEXO 01



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 2015.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 0992/2015 (EMENDA – Inclusão de Pesquisadores)

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos do alongamento no musculo esquelético de ratas idosas: avaliação morfológica e molecular

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Talita Gianello Gnoato Zotz

EQUIPE DE PESQUISA: Talita Gianello Gnoato Zotz, Anna Raquel Silveira Gomes, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, Hilana Ricki Fiuza Martins, Rafael Zotz, Keili Lovison, Ana Paula Cunha Loureiro, José Fernando Baumgartner

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Saúde e Biociências / Fisioterapia / PIBIC / Mestrado / Doutorado

VIGÊNCIA DO PROJETO	10/2015 a 07/2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	66
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratos Wistar)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Fêmeas	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	3 a 26 meses / a partir de 250g	ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Biotério - PUCPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **03.12.2015**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo. Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Lucia Fischer

Coordenadora - Comitê de Ética no Uso de Animais.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil

ANEXO 2



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: 23075.192524/2017-04

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 Gnoato Zotz, Anna Raquel Silveira Gomes, Hilana Rickli Fiuza Martins, Kátia Veiga Massenz, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, Rafael Zotz.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Prevenção e Reabilitação em Fisioterapia

Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA