

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Efeito do exercício de natação prévio na recuperação muscular de
ratas adultas após imobilização articular**

Ana Claudia Petrini

2015

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA CLAUDIA PETRINI

**EFEITO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO
PRÉVIO NA RECUPERAÇÃO MUSCULAR DE
RATAS ADULTAS APÓS IMOBILIZAÇÃO
ARTICULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia, Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica, Linha de pesquisa: Dosimetria e convalidação de recursos fisioterapêuticos,

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Pertille

PIRACICABA

2015

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Carolina Segatto Vianna CRB-8/7617

| | |
|-------|---|
| P496e | <p>Petrini, Ana Claudia Efeito do exercício de natação prévio na recuperação muscular de ratas adultas após imobilização articular / Ana Claudia Petrini. – 2015. 66 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Adriana Pertille. Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Fisioterapia, 2015.</p> <p>1. Natação. 2. Músculos esqueléticos. 3. Fisioterapia. I. Pertille, Adriana. II. Título.</p> <p>CDU – 615.8</p> |
|-------|---|

Por toda motivação e inspiração em cada passo
dessa caminhada, pelo companheirismo e amor
incondicional dedico esse trabalho aos meus
pais e irmã.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por me dar o dom da vida e me guiar na realização de mais um sonho.

Aos meus pais, Agostinho e Cida, pelo constante apoio e paciência; por todo companheirismo durante cada etapa de minha vida; pelo suporte e confiança.

À minha irmã Juliana, pela cumplicidade, paciência e pelo grande exemplo.

Ao meu namorado, Gabriel, por me manter disposta e focada, por toda força, compreensão, apoio e enorme carinho nos melhores e nos mais difíceis momentos dessa jornada.

À Prof^a Dr^a Adriana Pertille, primeiramente pelo exemplo, por toda paciência, dedicação, competência e confiança depositada. Pela imensidão de aprendizado que vão muito além de uma vida acadêmica.

Ao Prof^o Dr^o Carlos Alberto Silva, que prestou preciosas informações ao trabalho; pela contribuição nas várias etapas do protocolo experimental e na minha formação acadêmica.

Aos membros da banca de qualificação, Carlos Alberto Silva e Leonardo dos Reis Silveira, pela disposição, colaboração e imensa contribuição para com o trabalho.

Aos amigos de laboratório e colegas de mestrado, que me permitiram apreender e evoluir ao longo dessa jornada, em especial à Douglas Massoni Ramos pela parceria em cada momento, pela ajuda e companheirismo imprescindíveis na realização de todo o protocolo experimental e coletas.

Agradeço também aos colegas Paulo César Oliveira, Rafaela Ferreira Bertochi, Éder João de Arruda, Paigý Costa, Silvia Belissa Ferrareto, Luana Oliveira, por toda contribuição no desenvolvimento da pesquisa e momentos inesquecíveis no laboratório.

Ao corpo docente do PPG-Ft, primeiramente pelo dom e arte em transmitir conhecimento; pelos grandes exemplos deixados e por cada e todas as belas lições aprendidas.

Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares - CAPES/PROSUP, pela oportunidade, onde pude dar um importante rumo ao meu crescimento científico e profissional.

Agradeço de coração, a todas as pessoas que participaram, contribuindo para realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (,,,) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade a qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein

RESUMO

A imobilização articular é um procedimento terapêutico comum na prática clínica e suas implicações musculoesqueléticas, como a hipotrofia muscular, é conhecida. O exercício físico regular atua de forma sistêmica nos indivíduos, sendo que, características mecânicas e estruturais do músculo esquelético são preservadas em longo prazo após período de treinamento físico. O objetivo do estudo foi verificar a eficácia do exercício de natação previamente à imobilização no processo de recuperação morfológica dos músculos gastrocnêmio fibras brancas e sóleo. Trinta ratas da linhagem Wistar, com oito meses de idade, foram divididas aleatoriamente em seis grupos experimentais: sedentárias (S), mantidas nas gaiolas; sedentárias imobilizadas (SI), mantidas na gaiola por quatro meses e posteriormente imobilizadas por cinco dias; sedentárias imobilizadas/recuperadas (SIR), mantidas nas gaiolas por quatro meses, imobilizadas por cinco dias e recuperadas através da natação; treinadas (T), submetidas ao exercício de natação (treinamento aeróbico) por um período de quatro meses; treinadas imobilizadas (TI), após quatro meses de treinamento foram imobilizadas por cinco dias; e treinadas imobilizadas/recuperadas (TIR), após quatro meses de treinamento, foram imobilizadas por cinco dias e recuperadas através da natação. O treinamento prévio foi realizado três vezes por semana, com duração de 60 minutos, sem incremento de carga. Para a remobilização o treinamento foi realizado cinco vezes por semana, durante 14 dias. A análise da recuperação muscular foi realizada pela Microscopia de Luz e Immunoblotting. Os testes ANOVA One-Way seguido de Tukey e Test T de Student foram utilizados aos dados paramétricos, o teste Kruskal-Wallis e Wilcoxon aos dados não paramétricos. Para o tamanho do efeito foi utilizado o g de Hedges. A massa corporal foi menor nos grupos remobilizados; o peso dos músculos diferiu estatisticamente apenas no sóleo, entre S e T. O grupo T apresentou maior consumo de ração. A análise histológica demonstrou que no músculo gastrocnêmio branco (GB) a porcentagem de tecido conjuntivo (TC) foi significativamente maior para o grupo TIR quando comparado ao SIR; houve redução significativamente estatística na área de secção transversa (AST) no grupo SI e TI, sem recuperação após remobilização. No músculo sóleo (SOL) houve aumento na porcentagem de TC no grupo TI e TIR quando comparado ao T; o valor de TIR foi maior que SIR; não foram observadas alterações na AST no grupo TI quando comparado ao T, e o grupo TIR apresentou AST maior que SIR. Na análise molecular o conteúdo de TGF- β 1 dos grupos no músculo GB foi maior em S; no músculo SOL, maior nos grupos SI e TIR. A quantificação do glicogênio muscular não demonstrou alterações para o músculo GB e no SOL observou-se aumento em TI e TIR comparado ao T, e em TIR quando comparado ao SIR. A medida de Hedges' g apresentou efeito moderado e grande destacando o efeito do treinamento. As respostas ao treinamento prévio foram mais evidentes no sóleo, mostrando-se eficaz na prevenção da hipotrofia nas fibras tipo I em ratas adultas, O conteúdo de TGF- β 1 e glicogênio muscular indicam a capacidade adaptativa do músculo esquelético no treinamento proposto.

Palavras-Chave: músculo esquelético, imobilização, natação, recuperação muscular

ABSTRACT

The joint immobilization is a common therapeutic procedure in clinical practice and its musculoskeletal implications, such as muscular hypertrophy, are known. Regular exercise acts systemically in individuals, thus, structural characteristics are kept in the long term after physical training. The aim of this study was to verify the effectiveness of the swimming exercise prior to immobilization on the morphological recovery process of gastrocnemius white fibers and soleus muscles. 30 Wistar female rats were used, at eight months of age, the animals were randomly divided into six experimental groups: sedentary (S), kept in their cages; immobilized sedentary (IS) kept in their cages for four months and immobilized for five days later; immobilized sedentary/ recovered (ISR), kept in their cages for four months, immobilized for five days and recovered through swimming exercise; trained (T), the rats were subjected to swimming exercise(cardio training) for a period of four months; trained immobilized (TI) after the period of four months of training, they were immobilized for five days; and trained immobilized / recovered (TIR), after a period of four months of training, they were immobilized for five days and recovered through the exercise of swimming. The prior training and swimming remobilization were performed in a rectangular aquarium, measuring one meter long and 45 cm height, three times per week, lasting 60 minutes without load increase. The analysis of muscle recovery was performed by light microscopy and immunoblotting. The one-way ANOVA test followed by Tukey Test and T-Student were used for data with normal distribution, in the non-normally distributed data, we used the Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests. For effect size it was used the g of Hedges. The body mass showed to be smaller in the remobilized groups. The muscle weight differed statistically only in the soleus muscles, between S and T. The T group had higher food intake. Histologic analysis showed that in the gastrocnemius white muscle (GW) the percentage of connective tissue was significantly higher for the TIR group compared to the ISR; there was statistically significant reduction in cross-sectional area (CSA) in the IS and TI groups, without recovery after remobilization, In the soleus muscle (SOL) there was an increase in the percentage of connective tissue in TI and TIR when compared to T; the TIR was higher than ISR; no changes in CSA were observed in the TI group, and the TIR showed to be significantly higher than SIR, No changes were observed in CSA of the TI group, and the TIR group showed higher CSA than the ISR, At the molecular analysis, the content of TGF- β 1 in the muscle groups of GW showed to be higher in S, as for the SOL muscle, higher in groups SI and TIR. Quantitation of muscle glycogen showed no changes for GW muscle; and at the SOL it was observed an increase in TI and TIR compared to the ISR. The hedges' g measurement showed moderate and large effect highlighting the effectiveness of the training. The responses to the prior training were more evident in the soleus muscles, showing to be efficient at preventing hypertrophy in Type I fibers in adult rats. The content of TGF- β 1 and muscle glycogen demonstrate the adaptive capacity of the skeletal muscle at the proposed training.

Keywords: skeletal muscle, immobilization, swimming, muscle recovery

LISTA DE ABREVIATURAS

AST – Área de secção transversa

° C – Graus Celsius

CEUA - Comissão de Ética sobre o Uso de Animais

GB – Músculo gastrocnêmio branco

GLUT – Proteína transportadora de glicose

HE – Hematoxilina heosina

IGF – Fator de crescimento similar a insulina

Kg – Kilograma

Mg – Miligrama

PBS – Tampão fosfato

SOL – Músculo sóleo

S – Sedentárias

SI – Sedentárias imobilizadas

SIR – Sedentárias imobilizadas recuperadas

T – Treinadas

TI – Treinadas imobilizadas

TIR – Treinadas imobilizadas recuperadas

TC – Tecido conjuntivo

TGF-β1 - Transforming growth factor beta

μm² - Micrometro quadrado

UNIMEP – Universidade Metodista de Piracicaba

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. OBJETIVO | 19 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos | 19 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 Grupos Experimentais:..... | 20 |
| 3.2 Procedimentos de Treinamento dos Animais | 22 |
| 3.3 Dados coletados durante o treinamento..... | 23 |
| 3.4 Procedimento de Imobilização | 24 |
| 3.5 Procedimentos de Remobilização com Natação | 25 |
| 3.6 Eutanásia dos animais..... | 26 |
| 3.7 Análises Histológicas | 27 |
| 3.8 Técnicas de Immunoblotting | 28 |
| 3.9 Análises dos resultados | 30 |
| 3.10 Quantificações do Glicogênio Muscular | 30 |
| 3.11 Análise Estatística..... | 31 |
| 4. RESULTADOS | 33 |
| 4.1. Massa corporal e peso muscular..... | 33 |
| 4.2. Consumo alimentar e hídrico..... | 34 |
| 4.3 Quantificação de tecido conjuntivo | 35 |
| 4.4 AST..... | 38 |
| 4.5 Quantificação da citocina TGF- β 1 | 43 |
| 4.6 Quantificação do glicogênio muscular | 45 |
| 5. DISCUSSÃO | 47 |
| 6. CONCLUSÃO | 57 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| ANEXO | 66 |

1. INTRODUÇÃO

Dentre os tecidos biológicos do corpo humano, o músculo esquelético possui propriedades importantes de adaptações às diferentes demandas funcionais, com rica capacidade intrínseca de alterar suas características por meio de modificações em suas estruturas celulares (Michael, 2000; Capitano et al., 2006). Segundo Santos-Júnior et al. (2010) a plasticidade funcional muscular é caracterizada pela capacidade de se adaptar a um determinado estímulo. Assim, os exercícios físicos, bem como, o desuso muscular, são estímulos diferentes capazes de gerar alterações importantes ao tecido muscular.

O desuso muscular ocorre em resposta às diversas situações no processo de reabilitação clínica, como na imobilização articular, procedimento terapêutico frequentemente adotado em condições patológicas, ortopédicas e traumatológicas (Kannus et al., 1998; Lima et al., 2007; Chingui et al., 2008). Estudos indicam que após 48 horas de imobilização o músculo esquelético já desenvolve atrofia (Carvalho et al., 2009; Kodama et al., 2012) e que, à partir do quarto dia de imobilização, perdas estruturais são facilmente notáveis (Booth, 1977; Appel, 1986b; Vazeille e Codran, 2008).

Lima et al. (2007) avaliaram as características morfométricas e mecânicas do músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos submetidos a imobilização pelo período equivalente a sete dias. Os dados permitiram concluir que o período de imobilização proposto foi capaz de produzir adaptações nos sarcômeros, bem como, alterações relevantes na morfologia e na mecânica dos músculos avaliados.

Além da atrofia/hipotrofia, outros efeitos deletérios, como a proliferação do tecido conjuntivo (TC) intramuscular, perda de extensibilidade, menor resistência

de ligamentos e tendões, a redução em tamanho e número de mitocôndrias, redução das reservas de glicogênio, da síntese proteica, da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série e da força muscular são notados após a imobilização articular (Kannus et al., 1992; Lima et al., 2007; Chingui et al., 2008). A redução da síntese proteica e o conseqüente aumento na degradação de proteínas musculares favorecem o processo de atrofia (Wall, Dirks e Van Loon, 2013), relatos indicam que seis horas após o início da imobilização essa redução já representa 37% (Williams et al., 1988; Kodama et al., 2012).

É conhecido que as fibras musculares do músculo estriado esquelético podem ser representadas em três principais grupos: as fibras de contração lenta, oxidativa, classificadas como fibras vermelhas, tipo I; as fibras de contração intermediária, glicolítica e oxidativa, classificadas como fibras brancas, tipo IIA e as fibras de contração rápida, glicolítica, classificadas como fibras brancas, tipo IIB (Berne, Levy e Koeppen, 2004; Minamoto, 2005).

Ambas as fibras musculares, rápidas e lentas, estão vulneráveis a mudanças em seu trofismo. Entretanto, há divergências na literatura com relação ao comportamento dessas fibras mediante a imobilização, evidenciando-se diferentes graus de susceptibilidade à hipotrofia (Nascimento et al., 2008).

Jaffe, Terry e Spiro (1978) evidenciaram que as fibras musculares brancas (tipo II) são as mais comprometidas durante a imobilização. Em contrapartida, estudos mais recentes, como o de Tanaka, Kariya e Hoshino (2004) observaram que fibras lentas oxidativas (tipo I) sentem de forma mais deletéria os efeitos do desuso, corroborando com os resultados de Lima et al. (2007) que ao comparar os dados das fibras de contração lenta e rápida após a imobilização, destacam que os efeitos deletérios são mais nítidos nas fibras de contração lenta.

Dessa forma, achados consensuais na literatura no que diz respeito ao comportamento do tipo de fibra muscular mediante a imobilização salientam que as fibras tipo I, ou seja, as fibras lentas são mais vulneráveis a hipotrofia, em virtude do perfil metabólico oxidativo e de suas características antigravitacionais de músculos posturais ou tônicos (Lieber, 2002; Minamoto, 2005).

O processo de hipotrofia poderá depender, ainda, do posicionamento muscular na imobilização articular. Estudos destacam que a imobilização em posição encurtada predispõe a redução no número de sarcômeros em séries e rápida atrofia (Appell, 1986b; Kim, Kwon e Kim M, 2007); em posição alongada, favorece o aumento nas unidades de sarcômeros em séries (Volpi et al., 2008), e, por outro lado, em posição neutra observa-se atrofia moderada ou ausente e maior depósito de TC (Jarvinen, Einola e Virtanen 1992; Volpi et al., 2008).

Outra situação, de etiologia temporal, que predispõe o músculo esquelético a modificações estruturais é o processo de envelhecimento. Pedrinelli, Garcez-Leme e Nobre (2009) em um artigo de revisão da literatura relatam que aos 30 anos de idade, mesmo em indivíduos atletas, a perda da massa muscular é iniciada, com crescente aumento por volta dos 50 anos.

No processo de envelhecimento, é comumente observada a diminuição da força e massa muscular e também a mudança na tipagem de fibras musculares em direção ao tipo I (Lieber, 2002; Minamoto, 2005; Bar-Shaiet al., 2008). Nesse sentido, vários fatores são apontados como contribuintes para a redução da força, massa muscular e o predomínio de fibras lentas no tecido envelhecido. Dentre eles, destacam-se o aumento no estresse oxidativo (Bar-Shaiet al., 2008; Johnston, De Lisio e Parise, 2008) e a redução progressiva de atividades que

exijam força muscular, que contribui para o decréscimo das unidades motoras de fibras rápidas, tipo II (Minamoto, 2005).

Além disso, o declínio no número de motoneurônios alfa que ocorre durante esse processo, com conseqüente redução na quantidade de unidades motoras disponíveis, implica em uma inervação inadequada da musculatura, principalmente para as fibras tipo II. Embora possa haver a reinervação por neurônios motores subjacentes, as alterações advindas desse fato resultam, geralmente, em atrofia seletiva das fibras musculares, contribuindo para a diminuição da área de secção transversa (AST) do músculo esquelético estriado (Davini e Nunes, 2003; Degens, 2007).

Nilwik et al. (2013) em estudo realizado com humanos avaliaram, por meio de biópsia e técnica de imunohistoquímica, se as diferenças na AST do músculo quadríceps entre homens jovens (23 ± 1 anos) e idosos (71 ± 1 anos) são atribuídas ao tamanho da fibra muscular. Foram realizadas medidas iniciais e após seis meses de treinamento resistido, realizado três vezes na semana. Os resultados demonstraram que AST foi 14% menor e o tamanho da fibra muscular tipo II foi 29% menor nos idosos quando comparados aos jovens. Concluíram que o declínio da massa muscular esquelética no envelhecimento é atribuído, principalmente, à redução no tamanho das fibras musculares do tipo II.

Wall, Dirks e Van Loon (2013) salientam que as alterações metabólicas e funcionais no processo de envelhecimento podem aumentar o índice de patologias, fraturas, quedas e induzir os indivíduos a períodos curtos de inatividade, que, ocorrendo de forma sucessiva podem influenciar diretamente no desenvolvimento da sarcopenia relacionada com a idade.

Nesse sentido, a atividade física é considerada potencialmente capaz de minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento (Degens, 2007) e da imobilização (Kannus et al., 1992). Sabe-se que a atividade física prolongada proporciona ao indivíduo diversas alterações, como as adaptações observadas nos sistemas cardiovascular e neuromuscular (Davini e Nunes, 2003). Portanto, a prática de exercício físico regular torna-se uma importante aliada para a saúde física, minimizando fatores de risco e impactando na melhora da qualidade de vida, principalmente no decorrer do processo de envelhecimento (OMS, 2006).

A fim de melhorar a aptidão cardiorrespiratória e muscular, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda para adultos com idade entre 18-64 anos a atividade física aeróbica, de intensidade moderada, ao menos 150 minutos durante a semana, ou, ao menos 75 minutos de atividade física aeróbica, com intensidade vigorosa durante a semana, ou, uma combinação equivalente de atividade moderada e vigorosa (WHO, 2011).

Os exercícios físicos são, de maneira geral, classificados em duas categorias: exercícios de resistência (aeróbico) que aumentam a resistência à fadiga e podem ser realizados em piscinas, bicicletas, pistas, dentre outras; e exercícios de força (anaeróbico), que aumentam a força muscular e necessitam de uma força de oposição (Davini e Nunes, 2003; Silva, Melo e Oliveira, 2007).

Relatos indicam que o treinamento muscular de força (anaeróbico), que induz a hipertrofia, resguarda as características estruturais e mecânicas do músculo esquelético em longo prazo após período de desuso, por meio da preservação dos novos núcleos celulares que são desenvolvidos no tecido muscular durante o período de treinamento (Bruusgaard et al., 2010). Logo, o

treinamento físico prévio com carga pode ter influência na recuperação muscular após período de inatividade (Nascimento et al., 2008).

Com relação ao treinamento físico de resistência (aeróbico) a literatura traz que, quando realizado de forma regular, favorece a resposta celular do músculo esquelético, contribuindo para uma vascularização aumentada, com melhora na densidade capilar e principalmente na relação capilar por fibra (Adolfsson et al., 1986), sendo o TGF- β (*transforming growth factor beta*) um potente estimulador da angiogênese (Orlova et al., 2011), além de regular outros processos fisiológicos, como desenvolvimento, diferenciação e apoptose celular (Barnard et al., 1990). A manutenção da capacidade aeróbica, por meio do exercício de resistência, pode favorecer o aumento na AST das fibras musculares (Suominen, 2007).

Frente às características morfológicas, bioquímicas e funcionais da fibra muscular observadas após o desuso, diversas propostas na literatura visam minimizar os efeitos deletérios ou acelerar a recuperação funcional pós-imobilização, sendo a remobilização por intermédio do exercício físico uma forma eficaz na recuperação do dano causado pelo período de inatividade (Appell, 1986b; Kannus et al., 1998; Kodama et al., 2012).

Entretanto, a maior parte dos estudos tem por objetivo verificar a efetividade dos recursos terapêuticos na recuperação tecidual pós-imobilização, ações direcionadas à prevenção das alterações morfológicas e funcionais advindas da imobilização são pouco exploradas (Milani et al., 2008; Nascimento et al., 2008).

Nascimento et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de verificar se o exercício físico prévio a imobilização facilita o processo de recuperação morfológica induzida pela reabilitação nos músculos tibial anterior e sóleo. As

ratas foram treinadas com a natação, cinco vezes por semana, 60 minutos por sessão, com incremento de carga progressiva até 8% da massa corporal, durante seis semanas consecutivas. Após o período de imobilização correspondente a sete dias, os grupos foram recuperados por intermédio de sessões de natação, cinco dias por semana, sem acréscimo de carga, totalizando dez sessões. Frente aos resultados concluiu-se que o treinamento prévio de natação não minimizou os efeitos deletérios da imobilização.

Milani et al. (2008) compararam os efeitos biomecânicos da imobilização e remobilização no músculo esquelético de ratas treinadas e sedentárias. O treinamento foi realizado com natação, em sessões de 60 minutos, cinco vezes por semana, com incremento de carga progressiva até 8% da massa corporal, por um período equivalente há seis semanas. O período de imobilização foi equivalente há sete dias. Os autores observaram que o grupo sujeito ao treinamento prévio à imobilização apresentou efeito positivo sobre o comportamento mecânico do músculo gastrocnêmio após remobilização de duas semanas, por natação, sem acréscimo de carga, quando comparado ao grupo sedentário.

Vale ressaltar que Nascimento et al. (2008) em concordância com Peijie et al. (2004) descrevem que o acoplamento de peso externo equivalente a partir de 6% da massa corporal de modelos experimentais durante o exercício de natação é considerado como atividade física de alta intensidade.

Recentemente Artifon et al. (2013) avaliaram em ratos jovens os efeitos de um treinamento aeróbico (natação), cinco vezes por semana, com diferentes tempos das sessões: um grupo com o tempo de dez minutos de atividade, caracterizando um exercício físico regular e outro com 60 minutos de atividade,

caracterizando uma atividade aeróbica progressiva, durante seis semanas consecutivas previamente ao procedimento experimental de ciatalgia, por compressão nervosa. Os resultados das análises histológicas do músculo sóleo indicaram que tanto o exercício físico regular quanto o treinamento aeróbico não produziram efeitos preventivos às consequências musculares da inatividade funcional.

Diante da necessidade de entendimento do fisioterapeuta sobre os aspectos inerentes a recuperação funcional após episódios de imobilização, bem como aos efeitos fisiológicos do processo de envelhecimento, este estudo propôs analisar a influência do treinamento de natação (aeróbico) em longo prazo, sem carga em ratas sobre os efeitos deletérios do desuso muscular e sua respectiva recuperação.

A prática clínica exige um preparo do fisioterapeuta com relação à variedade de recursos disponíveis, considerando suas aplicabilidades e efetividades. Posto isto, o presente estudo visou prover conhecimento científico relativo ao comportamento muscular perante a imobilização em curto prazo e remobilização, que representa uma conduta terapêutica habitual da prática clínica.

Ao considerar os efeitos deletérios da imobilização articular, do processo de envelhecimento e a existência de alterações celulares providas da prática de exercício físico de resistência (aeróbico) regular, a hipótese do trabalho é que esse tipo de treinamento físico, em longo prazo realizado previamente a imobilização, pode atuar minimizando os efeitos deletérios do desuso e favorecendo a recuperação muscular pós-imobilização.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Foi verificar a eficácia do exercício de natação prévio à imobilização no processo de recuperação morfológica dos músculos gastrocnêmio fibras brancas e sóleo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do treinamento de natação, três vezes na semana, prolongado e sem carga;
- Analisar os efeitos da imobilização por cinco dias sobre o sistema muscular em animais sedentários e treinados;
- Avaliar a eficácia do tratamento de remobilização com exercício de natação por quatorze dias após a retirada da órtese de imobilização entre os animais sedentários e treinados;
- Analisar morfometricamente a recuperação muscular, por meio da AST e percentual de TC;
- Analisar o conteúdo da citocina TGF- β 1 e a concentração de glicogênio muscular nos animais sedentários e treinados, submetidos a imobilização e remobilização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 30 ratas da linhagem *Wistar*, com idade de oito meses. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UNIMEP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum*.

Foram alocados 4 animais em gaiolas de polietileno de tamanho grande. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética sobre o Uso de Animais (CEUA) da UNIMEP sob protocolo 09/13 (anexo).

3.1 Grupos Experimentais:

Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos: Sedentárias (S, $n=15$) e Treinadas (T, $n=15$). Em seguida, esses grupos foram subdivididos, como observado na figura 1.

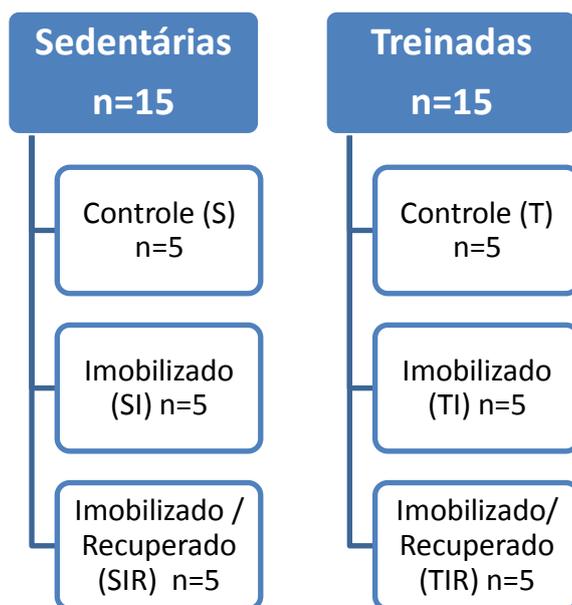


Figura 1 - Divisão dos grupos experimentais

As ratas pertencentes ao grupo Sedentárias foram divididas em três subgrupos:

- S = grupo controle, em que as ratas foram mantidas nas gaiolas por quatro meses;
- SI = grupo sedentárias imobilizadas, em que, as ratas após um período de quatro meses mantidas nas gaiolas permaneceram imobilizadas por um período de cinco dias e, posteriormente, foram eutanasiadas;
- SIR = grupo sedentárias imobilizadas / recuperadas, em que, as ratas após um período de quatro meses mantidas nas gaiolas permaneceram imobilizadas por um período de cinco dias e, posteriormente, foram recuperadas por meio do exercício de natação.

As ratas pertencentes ao grupo Treinadas também foram divididas em três subgrupos:

- T = grupo controle, em que as ratas realizaram o exercício de natação por um período de quatro meses;
- TI = grupo treinadas imobilizadas, em que, as ratas após um período de quatro meses de treinamento, permaneceram imobilizadas por um período de cinco dias e, posteriormente, foram eutanasiadas;
- TIR = grupo treinadas imobilizadas / recuperadas, em que, as ratas após um período de quatro meses de treinamento, permaneceram imobilizadas por um período de cinco dias e, posteriormente, foram recuperadas por meio do exercício de natação.

3.2 Procedimentos de Treinamento dos Animais

Os animais foram submetidos ao exercício de natação, com duração de 60 minutos contínuos por sessão, na frequência de três vezes por semana, caracterizando um exercício aeróbico (Rogatto e Luciano, 2001). Inicialmente os grupos treinados realizaram dez minutos de atividade, com acréscimo de cinco minutos por sessão, até totalizar os 60 minutos pré-estabelecidos. As sessões foram realizadas em dias intercalados (segunda, quarta e sexta-feira) com descanso aos finais de semana.

O treinamento foi realizado em um aquário, de forma retangular, com 1 metro de comprimento e 45 cm de altura, alocado no laboratório de pesquisa Plasticidade Neuromuscular do Mestrado em Fisioterapia, com sistema de aquecimento térmico e de drenagem de água para troca da mesma conforme necessário. A temperatura da água foi controlada por meio de um termômetro, a fim de mantê-la em $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 2).

Segundo Van Meeteran et al. (1997) os animais tendem a nadar por um período equivalente a cinco/dez minutos, e, posteriormente, se mantêm em flutuação constante, apenas com a cabeça fora da água. Posto isto, os animais foram estimulados durante todas as sessões, pela turbulência na água, realizada por meio da agitação manual e de um bastão de plástico, a fim de exigir maior controle do animal no decorrer do exercício (Figura 2).

Não houve acréscimo de carga durante o período de treinamento. As sessões foram realizadas no período vespertino e ao término os animais eram secados com jato de ar quente e em seguida recolocados nas gaiolas.

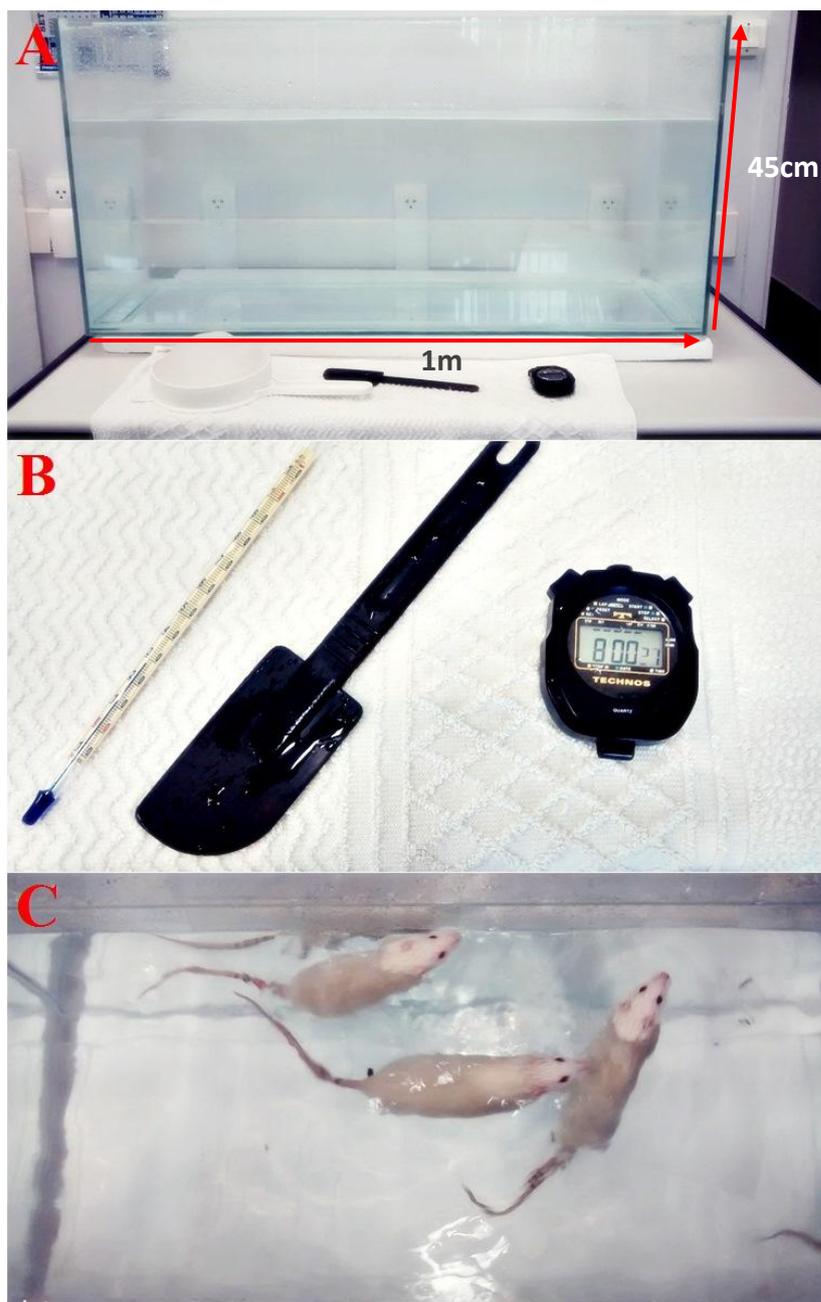


Figura 2 – Sessões de natação dos animais. (A) aquário retangular (1m x 45 cm); (B) termômetro, bastão de plástico para a turbulência durante as sessões e cronômetro para controle do tempo das sessões; (C) ratas realizando o protocolo de natação proposto.

3.3 Dados coletados durante o treinamento

No decorrer dos quatro meses de treinamento dos animais foram realizadas as seguintes análises:

- **Quantificação do consumo alimentar e hídrico:** A cada três dias cada caixa com quatro ratas recebia 450 gramas de ração e 700 ml de água. Ao final do terceiro dia, a ração restante era pesada (balança digital, GEHAKA, BG 1000), calculando o consumo alimentar proporcional por animal. O controle hídrico foi calculado por meio de uma proveta, a fim de verificar o volume consumido em cada caixa.
- **Pesagem dos animais:** O peso da massa corporal dos animais foi acompanhado por meio de avaliações quinzenais, utilizando uma balança digital (GEHAKA, BG 1000), alocada no laboratório de pesquisa do Mestrado em Fisioterapia.

3.4 Procedimento de Imobilização

O modelo de imobilização adotado para o presente estudo seguiu a proposta de Silva et al. (2006) fundamentada na proximidade com relação às imobilizações articulares em humanos.

Para início do procedimento os animais foram anestesiados (Ketalar®, 50 mg/mL, e Rompun®, 2 g/100mL, na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal), logo após sinais de anestesia, a pata posterior esquerda de cada animal foi imobilizada com órtese de resina acrílica, com peso aproximadamente de 22 g associado a uma cinta de PVC ligada por rotadores laterais, conforme ilustrado na figura 3.

O modelo de imobilização não influencia na liberdade de movimentação nas articulações do joelho e quadril, o que, de fato, não restringe a deambulação e descarga de peso do animal. A órtese, depois de colocada, mantém a pata na posição encurtada. Os grupos permaneceram imobilizados pelo período de cinco dias.



Figura 3 – Adaptação da órtese no membro posterior do animal, segundo Silva et al. (2006). (A) modelo de órtese que não interfere na deambulação e permite a descarga de peso no membro imobilizado; (B) modelo de órtese adaptada ao animal.

3.5 Procedimentos de Remobilização com Natação

Os animais do grupo SIR foram, em um período de duas semanas antecedendo a imobilização, adaptados e familiarizados ao meio aquático, permanecendo dez minutos no aquário no primeiro dia, com acréscimo de dez minutos por mais dois dias, totalizando 30 minutos (Dalia et al., 2011). Dessa forma, evita-se a interferência por estresse do animal nas sessões pós-imobilização.

Após o protocolo de imobilização, as ratas dos grupos SIR e TIR foram recuperadas por intermédio de sessões de natação, sendo a primeira sessão realizada 24 horas após a retirada da órtese e as sessões subsequentes realizadas cinco vezes semanais, com duração de 60 minutos, sem acréscimo de carga, durante o período de 14 dias, seguindo o protocolo proposto por Nascimento et al. (2008). Houve um período de 24 horas entre uma sessão e outra, realizadas no período vespertino.

As sessões aconteceram no mesmo aquário utilizado no treinamento prévio, com sistema de aquecimento térmico e de drenagem de água, para a troca da mesma conforme necessário. Após o término do treinamento, os animais foram secados com jato de ar quente e recolocados nas gaiolas.

3.6 Eutanásia dos animais

Ao término do protocolo experimental, os animais já com 12 meses, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2 g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal.

Após sinais de anestesia geral, os animais foram perfundidos com PBS (perfusão cardíaca) e os músculos Gastrocnêmio Branco (GB), predominância de fibras do tipo II (brancas) e o Sóleo (SOL), predominância de fibras do tipo I (vermelhas) esquerdo retirados, pesados e divididos em três partes iguais, sendo uma parte destinada à técnica de microscopia de luz, outra destinada à técnica de immunoblotting e a última destinada à quantificação do glicogênio muscular.

Os animais dos grupos T, TIR e SIR foram sacrificados 24 horas após a última sessão de treinamento, já, os animais dos grupos imobilizados (SI e TI) foram eutanasiados imediatamente a retirada da órtese.

3.7 Análises Histológicas

Partes dos músculos GB e SOL de cada animal foram fixadas em suporte de madeira com *tragacanth gum*, imerso em isopentano à -80° C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -195° C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70° C.

Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até que atingiram a temperatura de -23° C, e seccionados transversalmente utilizando um criostato (modelo HYRAX C 25 - Zeiss). Cortes transversais seriados com espessura variando entre 8 e 12 µm foram coletados para:

- **Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE):** Para análise da AST das fibras musculares. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina segundo a rotina do laboratório, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.
- **Coloração por Tricrômico de Masson:** Para marcação de TC. Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, lavados em água corrente e imersas em solução de Masson (0,7g de PonceauFucsina, 0,03g de Fucsina ácida, 0,7g de Orange G e 100ml de solução de ácido acético

0,2%), banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e mergulhadas em solução de verde-luz, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

3.8 Técnicas de Immunoblotting

- **Preparação de Extrato Total:** a outra parte dos músculos foi cortada em pequenos pedaços e homogeneizada em tampão específico, com volume variando entre 600 a 1000 μ L, a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; BrinkmannInstruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total.
- **Eletroforese:** As amostras dos extratos protéicos foram tratadas com tampão Laemmli, acrescido de ditioneitol 100 mM e aquecidas a banho seco por 5 minutos. Em seguida, 50 μ g de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 15% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-RadLaboratories, Richmond, CA, EUA). Foram obtidos três extratos proteicos por grupo, resultando em 12 géis. A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 v (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal contendo 3% de leite desnatado, por 1 hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10 μ g de anticorpo primário diluído em 10 mL de solução basal contendo 1% de leite desnatado

a 4° C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10 mL de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5 µg de anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Pierce) por cinco minutos e, em seguida, o sinal fluorescente foi captado no equipamento G-Box (GeneSys). Após obtenção de bandas, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7,5; β -Mercaptoethanol 0,1M; Uréia 8M) durante 1h, à 60° C. Posteriormente as membranas foram incubadas em Tris-HCl 1M pH 7,5 por 30 min para neutralizar o *stripping*, lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato de hidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes condições fisiológicas. As bandas marcadas com GAPDH foram utilizadas para normalização das bandas do TGF- β 1.

- **Anticorpos**

- Anticorpo Primário**

- TGF- β 1, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039;
 - Gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (GADPH), mouse monoclonal, Santa Cruz, sc59540.

- Anticorpos Secundários**

- Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005

3.9 Análises dos resultados

Para a análise da AST foram utilizados dois cortes aleatórios por lâmina, sendo uma lâmina para cada animal, onde foram contadas aproximadamente 250 fibras por animal de cada músculo. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 20x e conectado a um computador com software *Image Pro-Plus*[®] 6.0 (Media Cybernetics).

A mensuração da quantidade de TC, nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson foi realizada por meio do software *Image Pro-Express* com imagens adquiridas através de vídeo câmera (Nikon Express Series), acopladas ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400) com objetiva de 20x.

Foram analisadas seis imagens por animal, e, sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 540 intersecções, onde foram contabilizadas aquelas que se sobrepunham sobre TC e posteriormente transformadas em porcentagem (%).

As bandas imunorreativas observadas na técnica de *immunoblotting* foram digitalizadas e salvas em discos de computador para posterior quantificação da densitometria óptica, usando o programa Image J[®] (*The National Institute of Health*, EUA).

3.10 Quantificações do Glicogênio Muscular

Para a determinação do glicogênio muscular, as amostras foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol.

O glicogênio precipitado submetido à hidrólise ácida na presença de fenol conforme proposto pelo método do fenol sulfúrico descrito de Siu, Russeau e Taylor (1970). Os valores foram expressos em mg/100 gr de peso úmido.

3.11 Análise Estatística

A análise estatística contou com o pacote estatístico “*Bioestat versão 5.9*”. Inicialmente, o teste estatístico Shapiro Wilk foi aplicado para a verificação da normalidade dos dados.

Assim sendo, para as comparações entre três grupos o teste Anova One-Way seguido do pós-teste de Tukey foi aplicado aos dados com distribuição paramétrica e o teste Kruskal-Wallis aos dados com distribuição não paramétrica.

Para as análises comparativas entre dois grupos, foi processado o teste T de Student para amostras independentes aos dados paramétricos e o teste Wilcoxon aos dados não paramétricos. Em todos os casos, foi adotado um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

A fim de complementar a interpretação da importância dos resultados obtidos, foi realizada a análise do tamanho do efeito (*effect size*) por meio do aplicativo “*Effect Size Generator*”, versão 2.3 (*Swinburne University of Technology, Center for Neuropsychology, Melbourne, Australia*).

Diversas propostas para este tipo de análise são descritas, dentre elas d de Cohen, g de Hedges e D de Glass. No presente estudo optou-se pela medida de g de Hedges que é recomendada para pequenas amostras (Lipsey e Wilson, 1993; Durlak, 2009). A medida de Hedges' g é uma variação da d de Cohen que corrige desvios devido ao pequeno tamanho da amostra e é calculada da seguinte forma (Durlak, 2009),

$$g = \frac{M_E - M_C}{SD \text{ pooled}} \times \left(\frac{N - 3}{N - 2.25} \right) \times \sqrt{\frac{N - 2}{N}}$$

onde M é igual à média, no qual E e C se referem à experimental e controle, respectivamente; SD pooled é o desvio padrão ajustado; N se refere ao tamanho total da amostra.

Os pontos de corte para interpretação dos resultados foram seguidos conforme proposta de Lipsey e Wilson (1993), que assumem o tamanho do efeito de 0 - 0,32 como pequeno; 0,33 – 0,55 como efeito moderado e 0,56 – 1,2 ou superior como efeito grande.

Segundo Lindenau e Guimarães (p, 376, 2012) “[...] quanto maior o tamanho do efeito, maior é o impacto que a variável central do experimento esta causando [...]”.

4. RESULTADOS

4.1. Massa corporal e peso muscular

O peso corporal dos grupos sedentários diferiu estatisticamente entre SI e SIR, sendo menor no grupo SIR. Nas comparações entre os grupos treinados o valor de TI foi estatisticamente significativo maior que T e TIR (Tabela 1).

Por vez, nas análises comparativas entre os grupos sedentários e treinados não foram verificadas diferenças estatísticas significativas.

O peso do músculo sóleo apresentou diferença estatística significativa entre os grupos S e T, sendo maior no grupo T (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão do peso corporal; do peso dos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL) em miligramas (mg), de todos os grupos estudados, sendo S: controle sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas.

| Grupos | Peso Corporal (g) | GB (g) | SOL (g) |
|--------|-------------------|--------------|---------------|
| S | 295,3± 9,1 | 0, 417±0,07 | 0, 135±0,02 + |
| SI | 323,09± 24,6* | 0, 412±0,01 | 0, 132±0,03 |
| SIR | 274,59± 13,0 | 0, 363±0,03 | 0, 121±0,02 |
| T | 304,13±21,1# | 0, 459±0,28 | 0, 172±0,01 |
| TI | 345,73±16,7 | 0, 426±0,11 | 0, 157±0,03 |
| TIR | 294,55 ± 30,8# | 0,3 81± 0,06 | 0, 148±0,03 |

* difere do grupo SIR; # difere do grupo TI; + difere do grupo T.

Sendo o treinamento aeróbico (natação) a intervenção terapêutica central proposta no presente estudo, com o intuito de complementar a análise estatística, foi realizado o cálculo do tamanho/magnitude do efeito (*effect size*) nas comparações dos dados entre os grupos sedentários e treinados em todas as etapas do protocolo experimental (S x T; SI x TI; SIR x TIR).

Assim sendo, no que concerne ao peso corporal à medida de Hedges' g aponta um efeito moderado em todas as comparações (Tabela 2), observando-se maior peso corporal nos grupos treinados.

Com relação ao peso dos músculos, para o GB observou-se efeito grande apenas entre os grupos SI e TI. Já no músculo SOL, observou-se efeito grande em todas as comparações, indicando que o treinamento contribuiu para maior peso dos músculos quando comparado ao sedentário (Tabela 2).

Tabela 2 – Tamanho do efeito pela medida de Hedges' g para a massa corporal e peso dos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL) nas análises comparativas entre os grupos, sendo S: controle sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas

| Análise | Hedges' g Peso Corporal | Hedges' g GB | Hedges' g SOL |
|-----------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| S x T | 0,49 ⁺ | 0,18 [*] | 2,11 [#] |
| SI x TI | 0,54 ⁺ | 0,57 [#] | 0,75 [#] |
| SIR x TIR | 0,43 ⁺ | 0,34 ⁺ | 0,95 [#] |

efeito grande; + efeito moderado; * efeito pequeno

4.2. Consumo alimentar e hídrico

Os resultados demonstram que o consumo alimentar foi estatisticamente significativo sendo maior para as ratas do grupo T; o consumo hídrico foi estatisticamente semelhante entre os grupos. A medida de Hedges' g indica efeito grande entre as duas variáveis (Tabela 3).

Tabela 3 - Média, desvio padrão, valor de p e medida de Hedges' g da quantidade ingerida de ração e água nos grupos controle sedentárias (S) e controle treinadas (T)

| | S | T | p | Hedges' g |
|------------------|--------------|---------------|----------|-------------------|
| RAÇÃO (g) | 203,42±23,72 | 231,38±40,53* | 0,02 | 0,81 [#] |
| ÁGUA (mL) | 218,18±55,73 | 221,93±84,18 | 0,90 | 0,81 [#] |

* difere do grupo S; # efeito grande

4.3 Quantificação do TC

A quantificação de TC referentes às ratas sedentárias demonstra que no músculo GB não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos. Nas comparações entre as ratas treinadas houve diferença estatística significativa somente entre os grupos TI e TIR, sendo o valor do último maior.

Nas análises comparativas entre as ratas sedentárias e treinadas, observou-se que, os grupos S e T obtiveram valores similares; o grupo SI obteve um valor estatisticamente significativo maior quando comparado ao TI; e, de forma oposta, o grupo SIR obteve redução na porcentagem de TC quando comparado ao TIR (Figura 4).

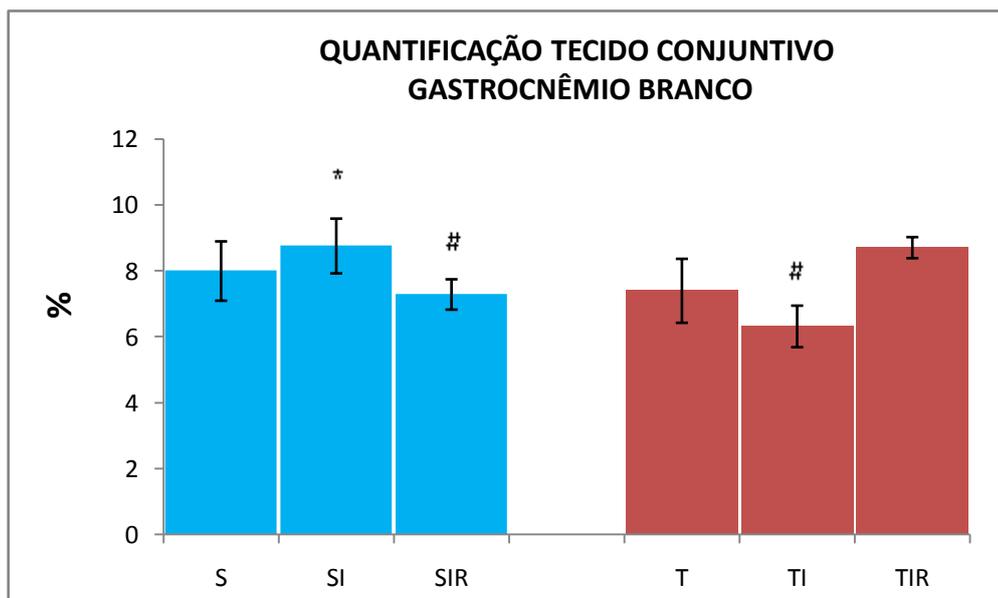


Figura 4 - Porcentagem de tecido conjuntivo do músculo gastrocnêmio branco nos grupos analisados. S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas; * difere do grupo TI; # difere do grupo TIR.

Ao analisar a quantificação de TC no músculo SOL observa-se que para ratas sedentárias não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Com relação às comparações entre as ratas treinadas, o grupo T apresentou porcentagem significativamente estatística menor com relação ao grupo TI e TIR.

As comparações as ratas sedentárias e treinadas demonstram que os valores dos grupos S e T, bem como, SI e TI foram similares; e, por fim, o grupo SIR obteve uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de TC quando comparado ao TIR (Figura 5)

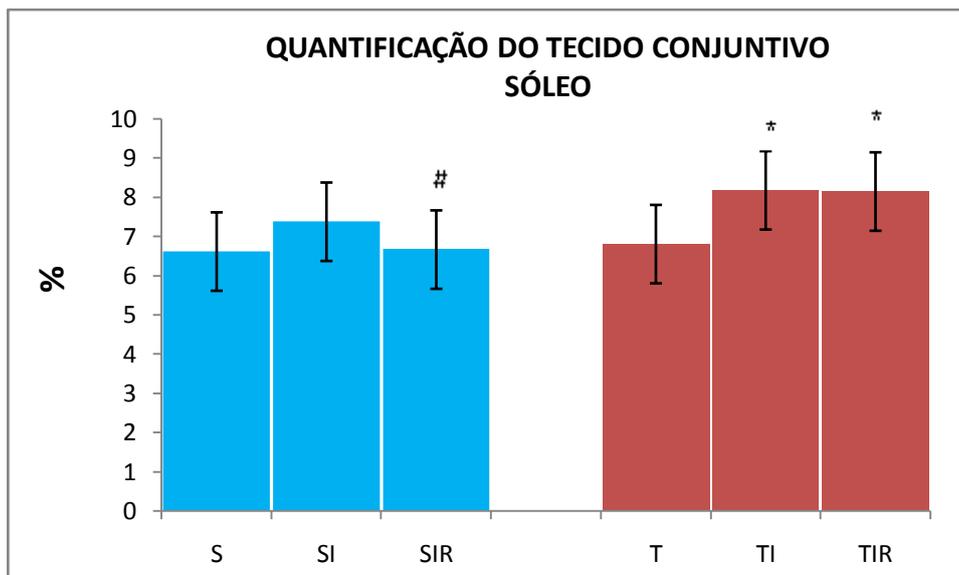


Figura 5 - Porcentagem de tecido conjuntivo do músculo sóleo nos grupos analisados. S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas, # difere do grupo TIR; * difere do grupo T.

Nos resultados referentes ao músculo GB, a medida de Hedges 'g indica efeito grande para todas as comparações, sendo a porcentagem de TC maior no tecido muscular de animais sedentários, mas é reduzida após a remobilização.

Essa situação mostra-se invertida para o músculo SOL, em que, os animais treinados apresentam maior porcentagem de conjuntivo quando comparado aos sedentários, ressaltando que o SOL corresponde ao músculo mais afetado no exercício de natação e na imobilização (Tabela 4).

Tabela 4 - Tamanho do efeito pela medida de Hedges' g da quantificação de tecido conjuntivo dos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL) nas análises comparativas entre os grupos, sendo S: controle sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas.

| Análise TC | Hedges' g GB | Hedges' g SOL |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| S x T | 1,22 [#] | 1,40 [#] |
| SI x TI | 1,63 [#] | 1,40 [#] |
| SIR x TIR | 4,32 [#] | 1,86 [#] |

efeito grande

4.4 AST

A análise da AST demonstrou que no músculo GB, o grupo S apresentou maior AST, com diferença estatística significativa quando comparado aos grupos SI e SIR. O mesmo foi observado no grupo T, que obteve valor estatisticamente significativo maior quando comparado ao TI e TIR.

Por vez, na análise entre os grupos sedentários e treinados não foram verificadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos correspondentes (Figura 6 e 7).

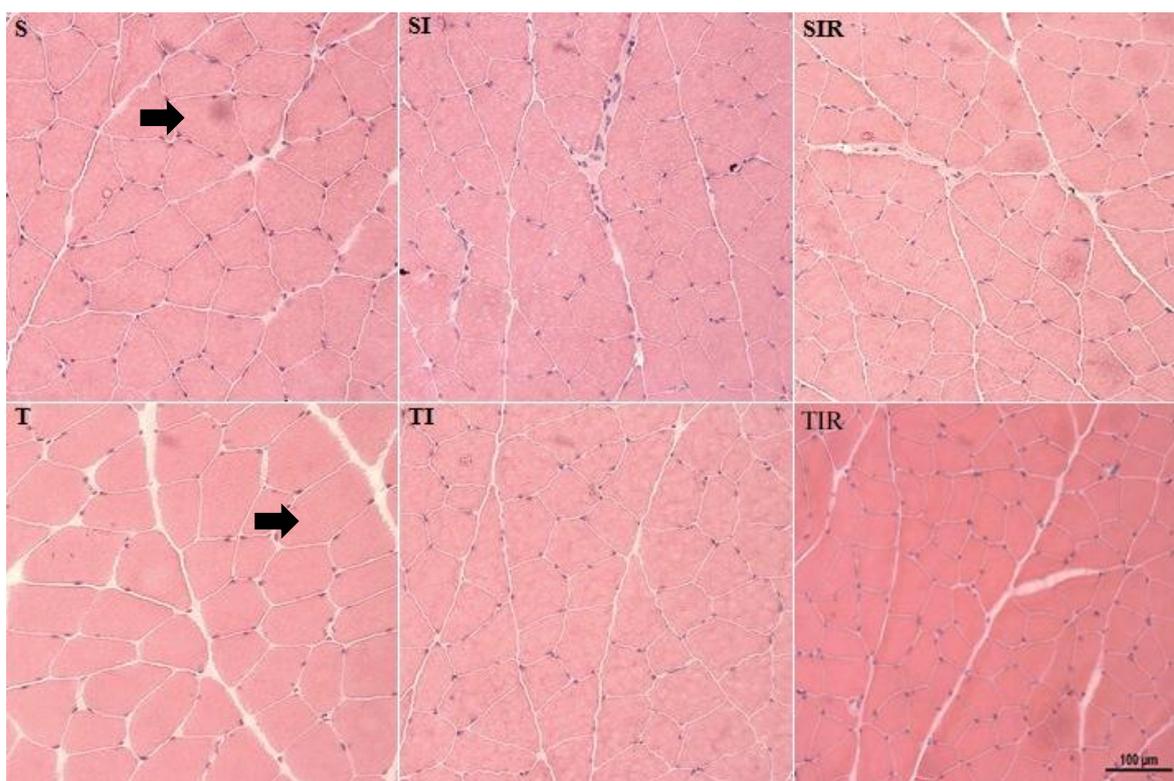


Figura 6 - Cortes transversais do músculo gastrocnêmio branco corados com HE. S: controle sedentárias; SI: sedentárias immobilizadas; SIR: sedentárias immobilizadas recuperadas; T: controle treinadas; TI: treinadas immobilizadas; TIR: treinadas immobilizadas recuperadas. Observar AST maior nos grupos S e T comparado aos grupos correspondentes (seta). Aumento: 20x (barra = 100 µm).

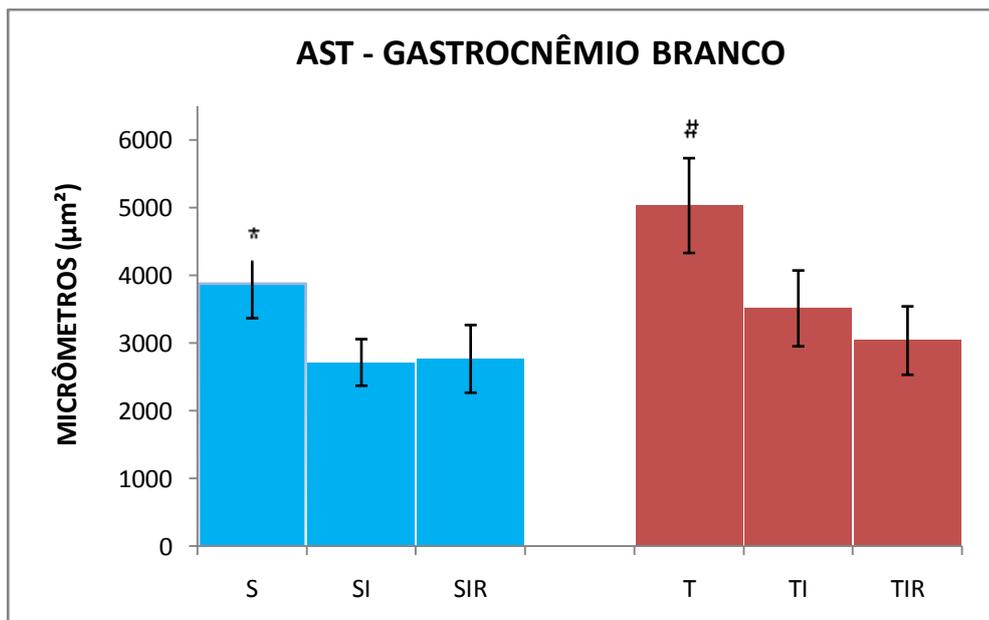


Figura 7 - Valores em média e desvio padrão da AST do músculo gastrocnêmio branco nos grupos analisados. S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas; * difere do grupo SI e SIR; # difere do grupo TI e TIR.

No que diz respeito à AST do músculo SOL, os resultados apontam que o grupo S apresentou maior AST, com diferença estatística significativa quando comparado aos grupos SI e SIR. Entre os grupos treinados não houve diferença significativamente estatística.

Com relação às comparações entre os grupos sedentários e treinados os resultados mostram que a AST do grupo SIR foi estatisticamente significativa sendo menor quando comparada ao grupo TIR (Figura 8 e 9).

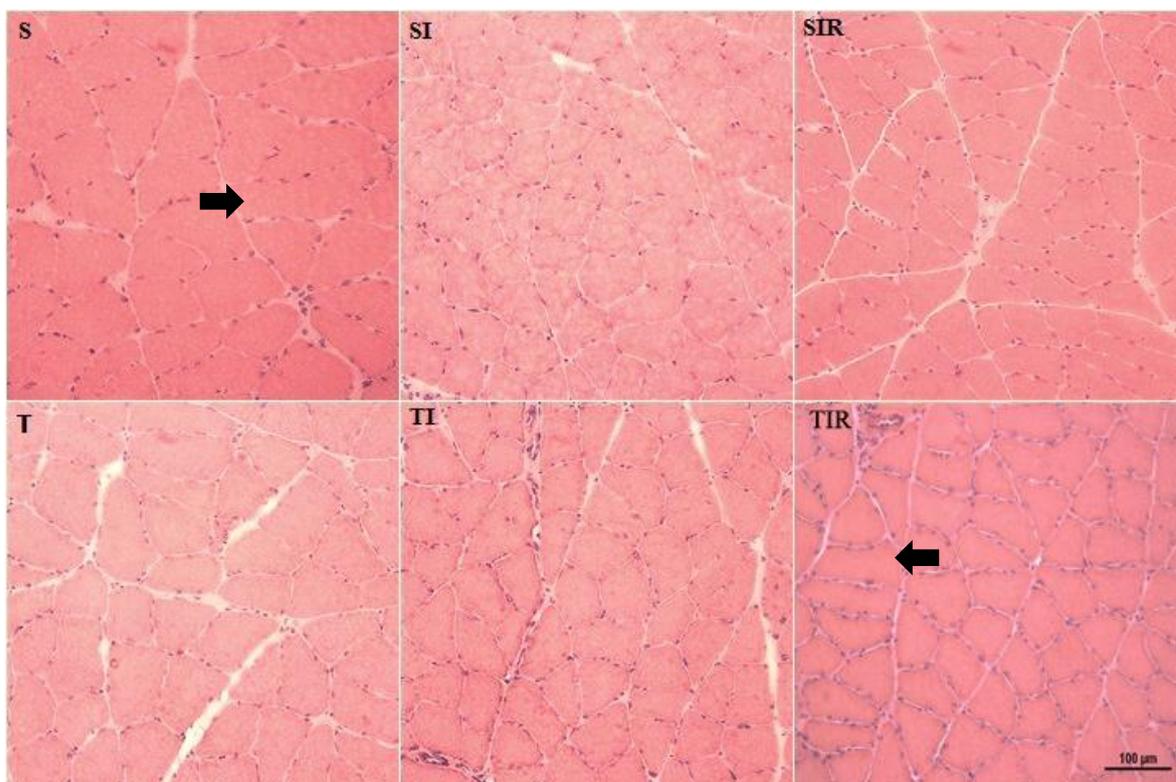


Figura 8 - Cortes transversais do músculo sóleo corados com HE. Grupos: S: controle, sedentárias; SI: sedentárias immobilizadas; SIR: sedentárias immobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas immobilizadas; TIR: treinadas immobilizadas recuperadas. Observar AST maior no grupo S quando comparado ao SI e SIR; e TIR maior que SIR (setas). Aumento: 20x (barra = 100 μ m).

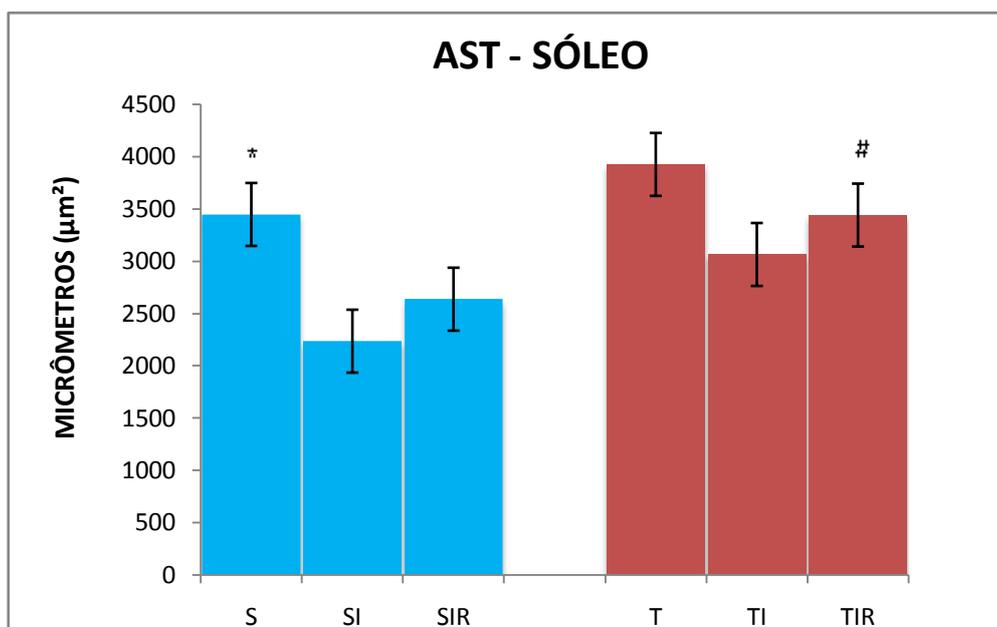


Figura 9 - Valores em média e desvio padrão da AST do músculo sóleo nos grupos analisados. S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas, * difere do grupo SI e SIR; # difere do grupo SIR.

A medida de Hedges' g aponta efeito grande, sugerindo que AST do músculo GB nos animais submetidos ao treinamento foi maior que nos sedentários, com efeito moderado apenas entre SIR x TIR. Para o músculo SOL, o efeito grande foi observado em todas as comparações, sendo AST maior para os animais dos grupos treinados (tabela 5).

Tabela 5 - Tamanho do efeito pela medida de hedges da área de secção transversa (AST) dos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL) nas análises comparativas entre os grupos, sendo S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas

| Análise AST | Hedges' g GB | Hedges' g SOL |
|----------------|-------------------|-------------------|
| S x T | 1,49 [#] | 4,92 [#] |
| SI x TI | 1,55 [#] | 3,36 [#] |
| SIR x TIR | 0,48 ⁺ | 2,36 [#] |

efeito grande + efeito moderado

4.5 Quantificação da citocina TGF- β 1

Observou-se que no músculo GB o conteúdo foi estatisticamente significativo, sendo maior em S quando comparado aos grupos SI e SIR. Entre as ratas treinadas não houve diferença estatística significativa.

Nas análises comparativas entre sedentárias e treinadas, observou-se diferença estatística significativa entre os grupos S e T, sendo o valor de S maior.

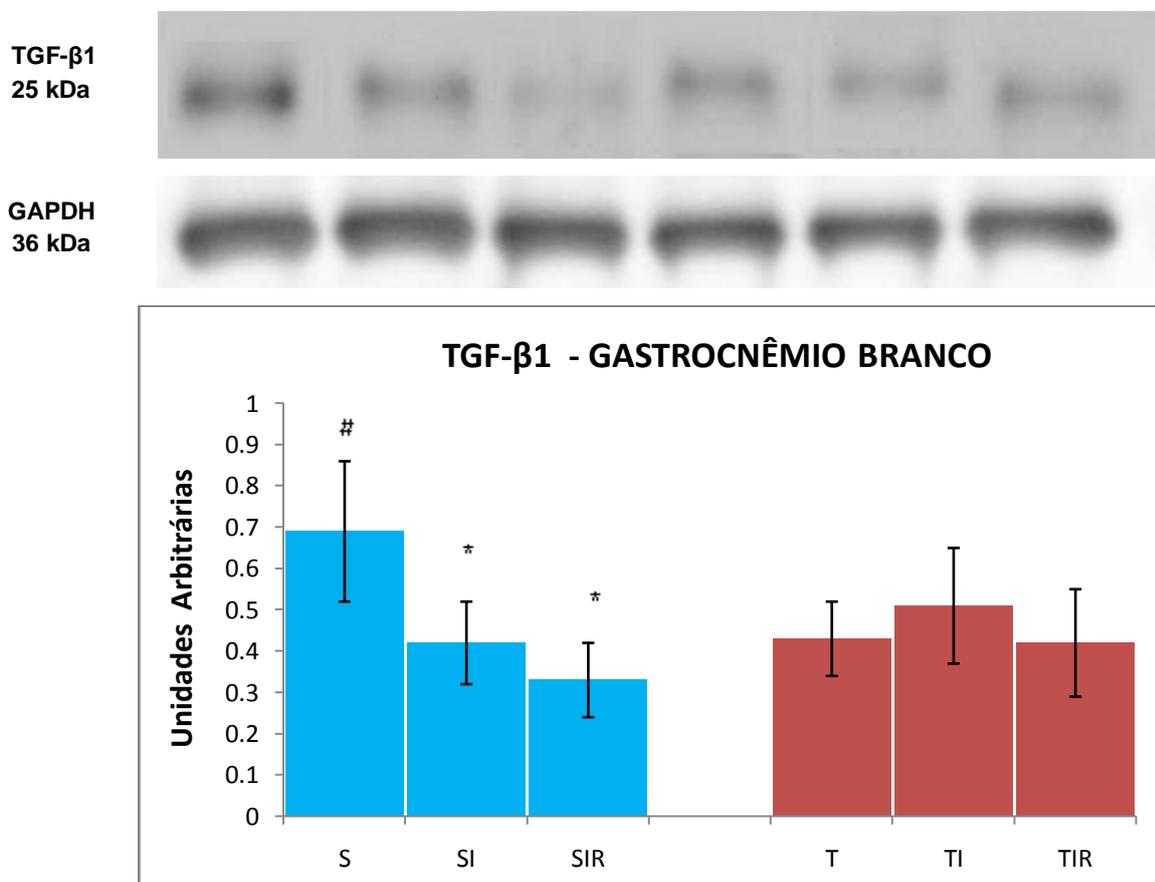


Figura 10 - Valores do conteúdo de TGF- β 1 no músculo gastrocnêmio branco. S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas; # difere do grupo T; * difere do grupo S.

Os resultados referentes ao músculo SOL demonstram que o conteúdo de TGF- β 1 foi estatisticamente significativo estando elevado no grupo SI, quando

comparado ao S e ao SIR. Entre as ratas treinadas não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos.

Nas análises entre as ratas sedentárias e treinadas o conteúdo de TGF- β 1 do grupo TIR foi estatisticamente significativo sendo maior quando comparado ao SIR. Nos demais grupos os valores foram similares (Figura 11).

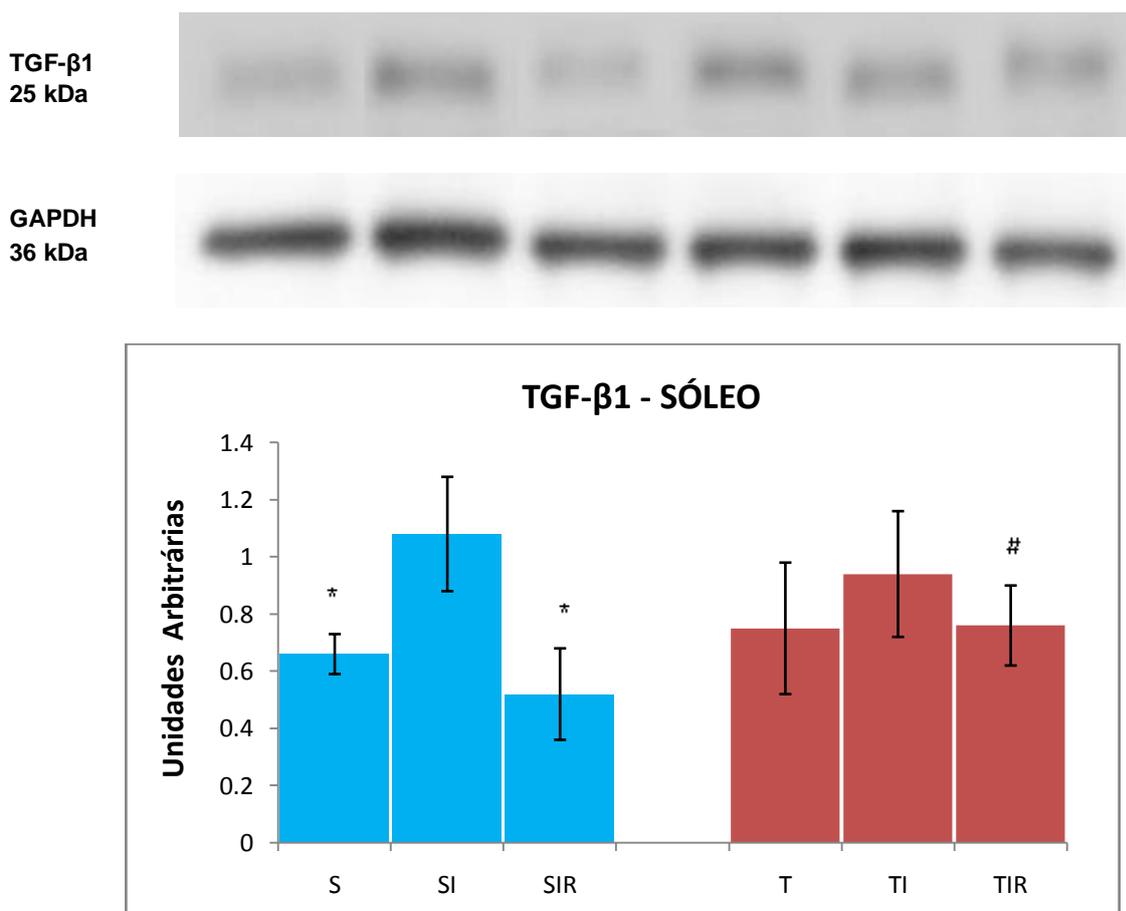


Figura 11 - Valores do conteúdo de TGF- β 1 no músculo. S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas, * difere do grupo SI; # difere do grupo SIR; ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

No que diz respeito à medida de Hedges' g para a quantificação TGF- β 1 (tabela 6), no músculo GB o efeito grande foi observado nas ratas treinadas com

relação as sedentárias, sendo os grupos submetidos ao treinamento com valores maiores, exceto na condição controle, em que S mostrou-se maior que T.

No músculo SOL foi observado efeito grande e moderado, e SI apresentou valor superior ao TI.

Tabela 6 - Tamanho do efeito pela medida de Hedges' g da quantificação de TGF- β 1 dos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL) nas análises comparativas entre os grupos, sendo S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas

| Análise TGF-β1 | Hedges' g GB | Hedges' g SOL |
|--|-------------------------|--------------------------|
| S x T | 1,72 [#] | 0,47 ⁺ |
| SI x TI | 0,66 [#] | 0,60 [#] |
| SIR x TIR | 0,72 [#] | 1,44 [#] |

efeito grande; + efeito moderado

4.6 Quantificação do glicogênio muscular

A tabela 7 demonstra o resultado da quantificação do glicogênio muscular, o músculo GB não apresentou diferença estatística significativa entre os dados.

Com relação à quantificação do glicogênio muscular no SOL, verificou-se que o grupo T apresentou valor estatisticamente menor quando comparado ao TI e TIR.

Os resultados entre as ratas sedentárias e treinadas apontaram diferença estatística significante somente entre os grupos SIR e TIR, apresentando-se maior no TIR.

Tabela 7 - Valores da média \pm desvio padrão da concentração de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL), sendo S: controle, sedentárias; T: controle, treinadas; SI: sedentárias imobilizadas; TI: treinadas imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas.

| | GB | SOL |
|------------|-----------------|------------------------------|
| S | 0,21 \pm 0,05 | 0,12 \pm 0,04 |
| SI | 0,23 \pm 0,02 | 0,32 \pm 0,10 |
| SIR | 0,23 \pm 0,06 | 0,21 \pm 0,08 [#] |
| T | 0,22 \pm 0,06 | 0,19 \pm 0,01* |
| TI | 0,24 \pm 0,05 | 0,53 \pm 0,09 |
| TIR | 0,30 \pm 0,10 | 0,59 \pm 0,07 |

difere do grupo TIR; *difere do grupo TI e TIR.

O tamanho do efeito pela media de Hedges' g na quantificação do glicogênio (tabela 8), demonstra que houve efeito grande entre todas as comparações, sendo a reserva de glicogênio maior nas ratas submetidas ao treinamento quando comparado as sedentárias em todas as etapas do protocolo experimental, controle (S x T), imobilização (SI x TI) e após a remobilização (SIR x TIR).

Tabela 8 - Tamanho do efeito pela medida de hedges da quantificação de glicogênio muscular dos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL) nas análises comparativas entre os grupos, sendo S: controle, sedentárias; SI: sedentárias imobilizadas; SIR: sedentárias imobilizadas recuperadas; T: controle, treinadas; TI: treinadas imobilizadas; TIR: treinadas imobilizadas recuperadas.

| Análise Glicogênio | Hedges' g GB | Hedges' g SOL |
|---------------------------|---------------------|----------------------|
| S x T | 1,22 [#] | 1,40 [#] |
| SI x TI | 1,63 [#] | 1,40 [#] |
| SIR x TIR | 4,32 [#] | 4,51 [#] |

efeito grande

5. DISCUSSÃO

Diversas pesquisas e metodologias têm sido empregadas com intuito de contribuir para a compreensão dos eventos desencadeados pela imobilização articular, bem como, pelo processo de envelhecimento. A busca por técnicas que minimizam os efeitos negativos dessas condições no músculo esquelético instigou o desenvolvimento do presente estudo.

De acordo com o que foi proposto neste estudo, os resultados demonstram maior influência do treinamento e da imobilização no músculo SOL. O treinamento prévio mostrou-se preventivo à hipotrofia neste músculo, não reduzindo a AST no grupo TI. Diferentes respostas à remobilização foram mais evidentes no SOL, como o aumento da porcentagem de TC, da AST, da quantificação da citocina TGF- β 1 e do glicogênio muscular do grupo TIR quando comparado ao SIR.

Estudos prévios enfatizam que um curto período de imobilização, variando entre quatro e dez dias, é suficiente para causar alterações metabólicas e estruturais ao tecido muscular (Durigan et al., 2006; Silva et al., 2006; Carvalho et al., 2009). Os resultados do presente estudo demonstram que o período de cinco dias de inatividade, mesmo com o modelo de órtese permitindo a descarga de peso ao animal, foi suficiente para gerar modificações estruturais, metabólicas e moleculares nos músculos estudados, principalmente do músculo SOL.

Os dados sinalizam a importância clínica de uma reabilitação direcionada e específica a indivíduos submetidos ao processo de imobilização articular por curto período de tempo. Além do mais, vale ressaltar que de acordo com Wall, Dirks e Van Loon (2013) a exposição repetitiva de indivíduos a períodos curtos de inatividade pode culminar no desenvolvimento da sarcopenia.

Especificamente no Brasil, estudos transversais e epidemiológicos demonstram que 40% a 55% da população adulta adotam a prática de atividade física por 150 minutos semanais. Dentre as diversas práticas disponíveis, como caminhada, futebol, bicicleta, musculação e ginástica, a caminhada, realizada entre duas e três vezes na semana, durante 60 minutos, representa a atividade física comumente escolhida entre os indivíduos (Marcondelli et al., 2010; Dumith, Domingues e Gigante, 2009).

Desse modo, o protocolo de treinamento prévio e em longo prazo escolhido buscou uma proximidade com seres humanos, realizado três vezes na semana, sem carga e com um acúmulo de 180 minutos semanais, baseado nas recomendações da OMS para adultos entre 18-64 anos (WHO, 2011).

Cada tipo de exercício, aeróbico ou anaeróbico, desempenha respostas fisiológicas, metabólicas e endócrinas distintas ao organismo (Silva, Melo e Oliveira, 2007; Rogatto e Luciano, 2001). No presente estudo foi observado que as ratas do grupo treinadas tiveram, durante o período de treinamento físico aeróbico de quatro meses, maior consumo de ração, entretanto, o peso corporal final não mostrou diferença quando comparado as ratas do grupo sedentária. Tais dados foram confirmados pela medida de Hedges' g que demonstra efeito moderado para as comparações do peso corporal e efeito grande ao consumo hídrico e alimentar.

Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Silva, Melo e Oliveira (2007), que buscaram avaliar o efeito do treinamento físico na massa corporal de ratos. Os animais foram divididos em dois grupos: treinamento anaeróbico, por meio do aparelho de agachamento, com 75% do teste de carga máxima e aeróbico: por meio da corrida em esteira ergométrica; realizados três

vezes por semana, durante 12 semanas. Os resultados mostraram que o peso corpóreo final dos animais exercitados e não exercitados se manteve igual estatisticamente, independentemente do tipo de atividade ao qual foram submetidos. Segundo Rogatto e Luciano (2001), o maior consumo alimentar dos animais treinados, sem aumento de peso corporal, demonstra a efetividade do treinamento físico no sentido de favorecer um equilíbrio energético.

Após a fase inflamatória, a regeneração do músculo esquelético consiste basicamente de duas fases: regeneração da miofibrila e produção de TC. Estes dois processos ocorrem simultaneamente e são eventos competitivos, visto que a produção excessiva de TC é capaz de inibir completamente a regeneração muscular (Lehto et al., 1986).

Além disso, diversos estudos relatam o aumento no volume e proliferação de TC como uma consequência da imobilização articular (Kannus et al., 1992; Jarvinen, Einola e Virtanen 1992; Volpi et al., 2008).

No presente estudo observou-se que o TC se comportou de forma similar nos grupos sedentários dos músculos GB e SOL, ou seja, a imobilização por cinco dias não foi suficiente para aumentar de forma significativa a porcentagem de TC.

Entretanto, nos grupos treinados o TC comportou-se de forma diferente. No músculo GB, a imobilização reduziu a porcentagem de TC no grupo TI quando comparado ao grupo TIR, mas os valores de TI são similares ao seu controle (grupo T) e menores que SI, sugerindo que o treinamento prévio interferiu de forma positiva no controle da proliferação do TC. O grupo TIR apresentou a porcentagem de TC maior quando comparado ao SIR. Tal fato pode ser explicado pelo estímulo excessivo num músculo já treinado, que aumentou a frequência de

treinamento para cinco vezes na semana na fase de recuperação. Além disso, observou-se neste grupo (TIR) efeito grande pela medida de hedges no conteúdo de TGF- β 1, que está relacionado à fibrose.

Inversamente, no músculo SOL o grupo TI e TIR exibiram aumento na porcentagem de TC quando comparado ao T, corroborando com os resultados encontrados nos estudos de Jarvinen, Einola e Virtanen (1992), Durigan et al. (2006) e Silva et al. (2011) sobre a imobilização favorecer o aumento do TC. O grupo TIR também apresentou aumento na porcentagem de TC quando comparado ao SIR, como no músculo GB. Da mesma forma, sugere-se que o excesso de estímulo na fase de recuperação alterou o conteúdo da citocina TGF- β 1, que está relacionado à fibrose.

A família das citocinas TGF- β é conhecida por regular vários processos celulares como angiogênese, diferenciação e apoptose, além de estimular a proliferação de fibroblastos e produção da matriz extracelular, que pode resultar em fibrose (Heldin et al., 1997).

Entretanto, Lessard et al. (2013) identificaram um novo papel do TGF- β 1 na adaptação celular ao treinamento aeróbico. Os autores mostraram que animais adaptados ao treinamento aeróbico apresentam maiores níveis plasmáticos de TGF- β 1, e os animais com baixa resistência ao treinamento aeróbico apresentam baixos níveis plasmáticos da citocina, após 8 semanas de treinamento.

Os resultados do presente estudo indicam conteúdo similar do TGF- β 1 nos grupos treinadas, em ambos os músculos, sugerindo a capacidade de adaptação do músculo treinado a diferentes estímulos, como a imobilização e remobilização. Já nos grupos sedentárias, a imobilização aumentou o conteúdo de TGF- β 1 no

músculo SOL (grupo SI), mas não foi relacionado ao aumento do TC. No músculo GB verificou-se aumento no grupo sedentário (S).

No que concerne a tipagem de fibras musculares, sabe-se que as fibras do tipo II são mais afetadas durante o processo de envelhecimento, ao passo que tendem a uma inervação deficiente ao longo do tempo (Degens, 2007). Em contrapartida, a vista de seu perfil metabólico as fibras do tipo I são comumente mais afetadas em condições de desuso, como na imobilização articular (Lieber, 2002; Tanaka, Kariya e Hoshino, 2004; Minamoto, 2005).

Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa entre a AST das ratas sedentárias e treinadas (S x T), a medida de Hedges' g aponta efeito grande, inferindo maior AST nas ratas treinadas. No músculo SOL essa tendência é confirmada pelo peso muscular, que foi significativamente maior nas ratas treinadas comparado as sedentárias.

Os dados da análise morfométrica demonstram que no músculo GB (fibras tipo II), houve redução na AST após o período de imobilização, tanto no grupo SI quanto no TI, quando comparados aos respectivos controles (S e T). Já no músculo SOL (fibras tipo I), não foram observadas alterações na AST no grupo TI, mostrando que o treinamento prévio permitiu melhor adaptação do músculo ao estímulo negativo da imobilização.

Todavia, a redução na AST do músculo SOL de ratos foi relatada em outros estudos, como o de Durigan et al. (2006) que avaliaram os efeitos da imobilização aguda (três dias) sobre o perfil metabólico e morfométrico dos músculos da pata posterior de ratos jovens. Encontram uma redução de 31% na AST das fibras do músculo SOL, além de aumento de 279% na densidade do TC

intramuscular. Nesse estudo, concluíram que as alterações morfométricas são evidenciadas na fase aguda da imobilização antecedendo as metabólicas.

À vista disso, os resultados obtidos expõem que o protocolo de treinamento prévio proposto, demonstrou efetividade na prevenção da hipotrofia sobre o desuso para as fibras tipo I, não reduzindo a AST do músculo SOL nas ratas do grupo TI, mas não foi eficaz para minimizar a hipotrofia, além de não exercer influência na aceleração da recuperação pós-imobilização para as fibras tipo II (músculo GB).

No estudo de Nascimento et al. (2008) ao avaliar o efeito de um treinamento prévio à imobilização por natação, com 60 minutos de duração, três vezes na semana, com incremento de carga (até 8% da massa corporal), durante seis semanas, foi encontrado redução na proporção de fibras musculares do tipo II do músculo tibial anterior. Já no músculo SOL, verificaram que o treinamento de natação causou aumento nas fibras do tipo IIA e diminuição nas fibras tipo I. Essa divergência com os resultados do presente estudo pode ser explicada pela ausência de carga no treinamento.

Segundo Campos et al. (2002) um treinamento de força (anaeróbico) induz ao aumento no tamanho das fibras musculares, que influencia diretamente na massa muscular das fibras do tipo II, com ênfase em IIA. Dessa forma, as respostas observadas nas fibras tipo II no presente estudo relacionam-se com o tipo de treinamento realizado, a natação (aeróbico).

O protocolo de remobilização foi baseado no contexto de que o músculo estriado esquelético requer maior tempo de recuperação do que o necessário para causar a atrofia (Kannus et al., 1992; Milani et al., 2008).

Os resultados demonstraram que a remobilização por intermédio da natação não contribuiu para a recuperação ao nível basal da AST na fibra tipo II (músculo GB) para ambos os grupos (SIR e TIR) e na fibra tipo I (músculo SOL) para o grupo SIR, mesmo sendo realizado por aproximadamente o triplo do tempo do período da imobilização.

Nesse sentido, a recuperação pode estar prejudicada pela instalação do processo de envelhecimento, que influencia na capacidade de regeneração muscular. Fatores como, o declínio na quantidade de células satélites quiescentes no músculo esquelético, somado as dificuldades de sua ativação e proliferação, resultam no comprometimento da funcionalidade dessas células e, conseqüentemente, na deficiência da capacidade regenerativa do músculo esquelético de indivíduos idosos (Brack e Rando 2007; Degens, 2010).

Segundo Silva et al. (2009) a eficiência de uma dada contração é determinada pela reserva muscular de glicogênio, assim, essa reserva é fundamental na manutenção das condições energéticas. Sabe-se que a taxa de ressíntese muscular tanto do glicogênio quanto do triglicérides é aumentada por meio do treinamento aeróbico (Kimber et al., 2003).

Figueira et al. (2007) em estudo realizado com ratos adultos buscaram analisar o conteúdo hepático e muscular de triglicérides e glicogênio em ratos treinados (aeróbico) sob o uso de dieta padrão. Os animais foram submetidos ao treinamento de natação, cinco vezes por semana, (1h/dia) e sobrecarga de 5% da massa corporal, durante o período de quatro semanas. Os resultados mostraram que quatro semanas do treinamento proposto não alterou significativamente os estoques de glicogênio.

No presente estudo com o protocolo de treinamento físico aeróbico, três vezes na semana, com sessões de 60 minutos, durante quatro meses também não foram observadas alterações entre as reservas de glicogênio das ratas treinadas e sedentárias (S x T), corroborando com o estudo supracitado. Entretanto, a medida de Hedges' g apontou efeito grande ao grupo T com relação ao grupo S, observando-se valor maior aos animais treinados quando comparados aos sedentários, indicando maior reserva glicogênica nos animais submetidos ao treinamento aeróbico.

No que concerne à imobilização articular os resultados obtidos referentes à quantificação do glicogênio muscular divergem dos estudos encontrados na literatura no músculo SOL e GB imobilizados em curto período de tempo, sete e três dias (Silva et al., 2009; Chingui et al., 2008; Durigan et al., 2006), em que, observam-se reduções nas reservas glicogênicas. Segundo Cancelliero et al. (2005) os ajustes metabólicos com a transição da homeostase para o quadro crítico da imobilização são mais evidentes em sete dias de imobilização.

No presente estudo, não foram observadas alterações estatística significativas no conteúdo de glicogênio para as fibras tipo II (GB), sinalizando o declínio da potencialidade de respostas das fibras tipo II durante o processo de envelhecimento. Todavia, por meio da medida de Hedges' g é possível identificar o efeito grande do treinamento em todas as comparações entre os grupos treinados e sedentários, reforçando a tendência da maior reserva de glicogênio aos animais treinados, como o sugerido pela literatura (Figueira et al., 2007).

Já para as fibras tipo I (SOL) observou-se aumento com a imobilização (TI). Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por Silva et al. (2010) que utilizando o tratamento com IGF-1 (*insulin-like growth fator*) durante o período

de imobilização de sete dias, encontraram aumento expressivo nas reservas de glicogênio (234,6%) nos animais imobilizados e tratados com o IGF com relação ao grupo somente imobilizado.

O treinamento físico em longo prazo promove alterações específicas ao tecido muscular, incluindo o aumento das reservas energéticas (Kimber et al., 2003). A modificação na atividade contrátil da fibra muscular com aumento da sensibilidade periférica a insulina tem sido descrita como uma alteração importante observada após períodos de atividade física, sendo capaz de manter-se aumentada por longo período de tempo posteriormente ao esforço físico (Nakatani et al., 1997).

Além disso, é conhecido que o aumento na translocação do GLUT4 (transportador de glicose) de reservatórios no sentido da membrana é favorecido pela sensibilidade das vias citosólicas, concedendo um aumento na captação da hexose, hipersensibilização tecidual à insulina concomitante com a ativação da enzima glicogênio sintetase (Hussain et al., 1995; Silva et al., 2010).

Assim, a combinação do exercício prolongado desencadear uma hipersensibilidade periférica nas vias insulínicas com o fato dos animais treinados e imobilizados (TI) serem capazes de realizar a contração muscular pela descarga de peso, permitida pela órtese durante o período de inatividade, pode justificar o aumento significativo do conteúdo do glicogênio no grupo TI no músculo SOL.

Nicholson e Watson (1984) descrevem que a redução na população dos receptores insulínicos das fibras tipo I do músculo esquelético pode ser observada entre a terceira e oitava hora do desuso, gerando um comprometimento nas vias citosólicas ligadas à síntese de glicogênio, influenciando na resistência a insulina e na redução das reservas energéticas. Posto isto, o treinamento aeróbico foi

eficaz para as fibras tipo I protegendo as reservas energéticas dos efeitos deletérios da imobilização comumente observados em fibras tipo I.

O aumento significativo com efeito grande pela medida de Hedges' g do conteúdo de glicogênio no grupo TIR quando comparado ao SIR, indica que as mudanças metabólicas ocasionadas pelo treinamento prévio, refletiram em longo prazo, como sugerido pela literatura (Nakatani et al., 1997), favorecendo a elevação na reserva energética de glicogênio no retorno dos animais as sessões de treinamento.

As fibras musculares do tipo II, mais afetadas com o processo de envelhecimento, não responderam ao treinamento proposto, sugerindo que o treinamento de força concomitante ao treinamento aeróbico deve ser considerado na prática clínica, a fim de trabalhar efetivamente com todos os tipos de fibras musculares.

Assim, para a manutenção de um condicionamento muscular resistente e preventivo sugere-se que os treinamentos físicos direcionados a adultos e idosos não se limitem apenas aos exercícios aeróbicos (caminhada, hidroginástica, corrida, etc.). Para melhor eficiência os treinos necessitam ser elaborados priorizando a combinação de exercícios aeróbicos (resistência) com exercícios anaeróbicos (que exijam força).

Contudo, outros estudos devem ser realizados, a fim de comparar treinamentos aeróbicos e anaeróbicos com a mesma frequência semanal, e também, com a associação dos dois treinamentos no mesmo modelo experimental. Além disso, outras análises moleculares, como o conteúdo de TNF (inflamação), metaloproteinases (matriz extracelular) e marcadores de radicais livres, podem ser realizadas.

6. CONCLUSÃO

O treinamento de natação proposto foi capaz de prevenir a hipotrofia no músculo sóleo submetido à imobilização em curto prazo. Entretanto, o treinamento não contribuiu de forma positiva no músculo gastrocnêmio fibras brancas.

O conteúdo da citocina TGF- β 1 e do glicogênio muscular aponta a capacidade adaptativa do animal ao treinamento, indicando que o exercício regular, mesmo sem carga e realizado por três vezes na semana é capaz de promover efeitos positivos no músculo esquelético de ratas adultas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Artifon EL, Silva LI, Ribeiro LFC, Brancalhão RMC, Bertolini GRF. Treinamento aeróbico prévio a compressão nervosa: análise da morfometria muscular de ratos. *Rev Bras Med Esporte*. 2013; 19(1): 66-69.

Adolfsson J. The time dependence of training-induced increase in skeletal muscle capillarization and the spatial capillary to fibre relationship in normal and neo vascularized skeletal muscle of rats. *Acta, Physiol Scand*. 1986; 128: 259-266.

Appell HJ, Morphology of immobilized skeletal muscle and the effects of a pre- and postimmobilization training program. *Int, J, Sports Med*. 1986b; 7: 6-12.

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL, The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim. Biophys. Acta*. 1990; 1032: 79-87.

Bar-Shai M, Carmeli E, Ljubuncic P, Reznick AZ. Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF- κ B activation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 4: 202–214.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM. *Fisiologia*, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004, 233p.

Booth FW. Time course of molecular atrophy during immobilization of hind limbs in rats. *Journal of Applied Physiology*. 1977; 43(5): 656-61.

Brack AS, Rando TA. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev*. 2007; 3(3): 226-37.

Bruusgaard C, Johansen IB, Egner IM, Rana ZA, Gundersen K. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *PNAS Early Edition*, 2006: 1-6.

Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, TomaK, Hagerman FC, Murray TF, et al. Muscular adaptations in response to three different resistance training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *European Journal of Applied Physiology*, Berlin, 2002; 88(1/2): 50-60.

Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ. Alterações do conteúdo de glicogênio e do peso muscular em função da posição articular e do período de imobilização. *Rev. Bras Fisioter.* 2005; 9(2): 173-179.

Carvalho LC, Polizello JC, Padula N, Freitas FC, Shimano AC, Mattiello-Sverzut AC. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletro estimulado pós-imobilização, *Acta Ortop Bras.* 2009; 17(5): 269- 72.

Capitanio M, Canepari M, Cacciafesta P, Lombardi V, Cicchi R, Maffei M, et al. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc, Natl Acad Sci. USA.* 2006; 103(1): 87-92.

Chingui LJ, Braquinho RP; Severi MTM; Silva CA. Comportamento quimiometabólico do músculo sóleo na fase aguda da imobilização articular. *Fisiot. Pesq.* 2008; 15(2): 194-9.

Dalia RA, Guerino MR, Parizotto NA, Mello MAR, Luicano E. A influência do ultrassom e do treinamento físico sobre os triglicérides séricos e intramusculares em ratos diabéticos experimentais. *Rev, Bras, Med, Esporte.* 2011; 17(2): 123-126.

Davini R, Nunes CV. Alterações no sistema neuromuscular decorrentes do envelhecimento e o papel do exercício físico na manutenção da força muscular em indivíduos idosos. *Rev Bras Fisioter.* 2003; 7(3): 201-207.

Degens, H. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007; 7(3): 246-25.

Degens H. The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting. *Scand J Med Sci Sports.* 2010; 20: 28-38.

Dumith SC, Domingues MR, Gigante DP. Epidemiologia das atividades físicas praticadas no tempo de lazer por adultos do Sul do Brasil. *Rev, Bras, Epidemiol.* 2009; 12 (4): 646-58.

Durigan JLQ, Cancelliero KM, Dias CNK, Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfométrica. *Fisioterapia e Pesquisa* 2006; 13 (2): 38-45.

Durlak JA. How to Select, Calculate, and Interpret Effect Sizes, *Journal of Pediatric Psychology.* 2009; 34 (9):917–928.

Figueira TR, Lima MCS, Gurjao ALD, Ruas VDA, Leme JACA, Luciano E, Efeito do treinamento aeróbio sobre o conteúdo muscular de triglicérides e glicogênio em ratos. *Rev. Bras. Cie e Mov,* 2007; 15 (2): 55-61.

Heldin CH, Miyazono K, Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997; 390: 465-71.

Hussain MA, Schmitz O, Christiansen JS, Zapf J, Froesch ER, Metabolic effects of insulin-like growth factor-I: a focus on insulin sensitivity. *Metabolism.* 1995; 44 (10 Suppl 4): 108-12.

Jaffe DM, Terry RD, Spiro AJ. Disuse atrophy of skeletal muscle a morphometric study using image analysis. *J, Neurol, Sci,* 1978; 35: 189-200,

Jarvinen MJ, Einola SA, Virtanen EO. Effect of position of immobilization upon tensile properties of rat gastrocnemius muscle. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 1992; 73: 253-257.

Johnston AP, De Lisio M, Parise G. Resistance training, sarcopenia, and the mitochondrial theory of aging. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2008; 33: 191–199.

Kannus PL, Jozsa M, Restro M, Jarvinen M, Kvist M, Lehto P, et al. The effects of training, immobilization and remobilization on musculoskeletal tissues, Training and immobilization. *Scand J. Med. Sci. Sports.* 1992; 2(100): 118, 1992.

Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TL, Kvist M, Vieno T, Jarvinen TA. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl. Physiol.* 1998; 84 (4): 24-1418,

Kim JW, Kwon OY, Kim MH, Differentially expressed genes and morphological changes during lengthened immobilization in rat soleus muscle. *Differentiation.* 2007; 75:147-57.

Kimber N, Heigenhauser G, Spriet L, Dyck K. Skeletal muscle fat and carbohydrate metabolism during recovery from glycogen-depleting exercise in humans. *J Physiol.* 2003; 548: 919-27.

Kodama FY, Camargo RCT, Job AE, Ozaki GAT, Koike TE, Camargo-Filho JCS. Propriedades mecânicas do músculo de ratos adultos e idosos, exercitado pós-imobilização. *Acta ortop Bras.* 2012; 20(4): 218-22.

Lehto M, Jarvinen M, Nelimarkka O. Scar formation after skeletal muscle injury, a histological and autoradiographical study in rats. *Arch. Orthop Trauma Surg.* 1986; 104: 366-370.

Lessard SJ, Rivas DA, Alves-Wagner AB, Hirshman MF, Gallagher IJ, Constantin-Teodosiu D, et al. Resistance to aerobic exercise training causes

metabolic dysfunction and reveals novel exercise-regulated signaling networks. *Diabetes*. 2013; 62: 2717-27.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation*, 2, ed, Baltimore: Williams & Wilkins; 2002, 448p.

Lima SC, Caierão QM, Durigan JLQ, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB, et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfológicas e mecânicas no músculo de rato. *Rev. Bras. Fisioter. São Carlos*. 2007; 11(4): 297-302, 2007.

Lindenau J Dal-Ri, Guimarães LSP. Calculando o tamanho de efeito no SPSS. *Revista HCPA*, 2012; 32 (3): 363-381.

Lipsey MW, Wilson DB. The efficacy of psychological, educational and behavioural treatment. *Am. Psych*. 1993: 1181–209.

Michael K. Relationship of Skeletal Muscle Atrophy to Functional Status: A Systematic Research Review. *Biol. Res. Nurs*. 2000; 2(2): 118-131.

Marcondelli PDT, Costa THM, Silva EF, Halla PC. Fatores associados à atividade física em adultos, Brasília, DF. *Rev, Saúde Pública*. 2010; 44 (5): 894-900.

Milani JG, Matheus JP, Gomide LB, Volpon JB, Shimano AC, Biomechanical Effects of Immobilization and Rehabilitation on the Skeletal Muscle of Trained and Sedentary Rats, *Ann Biomed Eng*. 2008; 36 (10): 1641-8.

Minamoto BV. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2005; 12(3): 50-55.

Nascimento CCF, Padula N, Milani JG, Shimano AC, MartinezEZ, Mattiello-Sverzut AC. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle

to swimming, immobilization and rehabilitation. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41 (9): 818-824.

Nakatani A, Han D, Hansen PA, Nolte LA, Host HH, Rickner RC, Holloszyl O. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *Journal of Applied Physiology.* 1997; 82 (2): 711-715.

Nicholson WF, Watson PA. Glucose uptake and glycogen synthesis in muscles from immobilized limbs. *J Appl Physiol.* 1984; 56: 431-5.

Nilwik, R, Snijders T, Leenders M, Groen BBL, Kranenburg JVK, Verdijk, LB, et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size *Experimental. Gerontology.* 2013; 48: 492–498.

Organização Mundial De Saúde (OMS), O papel da atividade física no Envelhecimento Saudável, Florianópolis, 2006.

Orlova VV, Liu Z, Goumans MJ, ten Dijke P. Controlling angiogenesis by two unique TGF- β type I receptor signaling pathways. *HistolHistopathol.* 2011; 26:1219-30.

Peijie C, Zicai D, Haowen X, Renbao X. Effects of chronic and acute training on glucocorticoid receptors concentrations in rats. *Life Sci.* 2004; 75: 1303-1311.

Pedrinelli A, Garcez-Leme LE, Nobre RSA. O efeito da atividade física no aparelho locomotor do idoso. *Rev. Bras. Ortop.* 2009; 44 (2): 96-101.

Rogatto GP, Luciano E. Efeitos do treinamento físico intenso Sobre o metabolismo de carboidratos. *Atividade física & Saúde.* 2001; 6 (2): 39-46.

Santos-Júnior FFU, Alves JSM, Machado AAN, Carlos OS, Ferraz ASM, Barbosa R. Alterações Morfométricas em Músculo Respiratório de Ratos

Submetidos à Imobilização de Pata. Rev Bras Med Esporte. 2010; 16(3): 215-218.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. Br, J Med Biol Res. 2006; 39: 979-985.

Silva CA, Souza MZ, Luciano E, Chingui L. Interleucina 6 participa dos ajustes metabólicos desencadeados na fase aguda da imobilização articular - Estudo em Ratos. Revista Portuguesa de Fisioterapia no desporto. 2009; 3: 05-12.

Silva CA, Petermann C, Cancelliero KM, Durigan J LQ, Polacow MLO. IGF-1 minimiza os efeitos deletérios do desuso no músculo sóleo de ratos. Acta Ortop Bras. 2011; 19 (3): 137-40

Silva DAS, Melo LA, Oliveira ACC. Efeito do treinamento físico na massa corporal de ratos. Motriz Rio Claro. 2007; 13(1): 43-50, 2007.

Siu LO, Russeau JC, Taylor A. Determination of glycogen in small tissue samples. J, Appl, Physiol. 1970; 28(2): 234-236.

Suominen H. Physical activity and health: Musculoskeletal tissues. Adv Physiother. 2007; 9: 65-75.

Tanaka T, Kariya Y, Hoshino Y, Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. J. Orthop. Sci. 2004; 9: 76-85.

Van Meeteren NLU, Brakke JH, Hamers FPT, Helders PJM, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crushlesion in the rat. Arch Phys Med Rehabil. 1997; 78: 70-7.

Vazeille E, Codran A. The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially down regulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. 2008; 295(5): 181-90.

Volpi FS, Casaroli LM, Pudell C, Menon T, Cienca AP, Alves EPB, et al. Efeitos da Remobilização em Duas Semanas com Natação Sobre o Músculo Sóleo de Ratos Submetidos à Imobilização. *Rev Bras Med Esporte*. 2008; 14(3): 168-170.

Wall BJ, Dirks ML, Van Loon LJC. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: Implications for age-related sarcopenia. *Ageing Research Reviews*. 2013; 12: 898– 906.

Williams PE, Catanese T, Lucey EG, Goldspink G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *J. Anat*. 1988; 158:109-14.

World Health Organization. *Global Recommendations on Physical Activity for Health*. Geneva: WHO; 2011.

Universidade Metodista de Piracicaba
Comissão de Ética sobre o Uso de Animais



Piracicaba, 18 de setembro de 2013

Para: Profa. Adriana Pertille
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 09/2013

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o protocolo de aula prática nº 09/13 intitulado *"Efeito do exercício de natação prévio na recuperação muscular de animais adultos após imobilização articular"* analisado por esta comissão.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Presidente do CEUA-UNIMEP