

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**LESÃO MUSCULAR E EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA –
MODERADA INTENSIDADE: ASPECTOS HISTOLÓGICOS EM
DIFERENTES PERÍODOS PÓS-EXERCÍCIO**

LÍVIA PASCOTI LAPIN

**PIRACICABA – SP
2007**

**LESÃO MUSCULAR E EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA-MODERADA
INTENSIDADE: ASPECTOS HISTOLÓGICOS EM DIFERENTES
PERÍODOS PÓS-EXERCÍCIO**

LÍVIA PASCOTI LAPIN

Orientadora Profa. Dra. Rozangela Verlengia

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências da Saúde da Universidade
Metodista de Piracicaba para obtenção
do título de Mestre em Educação Física
área de concentração em Performance
Humana, sob orientação da Professora
Dra. Rozangela Verlengia.**

**Piracicaba – SP
2007**

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

A Banca Examinadora abaixo assinada avaliou a Dissertação: Lesão muscular e exercício físico de baixa-moderada intensidade: aspectos histológicos em diferentes períodos pós-exercício elaborada por Livia Pascoti Lapin como requisito para a obtenção do título de Mestre em Performance Humana, sob orientação da Professora Doutora Rozangela Verlengia.

BANCA EXAMINADORA:

PROFº DR(A) ADRIANNE CRISTINE PALLANCH

PROFº DR(A) SONIA MARIA GAGIOTI

Observações: _____

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço a DEUS por tudo o que tenho e
que consegui realizar até hoje...*

*Agradeço aos meus pais Alfonso e Ana pelo apoio de sempre
em todos os momentos de minha vida*

*Às minhas irmãs Camila e Beatriz, assim como meus cunhados, cunhadas e
demais familiares, que mesmo alguns estando longe sempre estiveram
na torcida...*

*De forma também especial agradeço ao Maurício, meu marido, amigo, colega
de profissão, que é tão importante em minha vida e sempre está ao meu lado
nos momentos mais alegres e mais difíceis sempre me dando força e motivos
para continuar, além de compreensão, muita paciência e amor...*

À vocês dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Rozangela Verlengia pela oportunidade que me deu em desenvolver este trabalho, pelo apoio, confiança que depositou em mim no primeiro momento e que vem depositando até hoje, além de sua intensa dedicação e preocupação em sempre estar presente e realizar bons trabalhos.

À Prof^a Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua, responsável pelo laboratório de Citologia do Trofoblasto do Instituto de Ciências Biomédicas I da USP, pela co-orientação (científica e intelectual) do presente estudo.

À Prof^a Dra. Adrienne Christine Palanch (UNIMEP) que desde do início demonstrou muito interesse e muita paciência em me ajudar a entender e utilizar aparelhos e produtos, além de transmitir seus conhecimentos.

À Prof^a Dra. Claudia Regina Cavaglieri muito importante na parceria de equipamentos, financeira, e também com seus ensinamentos, especialmente na disciplina de Metabolismo Muscular, a qual foi muito importante para contribuições científicas.

Às técnicas Patrícia Carla Paulino Belotto e Melissa Victo do Laboratório de Fisiologia da Universidade Metodista de Piracicaba- UNIMEP e Rosangela Augusto de Oliveira Farias do laboratório de Citologia do Trofoblasto do ICB-USP que me ensinaram as técnicas e preparos de amostras e reações com muita dedicação.

Ao pessoal do Trofo's Lab (Cristiane, Mara, Juliana, Aline, Márcio, Fernanda, Claudia Minazaki) pela amizade e apoio neste período de convivência.

Aos profissionais Telma Alves Monezi (ICB/USP), Gaspar Ferreira de Lima (microscopia eletrônica – ICB/ USP), agradeço a amizade e simpatia desde o primeiro momento, além de seus empenhos para a realização de etapas deste trabalho.

À Prof. Dra. Sônia Maria Gaglioti (UNIB/SP) que foi muito importante na parte de microscopia eletrônica, na qualificação e na parte final de morfometria apresentando novos métodos e profissionais, além de sua amizade, dedicação e simpatia.

Ao Prof^o. Dr. Ricardo Carneiro Borra (UNIB/SP) pela orientação na obtenção e análise dos dados morfométricos somados a paciência e dedicação para com o estudo.

Aos colegas Luis Felipe Teixeira, Luis Cláudio Tangerino, Wagner José da Silva, Eduardo Borges, pela ajuda no treinamento dos animais e obtenção das amostras.

Aos colegas de profissão e amigos José Francisco Daniel e Raquel Daniel que sempre estiveram na torcida pelas minhas realizações e pela gentileza de sempre estarem prontos para me ajudar desde a graduação, e pela amizade.

Aos meus primos, primas, colegas de profissão e alunas do Centro Comunitário São Francisco de Assis que torceram bastante pela realização deste trabalho.

Ao amigo Mateus Xavier Mendes pela ajuda fornecida.

Agradeço a todos os professores do mestrado em Educação Física da UNIMEP pelos ensinamentos transmitidos.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP e ao Fundo de Apoio a Pesquisa da UNIMEP- FAP-UNIMEP.

E aqueles que por ventura eu tenha me esquecido de citar,

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE GRÁFICOS.....	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE ANEXOS.....	XVII
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT.....	XX
1 . INTRODUÇÃO.....	01
2 . REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1. ESTRUTURA E FUNCIONALIDADE DO MÚSCULO ESQUELÉTICO....	02
2.2. LESÃO MUSCULAR E EXERCÍCIO FÍSICO.....	09
2.2.1. Fase Fagocítica (Processos de regeneração muscular).....	18
2.3. EXERCÍCIO FÍSICO EXTENUANTE E LESÃO MUSCULAR.....	21
3. OBJETIVO.....	26
4. MATERIAL E MÉTODO.....	27
4.1 Método.....	27
4.1.1Animais.....	27
4.2 Procedimento Experimental.....	27
4.2.1 Procedimento de adaptação ao aparelho.....	27
4.2.2. Protocolo de exaustão.....	28
4.3 Alterações macroscópicas promovidas pelo exercício físico.....	29
4.4 Análise histológica estrutural.....	30

4.4.1	Preparação para coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina	30
4.4.2	Análise histológica ultra-estrutural.....	31
4.5	Análises Morfométricas	32
4.6	Análise estatística.....	33
5.	RESULTADOS.....	34
5.1	Caracterização do protocolo de exercício.....	34
5.2	Alterações da permeabilidade vascular.....	35
5.2	Análise da microscopia de luz e eletrônica.....	36
5.3	Grupo controle.....	36
5.4	Grupos experimentais.....	38
5.5	Medidas morfométricas das células musculares.....	43
5.5.1	Análise do espaçamento entre fibras dos grupos controle e experimentais....	43
5.5.2	Análise da quantidade de núcleos dos grupos controle e experimentais.....	46
5.5.3	Análise da quantidade de fibras dos grupos controle e experimentais.....	49
6.	DISCUSSÃO.....	52
7.	CONCLUSÃO.....	58
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *	59
9.	ANEXOS.....	65
9.1	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	65
9.2	PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA.....	67
9.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
9.4	ATIVIDADES REALIZADAS COM ESTE PROJETO.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina Difosfato

AIF – Fator de Indução de Apoptose

Apaf-1 – Fator de Ativação da Protease

ATP – Adenosina Trifosfato

ATPase – enzima de degradação de ATP

Bax – gene pró-apoptótico

Bcl-xl – gene anti- apoptótico

Bcl-2 – gene anti- apoptótico

CAT - catalase

CK – creatina quinase

EDL – Extensor Longo dos Dedos

EO – estresse oxidativo

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

Faz – receptores de “ morte” presentes na superfície celular

FAD . flavina adenina dinucleotídeo

GSH-px – glutationa peroxidase

H⁺ - Hidrogênio

Hsp70 – Proteínas de Choque térmico

H₂O – Água

IL-6 – Interleucina 6

IL-1ra – Interleucina 1ra

IL-10 – Interleucina 10

LPO – lipoperoxidação

MHC – Cadeia Pesada de Miosina

mATPase – enzima ATPase das cabeças de miosina

m/min – metros por minuto

MLSS – máxima fase estável do lactato no sangue

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

Nm - nanômetros

O₂ . Oxigênio

OH[•] radical hidroxil

OPLA – acúmulo do lactato no sangue

Pi – Fosfato Inorgânico

PBS – Tampão Fosfato Salina

PGE₂ - Prostaglandinas 2

p 55 – *palmitoylated membrane protein*

q.s.p – quantidade suficiente para

RNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

RNA – Ácido Ribonucléico

STAT3 – Ativador de Transcrição 3

SOD – superóxido desmutase

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral - alfa

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TnC – troponina C / TnI – troponina I / TnT – troponina T

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste Tukey HSD, espaçamento entre fibras. CT – controle, 2H – 2 horas após o término da sessão de exercício, 3H – 3 horas após o término da sessão de exercícios, 4H – 4 horas após o término da sessão de exercícios, 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média.....44

Gráfico 2 - Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste T para amostras independentes, espaçamento entre fibras – 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, 5H azul de Evans – 5 horas após o término da sessão de exercícios que recebeu o corante azul de Evans, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média.....45

Gráfico 3 - Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste Tukey HSD, quantidade de núcleos. CT – controle, 2H – 2 horas após o término da sessão de exercício, 3H – 3 horas após o término da sessão de exercícios, 4H – 4 horas após o término da sessão de exercícios, 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média.....47

Gráfico 4 - Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste T para amostras independentes, quantidade de núcleos – 5H – 5 horas após o término da sessão de

exercícios, 5H azul de Evans – 5 horas após o término da sessão de exercícios que recebeu o corante azul de Evans, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média.....48

Gráfico 5 - Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste Tukey HSD, quantidade de fibras. CT – controle, 2H – 2 horas após o término da sessão de exercício, 3H – 3 horas após o término da sessão de exercícios, 4H – 4 horas após o término da sessão de exercícios, 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média.....50

Gráfico 6 - Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste T para amostras independentes, quantidade de fibras – 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, 5H azul de Evans – 5 horas após o término da sessão de exercícios que recebeu o corante azul de Evans, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padronização de protocolo de exaustão em esteira ergométrica com velocidade progressiva para ratos <i>Wistar</i> Borges et al,2006.....	29
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo esquemático da molécula de miosina. Adaptado de Barrey, 1995.....	04
Figura 2 -Estrutura do sarcômero. Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004.....	05
Figura 3 - Produção de oxidantes mitocondriais. Reagentes intermediários como superóxido, hidrogênio superóxido, óxido nítrico e peroxinitrito, onde eles causam dano oxidativo, MtNos, óxido nítrico sintase mitocondrial, MnSOD superóxido manganês dismutase. Adaptado de LEEUWENBURGH e HEINECKE, 2001.....	13
Figura 4 - Revisão geral da apoptose, ilustrando o envolvimento de ambos os caminhos, citosólico e mitocondrial, e suas interações. Adaptado de PRIMEAU et al 2002.....	15
Figura 5 – Cinética do lactato no momento da exaustão e no período de recuperação (3,5,10,15 e 20 minutos) após o final do protocolo de exercício de baixa-moderada intensidade.....	34
Figura 6 - Músculos Extensor Longo dos Dedos, visão macroscópica.	35
Figura 7 - Músculo Extensor Longo dos Dedos, posição anatômica distal-proximal (rato, pata esquerda).....	36
Figura 8 - Músculo Extensor Longo dos dedos. Grupo controle (rato, animais não exercitados).....	37

Figura 9. Músculo Extensor Longo dos Dedos. Grupos experimentais (rato, animais exercitados e sacrificados após 2 (a), 3 (b), 4 (c) e 5 h (d) da sessão de exercício).....	39
Figura 10 - Músculo Extensor Longo dos Dedos. Grupo experimental E, animais exercitados e sacrificados 5 h após o exercício.....	40
Figura 11 - Músculo Extensor longo dos dedos. Grupo experimental de animal exercitado e sacrificado 5 h após o exercício.....	41
Figura 12 - Ultra-estrutura de fragmentos de tecido muscular esquelético de animais do grupo E (submetidos ao exercício e sacrificados 5 h após).....	42

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER COMITÊ DE ÉTICA.....	65
ANEXO 2 – PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA.....	67
ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
ANEXO 4 – ATIVIDADES REALIZADAS COM ESTE PROJETO.....	79

RESUMO

O objetivo do estudo foi investigar as diferentes etapas do processo de lesão muscular após uma única sessão de exercício físico de corrida de biomecânica predominantemente concêntrica com intensidade baixa-moderada. Foram utilizados 35 ratos *Wistar* machos com 60 dias de vida. Os animais foram submetidos a um protocolo de adaptação à esteira até completarem 90 dias, em seguida foram submetidos a um protocolo de corrida com intensidade progressiva, sessão única, até a exaustão. Os animais foram separados em grupos referentes ao tempo de sacrifício que ocorreu por decapitação, grupo 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 5 horas azul de Evans e grupo controle. O músculo extensor longo dos dedos (EDL) foi retirado da pata esquerda dos animais e armazenado para posterior preparação. As amostras foram analisadas por meio de microscopia de luz e coloração com Hematoxilina e Eosina para todos os grupos, inclusive dois animais que receberam o corante vital azul de Evans após o período de 5 horas da realização da sessão de exercícios, para análise de alteração da permeabilidade da membrana. Amostras do grupo controle (não exercitado), do grupo 5 horas e 5 horas com administração do corante azul de Evans foram utilizadas para a microscopia eletrônica. Desta forma, foi possível identificar que o exercício de corrida predominantemente concêntrico com intensidade progressiva não causou nenhuma modificação nas estruturas celulares dos grupos 2 e 3 horas, porém os grupos 4 e 5 horas apresentaram maior espaçamento entre as fibras musculares, indício de edema muscular, mais pronunciado no grupo 5 horas e 5 horas azul de Evans. O grupo 5 horas que não recebeu e o que recebeu o corante Azul de Evans apresentou também indícios de aderência de células inflamatórias às paredes dos vasos, resultados confirmados na morfometria de células que analisou o espaçamento entre fibras, quantidade de núcleos e fibras de todos os grupo citados. Ultraestruturalmente, somente os grupos 5 horas e 5 horas azul de Evans foram analisados por microscopia eletrônica, onde foram observadas alterações relacionadas a resposta de ocorrência de apoptose e resposta inflamatória aguda. Alterações teciduais observadas na microscopia de luz foram evidenciadas terem início 4 e 5 horas após o término da sessão de exercício físico. O exercício físico de baixa-moderada intensidade quando executado de forma contínua promove alterações celulares no músculo EDL devido à carga mecânica imposta e fatores

químicos que alteram a permeabilidade da membrana, porém com pequenas alterações significativas ao nível da microscopia de luz.

Palavras – chave: lesão muscular; exercício físico, aspectos histológicos.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the different stages of the muscular lesion process after only one section of predominantly concentric low-medium intensity in 36 rats until exhaustion manner. *Wistar* mice with 60 days of life each were used. The animals were submitted to a treadmill adaptation protocol until complete 90 days after that; they were submitted to only one section of a running protocol with low-medium intensity, until exhaustion. The mice were separated in groups referring to the sacrifice time by decapitation; 2 hours, 3 hours, 4 hours, 5 hours, 5 hours Evans of blue groups and a control group. The extensor *digitorum longus* was removed from the animals' left legs and stored to posterior preparation. The samples were analyzed for all groups by light microscopy and Hematoxylin and Eosin staining including 5 mice that received Evans blue vital 5 hours after the exercises section performance. Samples of control group (not exercised) from 5 hours and 5 hours with Evans blue color administration were analyzed by for electronic microscopy, for indicate permeability alteration of cell membrane. Hence, it was possible identify that the predominantly concentric running with progressive intensity did not modify any cellular structure from 2 and 3 hours groups, however 4 and 5 hours groups presented more space between muscular fibers, a vestige of muscular edema, pronounced on 5 hours and 5 hours Evans blue groups. The 5 hours group that did not receive the Evans blue color also presented vestiges of inflammatory cells adherence to the vessel wall confirmed for morfometry of cells (fibers, quantify nucleus and quantify fibers). Ultrastructural changes only in groups 5 hours and 5 hours with Evans Blue indicating relations to apoptoses and acute inflammatory response. The low intensity exercise continuous alterations in EDL just mechanical load and chemical factor than cause little membrane alteration in light microscopy.

Key words: muscular lesion; physical exercise, histological aspects.

1 – INTRODUÇÃO

Muitos estudos já foram publicados sobre as conseqüências dos exercícios sobre o sistema muscular, porém a grande maioria está voltada à análise das modificações causadas por exercícios predominantemente excêntricos, como corrida em declínio. Em relação aos exercícios predominantemente concêntricos, o número de estudos realizados é bastante reduzido (corrida com inclinação). Poucos estudos, compararam os efeitos dos exercícios principalmente de corrida, predominantemente excêntricos com os concêntricos, onde observou-se que os maiores danos causados pelo exercício foram provocados pela execução de exercícios predominantemente excêntricos, atingindo aspectos estruturais e ultra-estruturais (TRICOLI, 2001). Além disto, é visto que as respostas encontradas em animais são semelhantes às encontradas em humanos (KUIPERS et al; 1983).

Se por um lado, é fato que os exercícios predominantemente excêntricos causam maiores danos ao sistema muscular, a literatura ainda carece de estudos que verifiquem os principais danos causados ao sistema muscular pelos exercícios predominantemente concêntricos, visto que, este tipo de exercício está presente no dia-a-dia dos indivíduos ativos fisicamente e sedentários, durante a realização de caminhadas, corridas e esportes.

No intuito de colaborar com tal temática, este estudo tem como objetivo caracterizar os danos causados pelo exercício físico predominantemente concêntrico realizado até a exaustão, o que geralmente ocorre em indivíduos sedentários e insuficientemente ativos, ou seja, que não praticam atividades físicas regulares com intensidade e duração controladas, caracterizando em diferentes períodos após o final da sessão de exercício as respostas do músculo extensor longo dos dedos, com enfoque estrutural e ultra-estrutural após uma única sessão de exercício físico de baixa-moderada intensidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura e funcionalidade do músculo esquelético

O tecido muscular de vertebrados deriva do folheto para-axial mesodérmico, o qual se condensa em camadas formando os somitos. Estes sob a ação da determinação miogênica se diferenciam e formam populações de miotubos dando origem às miofibrilas, que constituem a fibra muscular (BERCHTOLD et al; 2000).

As miofibrilas são cilíndricas e apresentam diâmetro que varia de 1 a 2 μm , apresentam-se em posição longitudinal à fibra muscular preenchendo quase que totalmente o seu interior. Estruturalmente, as miofibrilas são organizadas pela alternância de faixas claras e escuras e pela presença de unidades repetidas, os sarcômeros. As faixas escuras (anisotrópicas) recebem o nome de banda A, que apresentam também uma zona mais clara ao seu centro, a banda H. As faixas claras (isotrópicas) são chamadas de banda I, no centro de cada banda I existe uma linha transversal constituída de várias proteínas, a linha Z. As bandas e as proteínas estruturais formam um sistema de estriações transversais, paralelas, características de fibras musculares estriadas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As miofibrilas do músculo estriado possuem filamentos finos e grossos, que segundo Schiaffino e Reggiani (1996), os filamentos finos são formados por actina, tropomiosina, troponina e tropomodulina. A actina é formada por um polímero longo, a actina F, e por duas cadeias de monômeros globulares, as actinas G, torcidas umas sobre as outras. A tropomiosina é uma molécula longa e fina, formada por duas cadeias polipeptídicas com arranjo em dupla hélice, em orientação paralela, localizada ao longo do sulco entre os filamentos de actina F. Duas isoformas são encontradas, a tropomiosina α com variação rápida e lenta, e a tropomiosina β . A Troponina é um complexo protéico

formado por três subunidades no músculo esquelético (TnC, TnI e TnT), com funções específicas, sendo que a troponina C (TnC), é a subunidade em que o cálcio se liga, sendo essencial para a ligação com a miosina, possui duas isoformas TnC, a isoforma rápida, com quatro ligações para o cálcio e a TnC lenta, com uma ligação para o cálcio; a troponina I (TnI) que inibe a ação da actina e a atividade da ATPase no músculo esquelético, apresenta também duas isoformas, a TnI rápida e a lenta. A troponina T (TnT) faz a ligação com a tropomiosina e, existe ainda, a tropomodulina, proteína que mantém os filamentos de actina em seu comprimento, onde não existem evidências de isoformas (BARREY et al; 1995).

De acordo com Schiaffino e Reggiani (1996) o filamento grosso representado pela miosina (Figura 1C), e pelas proteínas (proteína C, proteína H, proteína M e miomesina) que se encontram ligadas a esta, servem de apoio e contribuem para a integridade do sarcômero. A miosina é formada por duas cadeias pesadas de proteínas denominadas Cadeia Pesada de Miosina (MHC), (figura 1A) e um filamento fino com duas cadeias leves de proteínas que se enrolam entre si (figura 1B). Na extremidade amino (figura 1C), estas cadeias formam estruturas globulares denominadas cabeça, onde existe um domínio motor contendo ligações para o ATP (Trifosfato de Adenosina) e locais de ligação com a actina (FIGURA 1 A, B e C).

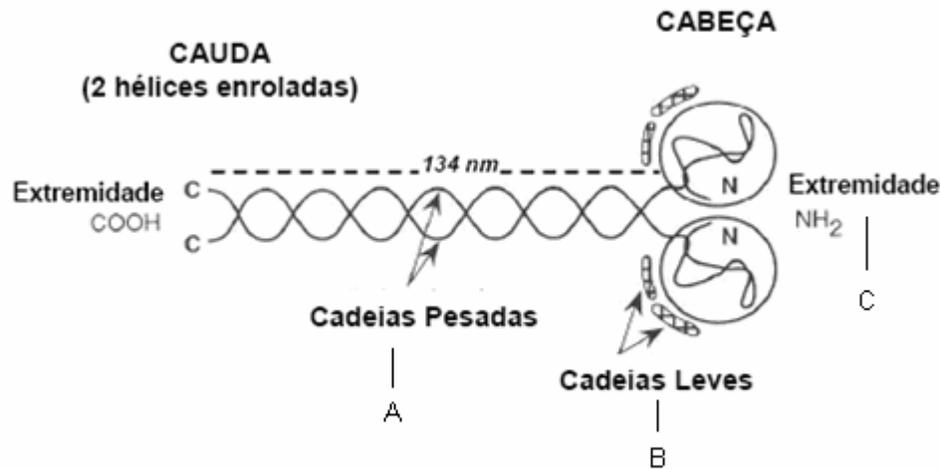


Figura 1A, B e C: Modelo esquemático da molécula de miosina. A) Cadeias pesadas enroladas; B) duas cadeias leves, que na C) extremidade amino, compõem cada cabeça da miosina. Adaptada de BARREY et al; 1995.

Existem ainda a titina, desmina e nebulina. A titina é um filamento elástico que promove a ligação da miosina à extremidade do sarcômero; a desmina está relacionada com a manutenção dos filamentos de actina e miosina, unidos à parede do sarcômero, fazendo a conexão entre dois sarcômeros, e por último, a nebulina localizada próxima à actina, controlando o número de ligações entre troponina e a tropomiosina (GARTNER e HIATT, 1994).

Os sarcômeros são unidades repetidas que aparecem como estriações nas miofibrilas, cada sarcômero é formado pela parte da miofibrila que fica entre duas linhas Z sucessivas e contém uma banda A separando duas semibandas I. O sarcômero é considerado a unidade funcional de geração de força do músculo. Em repouso, consiste em filamentos finos e grossos que se sobrepõem parcialmente (Figura 2) (LIEBER, 1992; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MCGINNIS, 2002). Porém, durante as contrações

musculares, pode ocorrer o encurtamento das miofibrilas em resposta às modificações no tamanho dos sarcômeros, processo que requer resistência à tensão imposta e à manutenção das proteínas contráteis sobrepostas (contração) ou sobrepostas parcialmente (relaxamento) (CLARKSON e SAYERS, 1999).

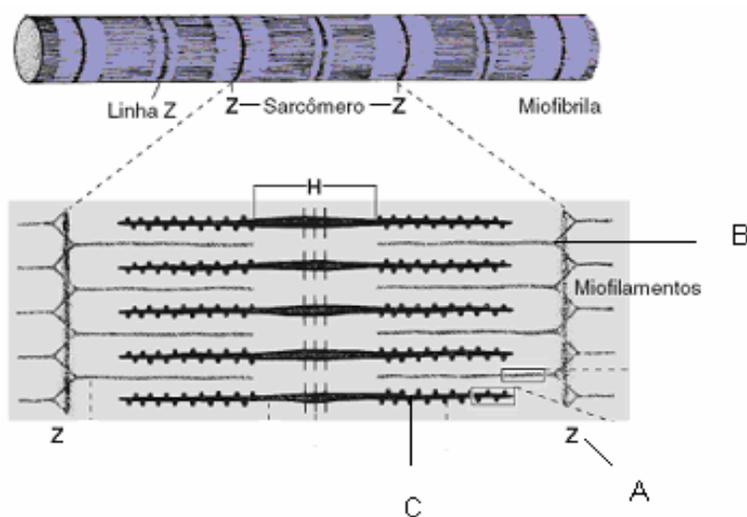


Figura 2 - Estrutura do sarcômero. A) As linhas Z delimitando os sarcômeros; B) Disposição da actina, representada no esquema pelos filamentos finos; C) Miosina, representada pelos filamentos grossos, localizadas entre os filamentos finos. Adaptada de JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004.

Para que o processo de contração inicie, na superfície da fibra muscular existem as placas motoras que recebem informações dos motoneurônios eferentes do sistema nervoso central, que por meio da unidade motora transmite o impulso nervoso para a fibra nervosa, a qual pode enervar desde uma até centenas de fibras musculares. A fibra muscular não é capaz de graduar sua contração, por causa disto, as variações na força de contração muscular são devidas às variações no número de fibras musculares mobilizadas (BERCHTOLD et al; 2000; HAMILTON e BOOTH, 2000; SENE, 2003).

As contrações musculares resultam de um processo que envolve várias etapas; propagação do estímulo nervoso proveniente do sistema nervoso central pela placa motora, com conseqüente liberação da acetilcolina (neurotransmissor) na junção neuromuscular, despolarização da membrana sarcoplasmática e abertura de canais de cálcio presentes na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (HAMILTON e BOOTH, 2000; BERCHTOLD et al; 2000; JESSEN e GOODYEAR, 2005).

Das etapas acima citadas a liberação de cálcio é o estímulo que está diretamente envolvido com as contrações musculares, após a abertura dos canais de cálcio estes íons percorrem o retículo sarcoplasmático até a membrana dos túbulos T, que promovem a transmissão de cálcio ao redor de uma miofibrila. Os íons cálcio combinam-se com a unidade TnC da troponina o que muda a configuração espacial das três subunidades de troponina e, empurra a molécula de tropomiosina mais para o sulco da hélice de actina, desta forma, ficam expostos os locais de ligação dos componentes globulares da actina e esta fica livre para interagir com as cabeças das moléculas de miosina, a combinação de cálcio e a subunidade TnC corresponde à fase em que o complexo miosina – ATP é ativado, como resultado, o ATP é convertido em ADP mais Pi e energia, como a actina está combinada com a miosina, o movimento da cabeça da miosina empurra o filamento de actina promovendo seu deslizamento sobre o filamento de miosina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; HAMILTON e BOOTH, 2000; BARROSO et al 2005; JESSEN e GOODYEAR, 2005).

Considerando as respostas fisiológicas e bioquímicas das fibras musculares frente ao exercício físico, apresenta-se a classificação das fibras. De forma geral, a maioria dos estudos tem adotado apenas a classificação clássica proposta por Brooke e Kaiser (1970), envolvendo três tipos de fibras tipo I, tipo II e intermediárias (OKANO, 2004).

As técnicas mais utilizadas para a identificação de fibras são: método histoquímico por meio da análise da atividade da ATPase e imunohistoquímico com anticorpos específicos para a Miosina de Cadeia Pesada (do Inglês Myosin Heavy Chain- HC) (PETTE, 1998).

O fundamento da análise histoquímica baseia-se no fato de que a enzima ATPase tem como função hidrolisar o ATP durante o processo de contração muscular, com o processo dependendo da velocidade de reação da enzima. O método histoquímico de análise da atividade da ATPase na MHC em diferentes pHs: 4,3; 4,55 e 10,6 permitem que as fibras sejam classificadas como sendo de contração lenta as do tipo I e contração rápida as do tipo II (GUTH e SAMAHA, 1969; BROOKE e KAISER, 1970).

Pela técnica histoquímica mATPase, as fibras musculares são classificadas das mais lentas para as mais rápidas em: I, Ic, Iic, Iiac, Iia, Iiab e Iib (OKANO, 2004).

No meio alcalino as enzimas mATPases das fibras de contração rápida apresentam comportamentos diferenciados. Na realidade, essas respostas diferenciadas das mATPases permitem a distinção de diferentes subgrupos da fibra do tipo II (Iic, Iiac, Iiab e Iib) (CLOSE, 1972).

As fibras que apresentam menor atividade da mATPase, apresentam também menor velocidade de degradação de ATP e são utilizadas em exercícios que exijam contração lenta, chamadas fibras tipo I ou vermelhas. São resistentes à fadiga e importantes na realização de atividades de longa duração, por exemplo, maratonas e ciclismo. Estas fibras possuem maiores concentrações de oxigênio e mioglobina, elevado número de mitocôndrias e enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, além de baixa velocidade de condução de estímulo nervoso, devido ao reduzido número de placas mioneurais. Estas fibras apresentam longo tempo de contração com predomínio de enzimas

oxidativas, incluindo a citrato sintetase e a succinato desidrogenase, as fibras rápidas têm pouco tempo de contração e predomínio das enzimas glicolíticas incluindo fosfofrutoquinase (PFK) e lactato desidrogenase (LDH) (ROSSI e TIRAPEGUI, 1999).

As fibras tipo II também apresentam maior atividade da enzima mATPase e maior velocidade de degradação de ATP, são consideradas fibras de contração rápida, brancas, e mais utilizadas durante o metabolismo anaeróbio, funcionalmente em atividades de saída rápida (explosão), parada brusca e em exercícios intensos até exaustão, são menos resistentes à fadiga e apresentam reduzidas concentrações de mioglobina e mitocôndrias, porém apresentam numerosas placas mioneurais e alta velocidade de condução de estímulo quando comparadas às fibras tipo I. As fibras de contração rápida (tipo II) geram energia anaeróbica com maior velocidade de contração, apresentam características como: alta condução do potencial de ação, rápida propagação de cálcio, alta velocidade de contração e relaxamento, grande capacidade de gerar força, pouca resistência e capilarização (CAMPOS et al; 2002; GREEN et al; 2000).

Baseado no perfil protéico da Cadeia Pesada de Miosina (MHC), existem fibras puras e híbridas. Assim, as fibras puras, são formadas por MHC específicas, são as dos tipos: A, D (também chamada de IIx) e IIB, e as fibras híbridas, tipos IC, IIC, IIAC, IIAD, IIDA, IIBD e IIDB, formadas pela expressão de duas ou mais isoformas da MHC (PETTE, 1998; STARON e PETTE, 1993).

As fibras híbridas resultam da coexpressão de pares específicos de isoformas da MHC. No músculo esquelético de mamíferos adultos foram identificadas onze isoformas, além destas, algumas só se expressam em músculos específicos como diafragma, masseter, tensor do tímpano, músculos oculares e da laringe; outras são distribuídas em vários músculos esqueléticos (PETTE, 1998).

A quantidade de fibras é variável para cada músculo, com a população de fibras puras e híbridas juntas influenciando na dinâmica do tecido. Assim, ao avaliar músculos de ratos, Delp e Duan (1996) e Staron e Pette (1993), mostraram que o sóleo é um músculo com predomínio de fibras tipo I, o tibial anterior, extensor longo dos dedos (EDL) e gastrocnêmio, tem predomínio de fibras tipo II, puras e híbridas, tendo o EDL 38% do tipo IIB, 20% do tipo IIA e apenas 4% de fibras tipo I. Por outro lado, a quantidade de proteínas também interfere na área da fibras, além disso Delp e Duan (1996), nos mostra que a área de secção transversa das fibras musculares de EDL em ratos normais apresenta diferença a relação: IIB>IID>IIA>I, diferentemente do sóleo que apresentou a seguinte proporção: IIB>I>IIA>IID.

2.2 Lesão muscular e exercício físico

A lesão muscular é definida de modo funcional como um dano ao músculo causado por trauma físico sofrido por estes tecidos, gerando situações onde ocorra mau funcionamento do músculo em resposta a alterações morfológicas ou histoquímicas (LAURINO et al; 1994).

Clinicamente a lesão muscular pode ser dividida em: agudização da lesão, aguda ou crônica. A ocorrência de lesão após uma única sessão de esforços repetitivos, pode ser considerada agudização da lesão, quando gerada após esforços repetitivos que causem traumatismos cumulativos, porém restaurados em poucas horas é denominada de lesão aguda. Por outro lado, quando a recuperação muscular ocorre em alguns dias é denominada lesão crônica. Embora as conseqüências fisiológicas, morfológicas e bioquímicas são distintas para cada uma, a ocorrência destas apresenta um eixo em comum, a aplicação de

cargas crônicas (uso excessivo), levando ao enfraquecimento do tecido e redução de força máxima (LAURINO et al; 1994).

O exercício físico pode induzir danos ao músculo por meio de vários fatores, tais como: alteração na estrutura tecidual; produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (RNs); diminuição do pH por maior liberação de íons de hidrogênio (H^+) e conseqüente acúmulo do ácido láctico (agente tamponador) gerado durante o exercício; aumento de temperatura; distúrbios na homeostase do íon cálcio; respostas inflamatórias e síntese de proteínas de choque térmico, estes fatores podem ser analisados através das fases: inicial, autógena, fagocítica e regenerativa (DEL MAESTRO, 1980; LAURINO et al; 1994; PAL YU, 1994; KNIGHT et al; 1999; BERNARDI, 1999; BERCHTOLD et al; 2000; CLEBIS e NATALI, 2001; SMOLKA et al; 2000; KREGEL, 2002).

Em relação às alterações na estrutura tecidual, dependendo do nível de comprometimento das fibras musculares, as lesões podem ser classificadas como microtraumatismos que se apresentam em níveis. O primeiro nível ou grau 1, não demonstra sintomas e é provocado por um estresse local, onde há ruptura mínima das fibras; o grau dois apresenta laceração muscular com hemorragia e o grau três é caracterizado por completa perda da função da maior parte do músculo (CLEBIS e NATALI, 2001).

A fase inicial da lesão muscular está relacionada a fatores como: aumento de temperatura; respiração mitocondrial insuficiente (alteração do mecanismo de bombas de cálcio); queda de pH e produção elevada de radicais livres; rupturas de sarcolema e do retículo sarcoplasmático (LAURINO et al; 1994).

O músculo esquelético é capaz de se adaptar aos exercícios físicos através da ativação celular, onde ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

e de nitrogênio (RNs), estes processos são seguidos por mudanças estruturais e bioquímicas na célula muscular e também nos tecidos vizinhos (McARDLE et al; 2004).

A organela mitocôndria é fonte de produção de energia essencial durante o metabolismo aeróbico, sua principal função consiste na oxidação dos metabólitos energéticos e na conservação de energia pela síntese de ATP, que ocorre em várias etapas principalmente pelo transporte de elétrons. As reações, iniciam-se com pares de elétrons vindos do carreador NADH, que entram na cadeia de transporte no complexo I, e os elétrons provenientes do FADH₂ entram no complexo II. A coenzima Q (também denominada ubiquinona) é uma pequena molécula lipossolúvel que carrega os elétrons do complexo I (vindos do NADH) e II (vindos do FADH₂) para o Complexo III, formado por dez polipeptídeos. No complexo III os elétrons são transferidos do citocromo b para o citocromo c. O Citocromo c, uma proteína periférica de membrana ligada à face externa da membrana interna, transfere os elétrons para o complexo IV (citocromo oxidase), de onde finalmente eles são transferidos para o oxigênio molecular. O oxigênio atua no final de uma seqüência redox, recebendo elétrons em uma redução tetraeletrônica estável para formar água. A energia derivada do transporte de elétrons é acoplada a geração de um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. A energia potencial armazenada nesse gradiente é, então, coletada por um quinto complexo protéico, que acopla o fluxo retrógrado de prótons, energeticamente favorável, à síntese de ATP (BAYNES e DOMINICZAK, 2000; LEEUWENBURGH e HEINECKE, 2001).

Seguindo o processo de transporte de elétrons observa-se que, o aumento do consumo de oxigênio durante ou após o exercício, resulta na formação de EROs,

principalmente em exercícios de alta intensidade e extenuantes, pois, durante a atividade muscular, a demanda metabólica pode aumentar em 35 vezes a demanda de repouso, desta forma, ocorre um grande aumento no consumo de oxigênio e conseqüentemente aumento na produção de EROs. Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo (EO) quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas prooxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes. Com isto, um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular, além de danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e tecidual(LEEUWENBURGH e HEINECKE, 2001; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A figura a seguir esquematiza a produção de Eros a partir da mitocôndria.

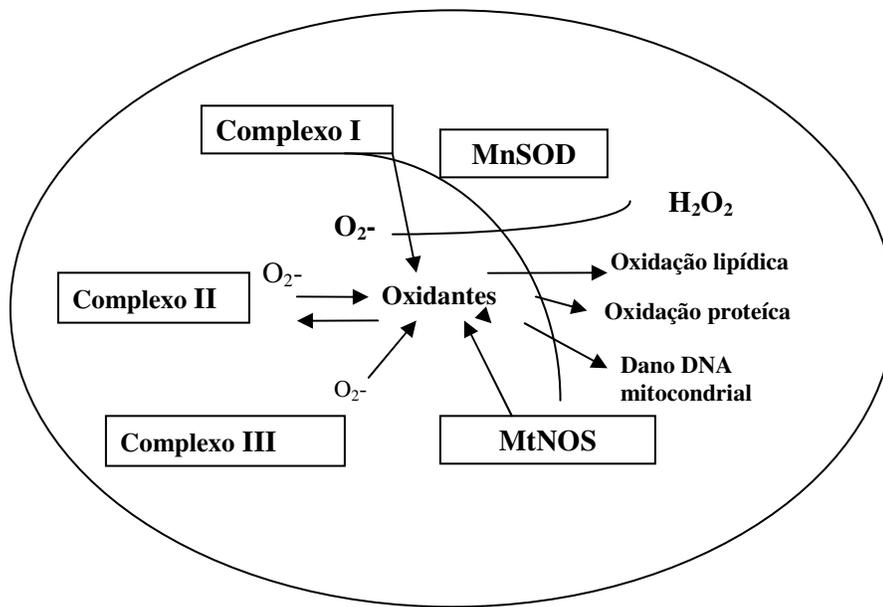


Figura 3 – Produção de oxidantes mitocondriais. Reagentes intermediários como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$), onde eles causam dano oxidativo. Legenda: MtNos, óxido nítrico sintase mitocondrial; MnSOD superóxido dismutase dependente de manganês. Adaptada de LEEUWENBURGH e HEINECKE, 2001.

Outro processo descrito atuar na formação de EROs ocorrem a partir da interrupção temporária da bomba de ATP dependentes de cálcio, levando a aumentos intracelulares de cálcio, o que durante o exercício pode ativar a via da xantina oxidase e concentrações aumentadas de cálcio intramuscular durante este tipo de exercício podem ativar as proteases dependentes de cálcio, as quais convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase. Esta xantina usa o oxigênio molecular ao invés do NAD^+ como aceptor de elétrons, gerando o radical superóxido (Figura 3).

O aumento de cálcio intracelular também pode ativar a enzima fosfolipase A_2 , a qual libera o ácido araquidônico a partir dos fosfolípidos, o aumento do influxo de cálcio também pode alterar a transcrição gênica (CLARKSON e SAYERS, 1999; BERCHTOLD et al; 2000; AOI et al; 2004; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A produção de EROs pode promover a ativação de enzimas antioxidantes (sistema de defesa antioxidante), porém durante o exercício intenso, é provocado um desequilíbrio de EROs e conseqüentemente estresse oxidativo, devido ao predomínio de prooxidantes em relação aos antioxidantes, o estresse do exercício eleva a concentração de catecolaminas que associados levam a célula a sofrer apoptose (DEL MAESTRO, 1980; PAL YU, 1994; CLEBIS e NATALI, 2001; PHANEUF e LEEWENBURGH, 2001).

O processo de apoptose é ativo, no qual a morte da célula é sinalizada por uma cascata de reações enzimáticas. Possui múltiplas etapas caracterizadas por eventos morfológicos, bioquímicos e moleculares, que requerem a regulação coordenada de genes específicos (KROEMER et al; 1998; PODHORSKA-OKOLOW et al; 1999; SANDRI e CARRARO, 1999; HENGARTNER, 2000; PHANEUF e LEEWENBURGH, 2001).

O processo de apoptose é caracterizado pela compactação e segregação da cromatina nuclear com formação de massas granulares bem delimitadas que terminam por margear o envelope nuclear, condensação do citoplasma e convolução dos contornos celulares, controlado por genes com expressão regulada por diferentes sinais extra e intracelulares, tais como: espécies reativas, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), ceramidas, via de ativação de cálcio. Alguns produtos de genes são ativadores de apoptose (Bax, p53, família das enzimas semelhantes a enzima conversora de interleucina 1 β), considerando que outros são inibidores (Bcl-2, Bcl-x1). Sendo assim, na fase final da apoptose o núcleo se desintegra em fragmentos discretos que são circundados por um envelope de parede dupla (corpos apoptóticos), os quais são fagocitados pelas células vizinhas e degradados nos lisossomos (KERR et al; 1974; MAJNO et al; 1995; MERRICK, 2002).

O exercício físico intenso modula muitos fatores que podem alterar o processo de apoptose em vários tecidos. No tecido muscular, glicocorticóides, fatores de crescimento, produção de EROs, aumento da concentração de cálcio intracelular e fator de necrose tumoral (TNF) induzem à apoptose, como demonstrado na figura 4. Na regulação da apoptose a mitocôndria exerce papel chave, uma vez que observa-se um aumento da produção de oxidantes durante o exercício agudo e reduzida atividade de glicocorticóides devido ao aumento da utilização energética, o que causa dano ao DNA e às proteínas. Quantidades significativas de dano ao DNA podem alterar a expressão de proteínas anti e pró- apoptóticas e iniciar o processo apoptótico. O aumento da produção de oxidantes associado à redução de glicocorticóides pode levar a mitocôndria a ativar as caspases (proteínas ativadoras de apoptose), por meio de fatores como citocromo c e fator de indução de apoptose (AIF). A liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol é o evento primário, que se liga ao fator de ativação da protease (Apaf – 1) e ATP, este complexo é capaz de ativar caspase 9 responsável por iniciar a cascata proteolítica de eventos resultantes em apoptose, como demonstrado na figura 4 (BERNARDI, 1999; HENGARTNER, 2000; PHANEUF et al; 2001; POLLACK et al; 2002; PRIMEAU et al; 2002).

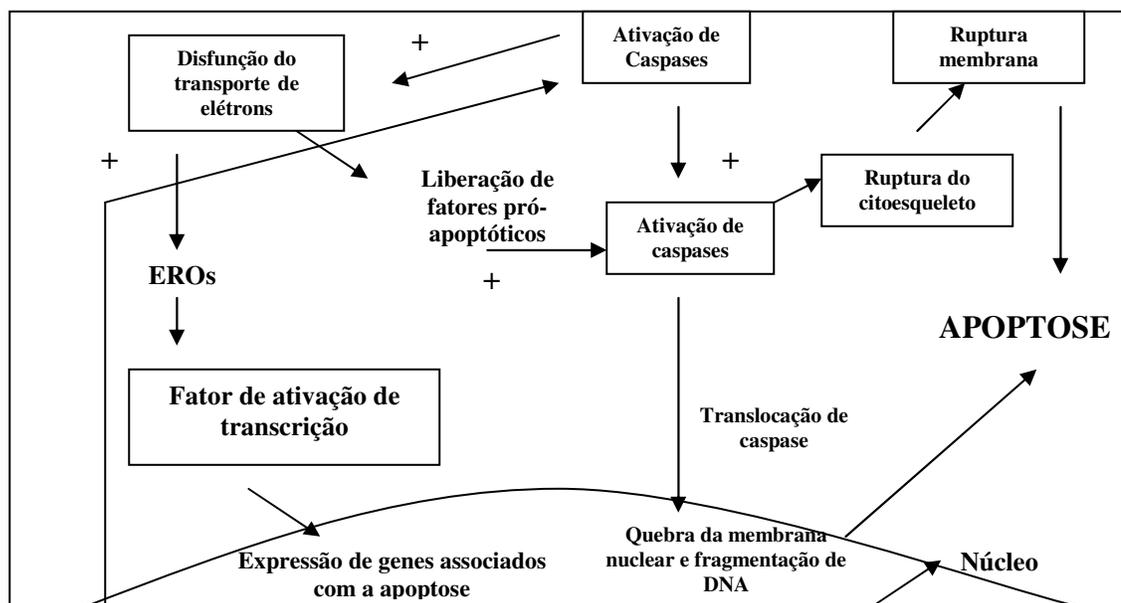


Figura 4. Mecanismo geral da apoptose, ilustrando o envolvimento de ambos os caminhos, citosólico e mitocondrial, e suas interações. A variedade das interações dos receptores-ligantes pode ativar enzimas citosólicas conhecidas como caspases. Elas iniciam a ativação de caspases levando a ruptura da membrana nuclear e plasmática. As caspases podem ativar caminhos que levam a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria. Alternativamente, mudanças no transporte de elétrons mitocondrial agem sobre agentes químicos ou por mutações de DNA mitocondrial que pode levar a formação de EROs. Estes fatores de transcrição ativados levam a síntese de proteínas que podem provocar a inibição de apoptose. Adaptada de PRIMEAU et al; 2002.

Imediatamente após o exercício intenso ocorre redução da expressão de Bcl-2 relativa a Bax, que promove morte celular programada da célula. Quatro dias após o exercício a proporção é totalmente invertida, o excesso de Bcl-2 relativa a Bax é encontrado, o que pode resultar em sobrevivência celular (PODHORSKA- OKOLOW et al; 1999).

A necrose outro evento resultante do dano muscular, tem sido associado à perda do arranjo estrutural, dano a membrana celular, desequilíbrio osmótico, fluxo de íons, intumescimento celular e morte (SANDRI e CARRARO, 1999), processos irreversíveis (STANGEL et al; 1996). Todo tecido necrótico está morto, porém nem todo tecido morto sofreu necrose (MERRICK, 2002).

Assim como no processo apoptótico, o influxo passivo de cálcio e seu acúmulo, são os principais mecanismos responsáveis pela necrose. Há situações em que as células necróticas começam a morrer de forma que a apoptose fez parte do processo inicial denominada de necrose primária, quando a apoptose não fez parte do processo inicial, é denominada necrose secundária (KROEMER et al; 1998; SANDRI e CARRARO, 1999).

Desta forma, quando existe uma severa queda de ATP celular, a apoptose cessa e ocorre necrose. Apoptose e necrose podem ter a mesma via de ativação, por exemplo, a trimerização de receptor de “morte” localizado na superfície celular (Fas) poderá induzir apoptose ou necrose dependendo da possibilidade de ativação de caspases o mesmo sendo observado com o TNF-alfa (TNF- α), podem ainda, coexistir num mesmo tecido por exemplo, durante o infarto do miocárdio. A severidade da isquemia, o tempo e grau de reperfusão determinam qual processo prevalece (HAUNSTETTER e IZUMO, 1998).

Situação semelhante pode ser esperada durante o exercício intermitente intenso, situação em que o tecido muscular está constantemente sob isquemia e reperfusão devido ao desbalanceamento metabólico, inchaço, acidose, digestão lisossomal, hipóxia e predominância do metabolismo anaeróbico, quando esta via não é capaz de exercer sua função, a bomba de sódio e potássio da membrana e outros mecanismos homeostáticos falham resultando em inchaço, morte celular seguida por necrose (MERRICK, 2002).

De acordo com isto, Knight et al (1999) submeteram ratos a isquemia do membro posterior sob forma de torniquete retornando à reperfusão após duas horas. O músculo gastrocnêmio na porção medial foi retirado. Observou-se que após duas horas de isquemia não ocorreram anormalidades histológicas aparentes, 30 minutos após a reperfusão o tecido apresentou edema e neutrófilos em vênulas, que aumentaram sua concentração

progressivamente de 4 a 8 horas no tecido extravascular. Após 24 horas 80% das fibras apresentavam-se necróticas e menores que as demais. Os tecidos intersticiais apresentaram edema, neutrófilos e macrófagos. Em nenhum estágio foi detectado apoptose em fibras normais ou injuriadas, mas houve liberação de enzimas lisossomais.

Após a fase inicial que pode levar ao aparecimento de apoptose e/ou necrose, estabelece-se a fase autógena, caracterizada por degradação de estruturas celulares através de proteólise e lipólise. Processo que ocorre primeiramente com o rompimento da membrana celular e conseqüente perda da homeostase do cálcio, ocorrendo aumento de sua concentração no interior da mitocôndria; alteração da respiração mitocondrial; ativação de enzima (fosfolipase A_2) e prostaglandinas, leucotrienos, proteases lisossomais e radicais livres, além de redução de pH, inchaço osmótico, amplificação da cascata de ativação à apoptose. Com isto, observa-se que o dano celular começa a piorar alguns dias após o exercício atingindo os aspectos ultraestruturais das células através da perda gradual da integridade do sarcolema, o que leva a aumento da concentração de cálcio no exterior da célula afetando o grau de associação entre os filamentos actina e miosina no período de repouso e proporcionando a ativação de enzimas específicas para degradação das fibras musculares (CLARKSON et al; 1992), pois, a tensão provocada pelo exercício ativa os canais de cálcio da membrana facilitando a penetração destes para o interior das fibras e desta forma, ativam proteínas como, calpaina (localizada nas regiões I e Z) responsável por clivar proteínas citoesqueléticas; desmina responsável por atacar miofibrilas no disco Z; sinemina e vimentina que coexistem com desmina atuando de forma semelhante, podem atingir as proteínas contráteis miosina e actina (CLARKSON e SAYERS, 1999; BERCHTOLD et al; 2000; TRICOLI, 2001).

Este período precede em várias horas a invasão de células fagocíticas (LAURINO et al; 1994; MERRICK, 2002). A fase fagocítica (regeneração) surge de quatro a seis horas após o início dos eventos e se mantém por 2 a 4 dias após o exercício, onde ocorre resposta inflamatória no tecido(LAURINO et al; 1994; TRICOLI, 2001).

2.2.1 Fase Fagocítica (Processos de regeneração muscular)

Principalmente após a realização de exercícios com predominância de contrações excêntricas, observa-se grande redução de força imediatamente após o final do exercício onde o período de regeneração pode levar horas até alguns dias, porém, situação diferente é observada em exercícios com predominância de contração concêntrica e exercícios isométricos, onde a força é reduzida e restaurada nas primeiras horas após o exercício (CLARKSON et al; 1992).

Durante a fase fagocítica, vários fatores estão envolvidos na regeneração muscular, tais como, respostas inflamatórias; ativação de células satélites; liberação de EROs e proteínas de choque (Hsp70) e enzimas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; LAURINO et al; 1994; KROEMER et al, 1998; CLARKSON e SAYERS, 1999; KAMI e SENBA 2002; PETERSEN e PEDERSEN, 2005; HWANG et al; 2006).

As respostas inflamatórias aparecem nas fibras primeiramente através dos neutrófilos e macrófagos que liberam prostaglandinas (PGE₂) responsáveis por sensibilizarem os receptores locais de dor, e também produzem radicais livres e enzimas citotóxicas que levam o tecido à degradação (KROEMER et al; 1998; CLARKSON e SAYERS, 1999; PEAKE et al; 2005).

Em exercícios de alta intensidade, imediatamente após o término da sessão, há um incremento de 50 a 100% do número total de leucócitos, principalmente pelo aparecimento

de neutrófilos e em menor proporção monócitos; após um período de 30 minutos é detectado queda de 30 a 50% do nível observado antes do exercício, que perdura de 3 a 6 horas. Os leucócitos apresentam papel de reparo tecidual até 10 horas após o exercício, permanecendo ativos no período de 5 a 10 dias após o exercício (KROEMER, 1998; CLARKSON e SAYERS, 1999; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A interleucina 6 (IL-6) regula a concentração do fator de necrose tumoral – α (TNF- α) que estimula inflamação no músculo esquelético durante exercícios intensos e que provoquem dano celular. Os exercícios intensos provocam aumento da concentração de IL-6 na circulação, assim como a taxa transcricional de ácido ribonucléico (RNA) mensageiro nas fibras, e a redução de glicogênio intramuscular, pois, afirma-se que IL-6 também é capaz de mobilizar substratos ao músculo em contração durante o exercício, além de exercer efeito anti-inflamatório por estimular o aparecimento de interleucinas anti-inflamatórias, tais como: IL-1ra e IL-10 (PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

Outro fator importante na fase de regeneração, de acordo com alguns relatos da literatura como Kami e Senba (2002) é a ativação de células satélites. Aproximadamente três horas após a injúria muscular, a proliferação e sobrevivência de mioblastos da morte celular por apoptose é um estágio regenerativo primário, essencial para a regeneração muscular completa. As células satélites que estão localizadas entre o sarcolema e a membrana basal de miofibrilas exercem papel-chave neste processo, e é pela sinalização do ativador de transcrição 3 (STAT3) que estas são ativadas.

Já mediante a liberação EROs que podem prejudicar algumas proteínas e células, Halliwell e Gutteridge (1989) relatam que fisiologicamente, o organismo pode se defender desta agressão e evitar o agravo da lesão muscular, utilizando-se das reservas de enzimas antioxidantes. O sistema antioxidante enzimático é formado por três tipos de enzimas, as do

tipo superóxido dismutase (SOD) que são representadas pela SOD mitocondrial, manganês dependente e a SOD citoplasmática; as enzimas glutathione peroxidase dependente de selênio (GSH-px) e a Catalase dependente de ferro (CAT). No entanto, o organismo não dispõe de enzimas que atuem sobre o radical hidroxila (OH^{\bullet}), potente causador do estresse oxidativo. Porém, o organismo pode utilizar pequenas moléculas, que diminuem a reatividade do radical hidroxila, tais como as vitaminas A, E e C, o beta caroteno, o ácido úrico e a molécula de glutathione reduzida.

O exercício físico é um estímulo fisiológico capaz de induzir a liberação de proteínas de choque térmico no músculo esquelético. As respostas das proteínas de choque Hsp70 no músculo esquelético podem ser ativadas pelo processo inflamatório, exercendo impacto na facilitação da regeneração ou reparo, melhorando a remodelagem do músculo esquelético não adaptado, exercendo papel também na proliferação e diferenciação de células miogênicas (LIU et al; 2006).

Embora não haja demarcação evidente entre os períodos de degeneração e regeneração, de quatro a seis dias após o evento inicial ocorrem evidências de recuperação de miofibrilas e tecido lesado, e, por volta de 14 dias o tecido muscular parece normal (LAURINO et al; 1994). Corroborando com estes dados Hwang et al (2006), realizaram experimento com ratos *Sprague-Dawley* submetidos à dilaceração do músculo gastrocnêmio, onde a pata direita foi submetida a exercícios de alongamento (estudo) e a esquerda foi tida como controle. Observou-se que o nível de fibrose foi por volta de 50% menor no grupo para estudo do que no grupo controle e que o grupo para estudo demonstrou significativo aumento na regeneração da força após iniciar os exercícios de alongamento passado 14 dias da dilaceração.

2.3. Exercício físico extenuante e lesão muscular

Indivíduos insuficientemente ativos e praticantes de atividades físicas e esportes de forma regular, quando se propõem a realizar atividades físicas intensas e/ou diferentes das quais estão acostumados, tornam-se propensos a sentirem desconfortos, dores e inflamação dos músculos algumas horas após o final da atividade, assim como rigidez do membro, tensão e redução da capacidade de gerar força. A dor não se manifesta até 8 horas após a atividade, aumenta progressivamente nas primeiras 24 horas e alcança o máximo de intensidade entre 24 e 72 horas, após este período há um declínio progressivo, de modo que cinco a sete dias após a atividade, a dor desaparece completamente.

Tanto a atividade física de modo geral, quanto o exercício praticado de forma sistematizada, são desempenhados a partir da contração muscular. Neste contexto, as fibras musculares são importantes para a geração de força, controle do movimento e manutenção da postura (TALAG, 1973; TRICOLI, 2001).

As contrações musculares ocorrem por meio de estímulos neurais, alterando a conformação das estruturas contráteis das fibras musculares. As ativações neurais ocorrem de várias formas, uma delas é a isométrica ou estática, que não causa qualquer modificação no comprimento das fibras musculares, ocorre quando as fibras musculares não são capazes de superar a resistência externa e por isso não se encurtam, como exemplo, a ação de músculos estabilizadores em exercícios de agachamento e corrida em declínio. O termo isotônico é usado para caracterizar as contrações dinâmicas. Nestas, é observado modificações no comprimento das fibras musculares, que se dividem em concêntricas e excêntricas. As contrações concêntricas se referem àquelas em que o músculo apresenta movimento articular à medida que a tensão aumenta, encurtando-se, como exemplo, o movimento de flexão do músculo bíceps braquial, corridas com predomínio de inclinações.

Já as contrações excêntricas, ocorrem quando a resistência externa ultrapassa a força muscular e o músculo se alonga à medida que a tensão aumenta, como exemplo, a extensão do músculo bíceps braquial e corridas com predomínio de declínios. Durante a realização de exercícios com predominância das contrações excêntricas, a quantidade de força é aproximadamente duas vezes superior à força desenvolvida durante as contrações isométricas, no entanto, o número de pontes cruzadas ativas é somente 10% maior, resultando em tensão elevada na estrutura muscular, além do que, um número reduzido de unidades motoras é recrutado quando comparado às contrações concêntricas, o que implica em estresse mecânico elevado na fibra muscular, uma vez que a tensão por área de secção transversa ativa é muito maior. Acredita-se que a tensão mecânica imposta ao músculo esquelético durante uma ação excêntrica é responsável por causar maiores danos às células musculares em comparação às contrações concêntricas (TRICOLI, 2001).

Uma das causas pela qual a contração excêntrica causa maiores danos às fibras, está no fato que, a partir do momento em que estas são extremamente alongadas, os sarcômeros se apresentam muito distendidos, frágeis e incapazes de manter a tensão, causando danos em suas estruturas; embora alguns sarcômeros sejam capazes de suportar esta tensão (CLARKSON e SAYERS, 1999).

A partir desta hipótese de dano aos sarcômeros, Komulainen et al (1994) após analisarem os efeitos em ratos *Wistar* (machos) de corrida intensa com predomínio de contração excêntrica (inclinação negativa - declínio) e concêntrica (inclinação positiva - inclinação) em esteira, velocidade de 17 m/min e inclinação 13,5° (positiva e negativa) em 18 séries de 5 minutos de corrida e 2 minutos de repouso, observaram que o trabalho excêntrico (declínio) causou mais injúria ao tecido muscular do que o trabalho concêntrico (inclinação), por gerar relativamente mais força por área seccional da fibra, além de

modificações apresentadas na concentração de água no interior do músculo (edema muscular), aumento da concentração da enzima creatina quinase no sangue, ruptura de sarcolema, desorganização da linha Z e miofibrilas vizinhas, todos indícios de lesão muscular nos músculos sóleo e quadríceps.

De acordo com isto, Talag (1973) submeteu 60 sujeitos (53 mulheres e 7 homens) saudáveis não praticantes de qualquer tipo de exercício físico a testes de força de braço através de contrações concêntricas e excêntricas (25% da força máxima), e isométricas (30% da força máxima). Foi observado mudanças no volume dos membros e na força após o teste, além de inflamação e dor subjetiva avaliada por meio da *Henry's Pain Rating Scale*. O exercício excêntrico produziu maior grau de inflamação, com pico 48 horas após o final das sessões de exercício, sendo que após 72 horas este pico ainda era maior quando comparado aos outros grupos. No grupo que executou trabalho concêntrico, o pico de inflamação foi atingido após 48 horas e voltou aos níveis pré-exercício entre 48 e 72 horas; após a sessão de contrações isométricas, observou-se que ocorreu aumento de células inflamatórias 24 horas após a sessão de exercícios, voltando aos valores normais em até 48 e 72 horas.

Já Newham et al (1983) submeterem 4 sujeitos saudáveis jovens e sedentários (3 homens e 1 mulher) a 20 minutos de execução de *step* a 15 ciclos por minuto e contração concêntrica e excêntrica com duração de 1 segundo, a altura do banco estava 110% acima do comprimento da perna de cada sujeito. Através de biópsia do músculo quadríceps femoral e análise sanguínea, observaram que, imediatamente após, 30 minutos e entre 24 e 48 horas após a sessão de exercícios, a região muscular que exerceu maior número que contrações excêntricas apresentou maiores danos às células musculares tais como, desorganização de estruturas celulares, sarcômeros e linha Z; durante 24 e 48 horas, as

áreas mais extensivas de dano interno da fibra se mantiveram desorganizadas; neste mesmo período a dor muscular foi severa.

Em exercícios de corrida Hikida et al (1983) analisaram a urina e soro de maratonistas (10 homens jovens saudáveis), após uma corrida de maratona e observaram necrose, inibição da síntese de ATP e mudanças nas propriedades da membrana que resultaram em desequilíbrio iônico na célula, e a concentração de cálcio intracelular ativou a protease intracelular, resultando em destruição da linha Z. Ocorreu também degradação de fibras oxidativas, reduzindo o número de fibras adaptadas à corrida, a inflamação presente no músculo de corredores ocorre em maior quantidade após dias do final da maratona, por mioglobínúria e passagem de leucócitos para o canal vascular, estes leucócitos sugerem inflamação por mudanças celulares e teciduais em resposta ao trauma físico.

Ainda observando os dados dos efeitos dos exercícios sobre o sistema muscular, nota-se que os exercícios com predominância de contrações concêntricas também são responsáveis por causar danos. Smith et al (1989) após submeterem 8 homens jovens sedentários a caminhada em esteira com 10% de inclinação a 50% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2m}) na velocidade de 63,3 e 85 m/min que, em um segundo momento, executaram corrida a 10% de declínio em esteira na velocidade de 120 a 160 m/min por 40 minutos, onde foram retiradas amostras sanguíneas da veia radial 30 minutos antes e nos períodos de 30 minutos, 1 hora, 1 hora e meia; 2 horas; 2 horas e meia; 3 horas; 3 horas e meia; 4 e 5 horas após o exercício para analisar as concentrações de cortisol, eritrócitos e neutrófilos; observaram que, existiu uma diferença significativa entre as duas séries de exercícios, com neutrofilia observada entre 1, 2 e 5 horas após o final do exercício. O exercício com menor intensidade (caminhada) aumentou as concentrações de cortisol e de

eritrócitos. Após a corrida, ocorreu aumento da concentração de neutrófilos que foi atribuído principalmente aos aumentos na concentração de cortisol, foi também observado que o aumento nas concentrações de epinefrina possa ter induzido a neutrofilia, e aumento da circulação de eritrócitos, fato conseqüente de inflamação aguda nos dois grupos, com maior ênfase no grupo que executou corrida.

Portanto, há informações de que os exercícios predominantemente concêntricos também são capazes de causar danos ao sistema muscular, e estes efeitos sobre os animais são semelhantes aos resultados vistos em humanos, pois, Kuipers et al (1983) submeteram ratos a exercícios de corrida em esteira com 10° de inclinação, forma predominantemente concêntrica, e observaram que, no músculo sóleo no período imediatamente após e 2 horas do término do exercício ocorreu migração e infiltração de neutrófilos, porém, o exercício foi executado de forma intermitente.

Corroborando estes dados, Komulainen e Vihko (1994) submeteram ratos a exercícios de corrida na inclinação de 5,5° e velocidade de 17m/min, (predominantemente concêntrico) e observaram que nos músculos quadríceps e sóleo, após 2 horas do término do exercício ocorreu edema, e no período de 12 horas até 4 dias infiltração de células inflamatórias e aparecimento de fibras necrosadas.

3. OBJETIVO

Investigar e caracterizar as respostas do processo de lesão muscular a curto prazo no músculo extensor longo dos dedos, após uma única sessão de exercício físico de corrida predominantemente concêntrica de intensidade baixa-moderada e de forma contínua até a exaustão.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Métodos

4.1.1 Animais

Foram utilizados 35 ratos *Wistar* machos adultos, fornecidos pelo Biotério da Universidade Metodista de Piracicaba-UNIMEP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 e 6 em cada) em ambiente com temperatura de 23°C e ciclo invertido (claro-escuro) controlado de 12 horas. Os ratos tiveram livre acesso à dieta contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios (NUVILAB CR1, NUVTAL Nutrientes LTDA, Curitiba, PR) e receberam água *ad libitum*. Este estudo faz parte do projeto-mãe intitulado “Caracterização da lesão muscular (apoptose ou necrose) no músculo de ratos frente ao exercício físico intenso e a resposta de defesa e reparo – processo 04/06643-1” que foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA – 49/04) do Instituto de Ciências Biomédicas I da USP (maiores detalhes ver anexo 1).

Todos os experimentos laboratoriais realizados seguiram as orientações do “Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vols. 1 e 2 do Canadian Council on Animal Care” (1993).

4.2. Procedimento Experimental

4.2.1 Procedimento de adaptação ao equipamento

Foram utilizados para o experimento 35 ratos *Wistar* (macho) com 60 dias de vida que foram submetidos a adaptação à esteira ergométrica (Modelo ERL, Marca New Primer, 110 volts). Na 1ª semana caminharam durante quatro minutos com velocidade 12m/min, na 2ª semana, cinco minutos na velocidade 13m/min, na 3ª e 4ª

semanas, 10 minutos com velocidade 13m/min, três vezes por semana em dias intercalados entre às 13 e 14 horas. Este procedimento foi realizado até os animais completarem 90 dias onde atingiram peso entre 280 e 300 gramas, peso que se encontra dentro das recomendações do Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) para a realização de procedimentos com animais (GOBATTO et al; 2001).

4.2.2 Protocolo de exaustão

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos: (1) cinco grupos exercitados, corrida em esteira ergométrica até exaustão de forma aguda, (2) um grupo controle, animais sedentários, cada grupo era formado por 6 ratos.

Os animais foram colocados na esteira e submetidos a corrida com velocidade e inclinação aumentados de forma progressiva até a velocidade de 25m/min), onde permaneceram até a exaustão (aproximadamente 1 hora). A exaustão foi definida como o ponto em o animal não foi capaz desempenhar o exercício.

Tabela 1. Protocolo de exaustão em esteira ergométrica com velocidade progressiva para ratos *Wistar*.

Período de exercício (min)	Velocidade (m/min)	Inclinação (% em grau)
5	13	0
5	14	0
5	14	2,5
10	14	5
5	15	5
5	16	5
5	17	5
5	21	5
10	21	10
exaustão	26	10

Fonte: Borges et al; 2006.

4.3 Alterações macroscópicas promovidas pelo exercício físico

Os animais foram divididos de acordo com o período de sacrifício após a sessão de exercício: grupo 2 horas (G/2h); grupo 3 horas (G/3h); grupo 4 horas (G/4h) e grupo 5 horas (G/5h), grupo 5 horas que recebeu o corante vital Azul de Evans. O grupo controle foi mantido no mesmo ambiente que o grupo em treinamento e os animais foram sacrificados após o término da sessão de exercício dos grupos exercitados.

Com o objetivo de padronizar o local da lesão, um animal de cada grupo foi utilizado para o experimento inicial com o corante Azul de Evans, além do grupo 5 horas

azul de Evans. Os animais foram divididos nos mesmos grupos citados acima e após a sessão de exercício receberam administração do corante Azul de Evans, estes primeiramente foram anestesiados com 1,2 mL de Tiopental Sódico (reagente comercial-Thionembutal) na região abdominal, receberam uma injeção via caudal de 5 mL de Azul de Evans (0,5%), após 10 minutos foi realizada a obtenção das amostras. Este procedimento teve como objetivo localizar a área de maior alteração, que no presente estudo avaliou a alteração na permeabilidade vascular. O corante vital Azul de Evans é um marcador de alteração de permeabilidade da célula, não é tóxico .

4.4. Análise histológica estrutural (Anexo 2)

4.4.1 Preparação para coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina

Os animais foram sacrificados por decapitação e o músculo extensor longo dos dedos (EDL) foi rapidamente retirado da pata posterior esquerda dos animais.

Para a obtenção do músculo extensor longo dos dedos (EDL) (2 cm) a pele da pata foi removida e o músculo localizado e retirado evitando danos aos tecidos, o mesmo foi imediatamente fixado para posterior preparação.

As amostras foram imersas no fixador Metacan (Metanol P.A 60%, Clorofórmio P.A 30%, Ácido Acético P.A 10%) onde permaneceram por 5 horas. Em seguida as amostras permaneceram por 12 horas em PBS, após este período foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico, em seguida passaram pelo processo de diafanização e incluídas em Histoiresina.

Os cortes histológicos na espessura de 5µm foram realizados em micrótomo, no total de 10 cortes por rato divididos em 5 lâminas, onde cada lâmina continha 2 cortes, de

forma que cada grupo de animais continha 25 lâminas (50 cortes), sendo um total de 300 cortes em 150 lâminas para os seis grupos: controle (sedentário), e os grupos experimentais sacrificados após a sessão de exercício respectivamente: 2 horas; 3 horas; 4 horas e 5 horas e 5 horas azul de Evans. As secções foram montadas em lâminas de vidro, e então, desparafinizadas, em seguida o material foi hidratado em concentrações decrescentes de álcool etílico e corado com Hematoxilina de Harris no período de 4 a 5 minutos e em seguida com Eosina no período de 1 a 10 minutos. Após a coloração, o material foi desidratado com (banhos rápidos) soluções crescentes de álcool etílico e, por último, foi realizada a clarificação e a montagem das lamínulas sobre as lâminas com Bálsamo de Canadá.

As lâminas foram observadas e fotografadas por Microscópio de Luz Nikon® com câmera acoplada (Nikon Coolpix 5000).

4.4.2. Análise ultra-estrutural

As amostras foram fixadas em glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio durante 2 horas sob gelo, seguido de lavagem no mesmo tampão e fixação durante 1 hora em tetróxido de ósmio. Posteriormente, o tecido foi desidratado pelo uso de álcool etílico em concentrações crescentes, logo após, embebido em óxido de propileno e na concentração 1:1 de óxido propileno e resina de epóxi durante 24 horas. Após estes processos, o material foi incluído em resina epóxi.

Primeiramente, foram obtidas secções semi-finas (400nm) longitudinais coradas com azul de toluidina em banho rápido e submetidas ao fogo até que o corante evapore, logo após foram identificadas as regiões lesionadas para que fossem feitos os cortes

ultrafinos (80nm). Utilizou-se o microscópio eletrônico de transmissão JEM 1010®ELETRON MICROSCOPE APARENT, as imagens dos cortes ultra-finos foram obtidas pela câmera acoplada KODAK® (Megaplus model 1,4,i).

4.5 Análises Morfométricas

Para avaliação do tamanho das fibras, o espaçamento entre elas e a quantidade de núcleos das células musculares do músculo EDL dos grupos experimentais e controle, imagens dos preparados histológicos foram capturadas usando o aumento de 40x no microscópio LEICA® ATC 2000 em sistema de captura com zoom óptico, as imagens foram fotografadas pela câmera COOPLIX NIKON® 5400.

O programa *ImageLab 2000* foi utilizado e permite que sejam selecionadas as áreas de interesse, possibilitando o cálculo do espaçamento existente entre as fibras musculares, o número de fibras e de núcleos presentes nas células musculares, cálculo de área, volume ou a relação da área ocupada entre diferentes estruturas, também permite identificar, selecionar e subtrair estruturas de uma imagem por meio dos espectros R (red), G (green) e B (blue), utilizando tons de vermelho, azul e de verde. Quanto maior for o número de tons de vermelho, azul ou verde e suas combinações no tecido estudado, maiores serão as probabilidades de separar estruturas dentro dos seus limites. O computador faz a varredura de toda a imagem, comparando o valor da cor de cada pixel com uma tabela de padrões previamente selecionados. Se o valor corresponder a algum presente na tabela, este é subtraído da imagem, de tal forma que permanecem somente as estruturas formadas pelos pixels diferentes daqueles pertencentes ao padrão selecionado. Ao final, o computador informa a porcentagem das áreas removidas em relação à área da imagem original de

microscopia de luz (coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina). Foram analisadas 300 imagens, sendo dividido em 50 imagens para cada grupo de animais, sendo 10 imagens de cada lâmina que correspondia a um animal.

4.6 Análise estatística

Todas as variáveis quantitativas foram analisadas estatisticamente através da versão 11.0 do Software SPSS for Windows, adotando-se um nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$) ou intervalo de confiança (CI) de 95%.

Foram analisados dados referentes ao grupo controle e aos grupos experimentais de forma a avaliar: o espaçamento entre fibras, a quantidade de núcleos, a quantidade de fibras relacionados o grupo controle com os grupos experimentais e os grupos experimentais entre si. Para o processamento dos dados foram submetidos primeiramente ao teste de Homogeneidade das variâncias segundo Levene, e uma vez estabelecidos como normais, foram então submetidos ao teste Anova, sendo que os dados paramétricos foram então submetidos aos Post Hoc – Tukey HSD para múltipla comparação. Foi utilizado o teste de Spearman's pela correlação entre as variáveis (espaçamento, núcleo, fibras) e os períodos e finalmente o teste T de variáveis independentes para os grupos exercitados 5 horas e 5 horas Azul de Evans.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do protocolo de exercício

Na etapa de caracterização do protocolo de exercício, as concentrações de lactato sanguíneo apresentaram valores médios de $4,80 \pm 0,40$ mmol/L no momento da exaustão, sendo a cinética de recuperação da lactacidemia considerada normal. Redução de 48% dos valores pós esforço foram observados após 20 minutos do término do protocolo de corrida (Figura 5). O valor de lactato sanguíneo em repouso foi de $1,97 \pm 0,08$ mmol/L.

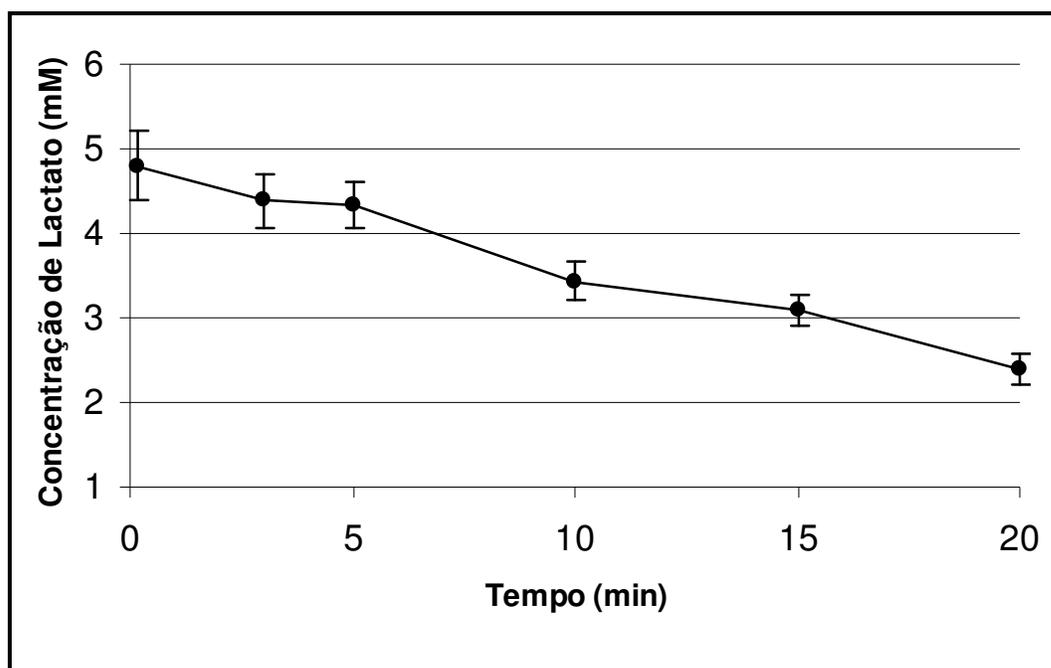


Figura 5 – Cinética da concentração do lactato sanguíneo obtidos nos períodos Imediato, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos após o término do protocolo de exercício proposto (Tabela 2). Os valores são apresentados como média \pm Erro Padrão (EP) de três determinações

5.2 Alteração de permeabilidade vascular

Aumento de permeabilidade vascular no músculo EDL dos animais submetidos ou não a exercícios físicos com predominância de contração concêntrica foi detectado por meio do extravasamento do corante vital, azul de Evans. Regiões de extravasamento do corante foram observadas somente após 5 horas da administração do corante e da realização do exercício (Fig. 6). Animais não exercitados não apresentaram qualquer perda do corante do sistema vascular. Alteração de permeabilidade vascular foi sempre observada nas extremidades distais do músculo (Fig. 7), que foram consideradas como regiões de alteração funcional muscular em decorrência do exercício. Estas regiões foram selecionadas para análise estrutural e ultra-estrutural.

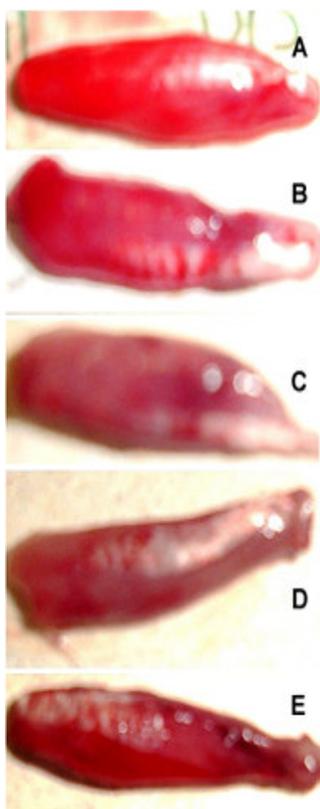


Figura 6. Músculos Extensor Longo dos Dedos, visão macroscópica. Todos os animais receberam azul de Evans 10 minutos antes do sacrifício. (A) animais sedentários. (B-E) Animais submetidos a exercício concêntrico e sacrificados 2, 3, 4 e 5 horas após, respectivamente. Notar que apenas após 5 horas (E) ocorre o extravasamento do corante, observável como manchas azuladas nas extremidades do músculo.



Figura 7. Músculo Extensor Longo dos Dedos, posição anatômica distal-proximal (rato, pata esquerda). O espécime foi obtido 5 horas após a sessão de exercício. O corante azul de Evans foi administrado 10 minutos antes do sacrifício. Notar o extravasamento do corante principalmente na região distal (seta).

5.3 Análise da microscopia de luz e eletrônica

A análise estrutural do músculo EDL de ratos as amostras foram obtidas a partir de cortes transversais e longitudinais e coradas pelo corante Hematoxilina seguido de Eosina.

Para a microscopia eletrônica as amostras foram obtidas a partir de cortes longitudinais.

5.4 Grupo controle

A morfologia do músculo EDL provenientes de animais do grupo-controle ao microscópio de luz e eletrônico foi compatível às clássicas descrições do tecido muscular. Brevemente, foram observados feixes musculares separados por perimísio de espessura normal no qual se encontravam pequenos vasos e nervos. Em corte transversal as fibras apresentavam diferentes dimensões e aspecto poligonal típico, com numerosos núcleos posicionados periféricamente (**Fig. 8a**). Em corte longitudinal, as fibras exibiam estriações transversais e longitudinais peculiares ao músculo esquelético (**Fig. 8b**). Ultra-estruturalmente, sarcômeros de morfologia normal, exibiam linhas Z, bandas A, semi-bandas I, bandas H e linhas M. Túbulos T e cisternas de retículo sarcoplasmático formavam

tríades que se dispunham na altura da interface entre as bandas A e I. Mitocôndrias de matriz eletrondensa estavam distribuídas por todo o sarcoplasma entre as miofibrilas contráteis (**Figs. 8c-d**).

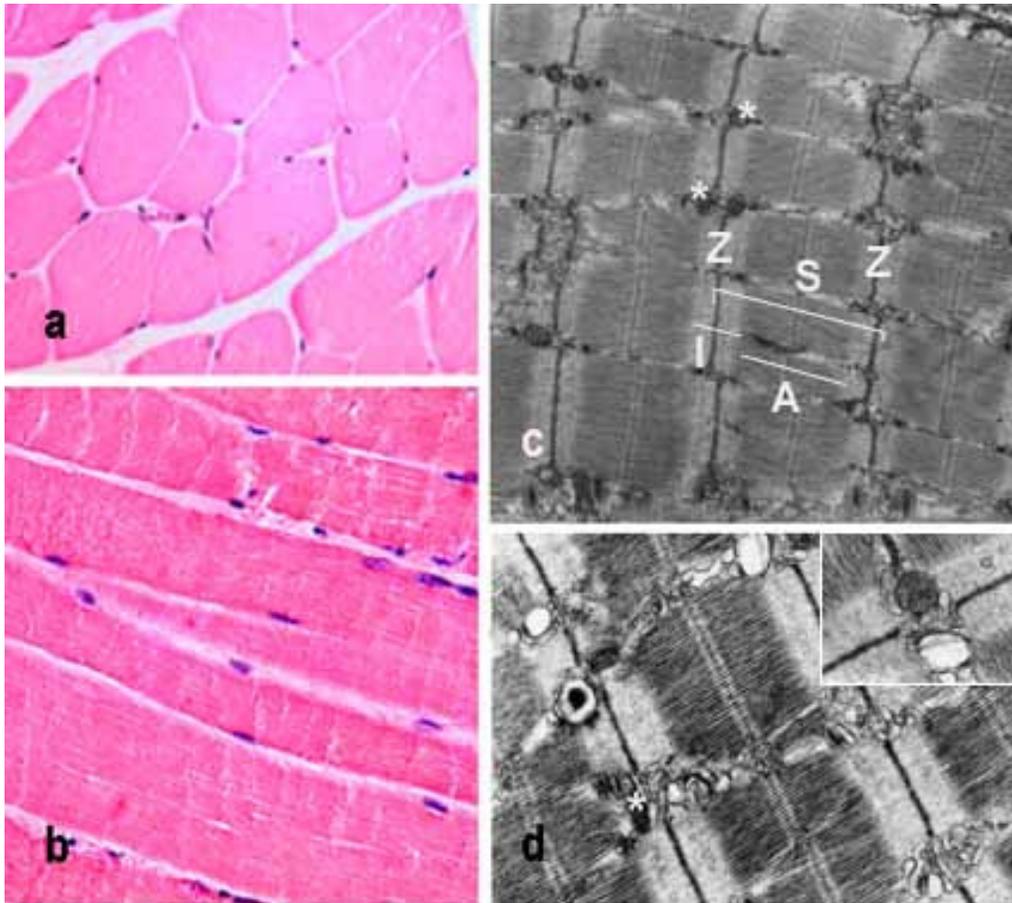


Figura 8. Músculo Extensor Longo dos dedos. Grupo controle (rato, animais não exercitados). As figuras **a** e **b** mostram fibras musculares em corte transversal e longitudinal, respectivamente (HE, **a-b**, 40x). Micrografias eletrônicas de fibras musculares em cortes longitudinais (**c-d**). Notar a morfologia dos sarcômeros (s) e a disposição típica das bandas A, I e da linha Z. (*) mitocôndria; o pormenor delimita uma tríade. **c**, 10.000x; **d**, 15.000x

5.5 Grupos Experimentais

Alterações histológicas só foram observadas nos grupos D e E, respectivamente 4 e 5 horas após o exercício. Como pode ser observado nas figuras **9a** e **b**, nos períodos de 2 e 3 horas após o exercício, nenhuma alteração pode ser flagrada. As características estruturais destas amostras são muito semelhantes às observadas no grupo-controle.

Quatro a 5 horas após o exercício algumas alterações puderam ser encontradas. Na análise histológica, a principal alteração observada foi um maior espaçamento entre as fibras musculares em comparação com o grupo controle, muito provavelmente em decorrência do edema provocado pelo exercício e evidenciado pelo extravasamento de azul de Evans (**Fig. 9c-d**). O espaçamento entre as fibras foi maior nas amostras do Grupo E do que nas amostras do grupo D, sugerindo um processo progressivo (**Fig. 9d, 10c**). Também se observou uma maior concentração de células entre as fibras musculares, no endomísio, muitas das quais puderam ser caracterizadas como leucócitos (**Figs. 9d, 11b-c**). Capilares de luz dilatada e túrgidos também foram achados freqüentes nas amostras destes grupos assim como leucócitos margeando a parede de vasos de pequeno calibre (**Fig. 9c**, pormenor; **Fig. 10a-b**).

Fibras musculares contendo núcleos picnóticos, típicos de processo degenerativo, também foram observadas por entre fibras com núcleos de aparência normal nas amostras dos grupos D e E. Alguns destes núcleos claramente pertenciam às fibras musculares (**Fig. 11a**).

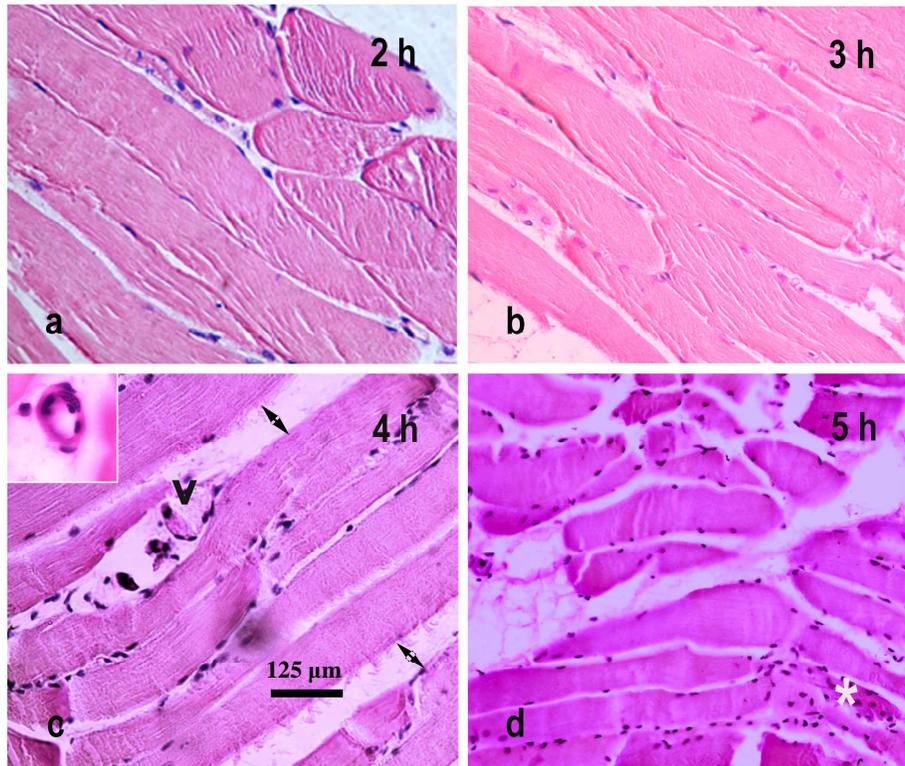


Figura 9. Músculo Extensor Longo dos Dedos. Grupos experimentais (rato, animais exercitados e sacrificados após 2 (a), 3 (b), 4 (c) e 5 h (d) da sessão de exercício). As figuras a e b mostram fibras musculares sem alterações morfológicas. Nas figuras c e d observar o aumento de células (*) entre as fibras musculares, algumas das quais também apresentando espaçamento irregular (\leftrightarrow) e alterado em relação ao controle. Notar também a presença de capilares de luz dilatada (v) (HE, a barra de 1 cm representa 125 μ m em todas as figuras).

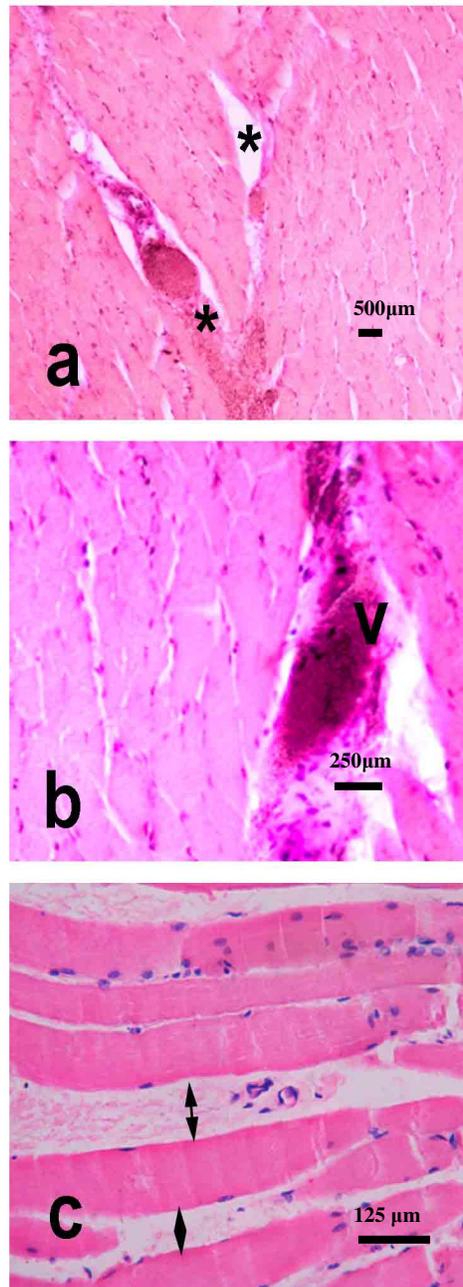


Figura 10. Músculo Extensor Longo dos Dedos. Grupo experimental E, animais exercitados e sacrificados 5 h após o exercício. As figuras **a** e **b** mostram diferentes magnitudes de uma secção histológica em que fibras de espaçamento alterado (*) e um vaso dilatado (v) e repleto de sangue se destacam no endomísio. Notar espaçamento entre fibras musculares também na figura **c**. (HE, em **a** a barra significa 0,25 cm representa 500 μm , em **b** a barra de 0,5 cm representa 250 μm , em **c**, a barra de 1 cm representa 125 μm).

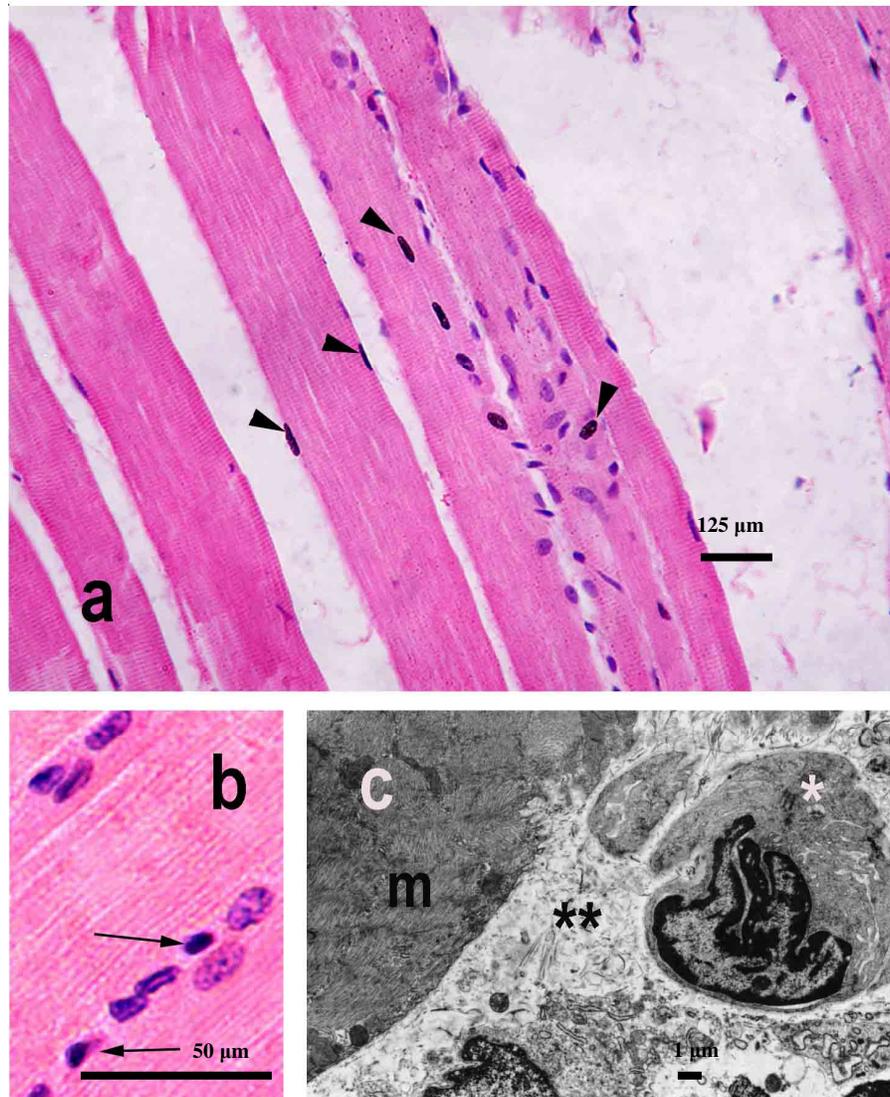


Figura 11. Músculo Extensor longo dos dedos. Grupo experimental de animal exercitado e sacrificado 5 h após o exercício. **(a)** As cabeças de seta mostram núcleos picnóticos de fibras musculares. **(b-c)** Notar a presença de leucócitos no endomísio na microscopia de luz **(b, 40x, setas)** e na microscopia eletrônica **(c, x, asterisco branco)**. **(**)** endomísio; **(m)** fibra muscular. (Em **a**, a barra significa 1 cm que corresponde a 125 μm , em **b**, a barra significa 2,5 cm que corresponde a 50 μm , em **c**, 0,5 cm corresponde a 1 μm)

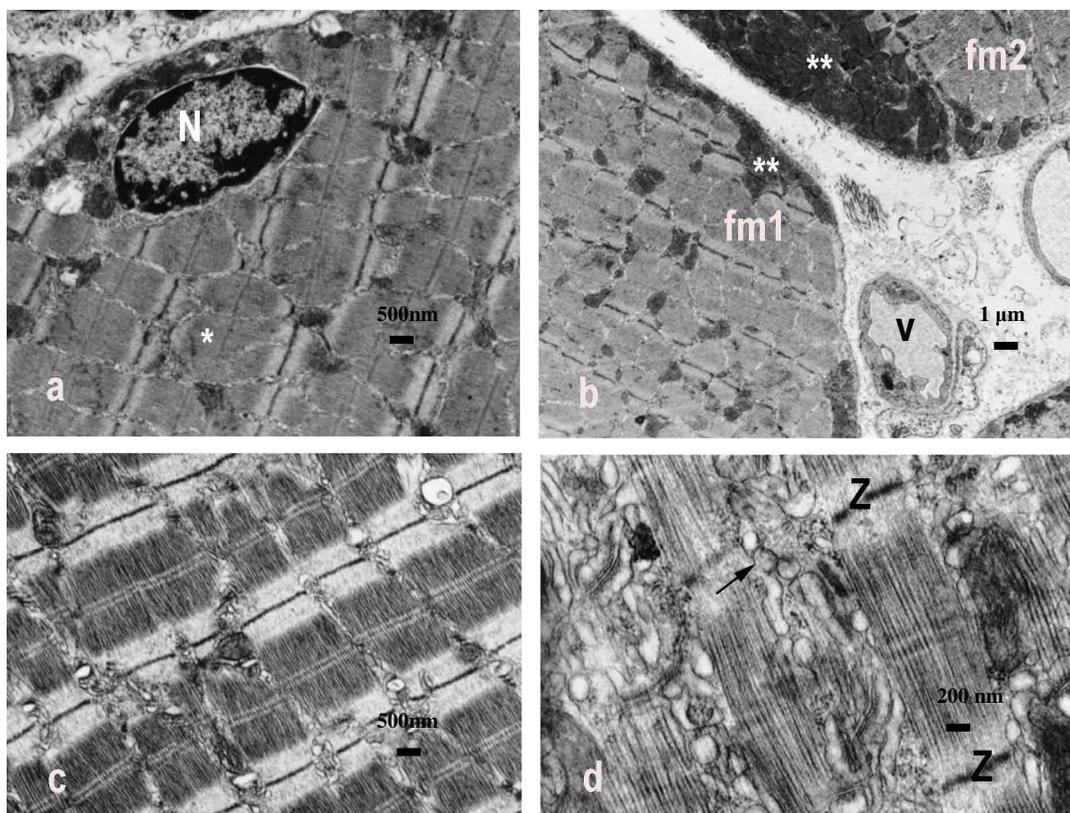


Figura 12. Ultra-estrutura de fragmentos de tecido muscular esquelético de animais do grupo E (submetidos ao exercício e sacrificados 5 h após). Notar a morfologia normal da fibra muscular (*), exceto pelo aumento de heterocromatina associada à membrana nuclear (a, cabeça de seta) e condensação de mitocôndrias na região subsarcolemal (b, **). Nas eletromicrografias c e d destacam-se sarcômeros e tríades (seta) de aspecto normal. (Z) linhas Z; (fm1), (fm2) fibras musculares 1 e 2; (v) capilar no endomísio. a, c a barra corresponde a 500nm que representa 0,5 cm, b, a barra corresponde a 1 μm que representa 0,5 cm, em d a barra corresponde a 200 nm que representa 0,5 cm.

Assim como na microscopia de luz somente foram identificadas alterações ultra-estruturais nas amostras de músculo extensor de animais submetidos ao exercício físico com predominância de contração concêntrica e sacrificados 5 horas após.

Sarcômeros e organelas de modo geral não apresentaram alterações. No entanto, mitocôndrias de matriz eletrondensa, concentradas na periferia celular, imediatamente abaixo da membrana sarcoplasmática foram freqüentes nas amostras deste grupo experimental. Ainda neste grupo, núcleos com maior concentração de heterocromatina, freqüentemente associada a carioteca também foram encontrados. No interstício, uma matriz rica em fibrilas colágenas permeava o espaço intercelular por onde percorriam capilares e arteríolas (**Fig. 12**).

5.6. Medidas morfométricas das células musculares

5.6.1 Análise do espaçamento entre fibras dos grupos controle e exercitados

No gráfico 1 está representado o percentual de espaçamento entre as fibras musculares dos grupos controle e exercitados através da análise de imagens. Os valores variaram entre 7% e 17% nos diferentes grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos 2 horas (2H) e 3 horas (3H) e entre os grupos 3 horas (3H) e 4 horas (4H). Contudo, foram observadas diferenças entre todos os grupos experimentais (2H, 3H, 4H e 5H) em comparação ao grupo controle (9%), nos valores de: 11%, 11,5%, 13%, 18% respectivamente. O grupo 2 horas apresentou valores entre 9% e 11% enquanto que os grupos 4 horas e 5 horas apresentaram valores entre 10,5% e 13%; 17% e 18% respectivamente o que indica diferença significativa entre os grupos; sendo que os grupos 3 horas e 5 horas apresentaram valores entre 10% e 11%; 17% e 18% quando comparados apresentaram diferença significativa; já os grupos 4 horas e 5 horas apresentaram valores em torno de 11% e 13%; 17% e 18% o que também apresentou diferença significativa entre os grupos.

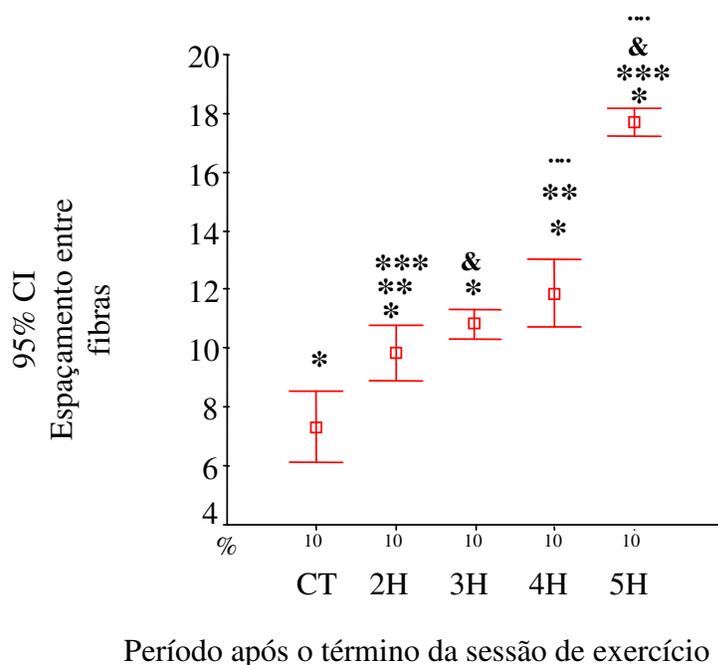


Gráfico 1: Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste Tukey HSD, espaçamento entre fibras. CT – controle, 2H – 2 horas após o término da sessão de exercício, 3H – 3 horas após o término da sessão de exercícios, 4H – 4 horas após o término da sessão de exercícios, 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média. A diferença entre os grupos 2H, 3H, 4H e 5H em relação ao grupo CT foram consideradas significativas (*); as diferenças entre os grupos 2H e 4H foram significativas (**); as diferenças entre os grupos 2H e 5H foram significativas (***), as diferenças foram significativas entre os grupos 3H e 5H (&); as diferenças foram significativas entre os grupos 4H e 5H (···). ($p < 0,05$).

No gráfico 2 está representado o percentual de espaçamento entre as fibras musculares dos grupos exercitados através da análise de imagens. Os valores variaram entre 8,5% e 10,5% para o grupo 5 horas e 9% e 11% para o grupo 5 horas azul de Evans. Não houve diferença significativa entre estes grupos.

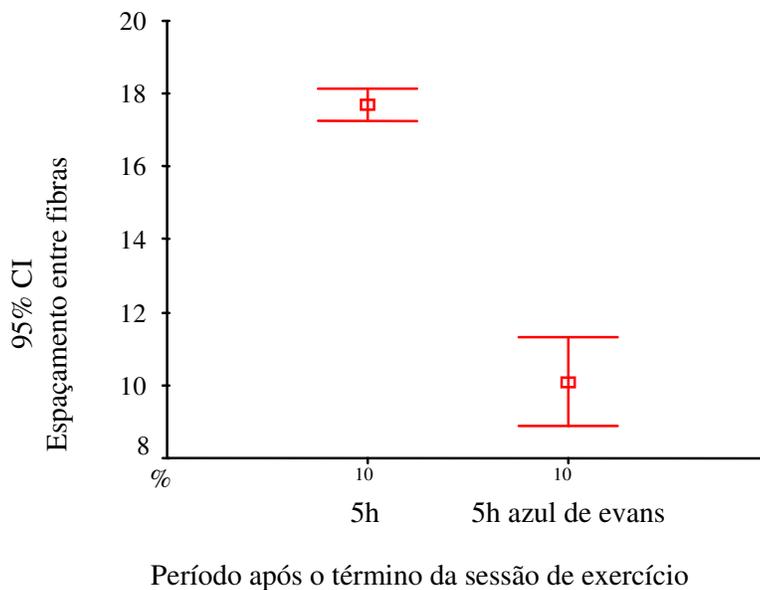
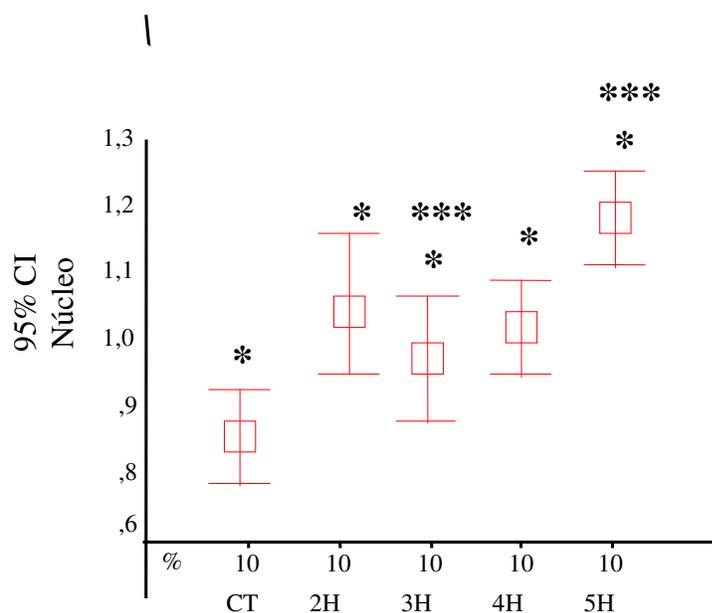


Gráfico 2: Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste T para amostras independentes, espaçamento entre fibras – 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, 5H azul de Evans – 5 horas após o término da sessão de exercícios que recebeu o corante azul de Evans, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média. As diferenças não foram significativas entre os grupos. ($p < 0,05$).

5.6.2. Análise da quantidade de núcleos nas células musculares dos grupos controle e exercitados

No gráfico 3 está representado o percentual de núcleos das células musculares dos grupos controle e exercitados através da análise de imagens. Os valores variaram entre 7,8% e 1,4% nos diferentes grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos 2 horas (2H) e 3 horas (3H) e entre os grupos 2 horas (2H) e 4 horas (4H) e 2 horas (2H) e 5 horas (5H); entre 3 horas (3H) e 4 horas (4H); entre 4 horas (4H) e 5 horas (5H). Contudo, foram observadas diferenças entre todos os grupos experimentais (2H, 3H, 4H e 5H) em comparação ao grupo controle (9,5%), nos valores de: 1,18%, 1,08%, 1%, 1,28% respectivamente. O grupo 3H apresentou valores entre 0,88% e 1% enquanto que o grupo 5H apresentou valores entre 1,1% e 1,28% o que indica diferença significativa entre os grupos.



Período após o término da sessão de exercício

Gráfico 3: Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste Tukey HSD, quantidade de núcleos. CT – controle, 2H – 2 horas após o término da sessão de exercício, 3H – 3 horas após o término da sessão de exercícios, 4H – 4 horas após o término da sessão de exercícios, 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média. A diferença entre os grupos 2H, 3H, 4H e 5H em relação ao grupo CT foram consideradas significativas (*); as diferenças entre os grupos 3H e 5H foram significativas. ($p < 0,05$).

No gráfico 4 está representado o percentual de núcleos das fibras musculares dos grupos exercitados através da análise de imagens. Os valores variaram entre 1,11% e 1,24% para o grupo 5 horas e 0,95% e 1,15% para o grupo 5 horas azul de Evans. Não houve diferença significativa entre estes grupos.

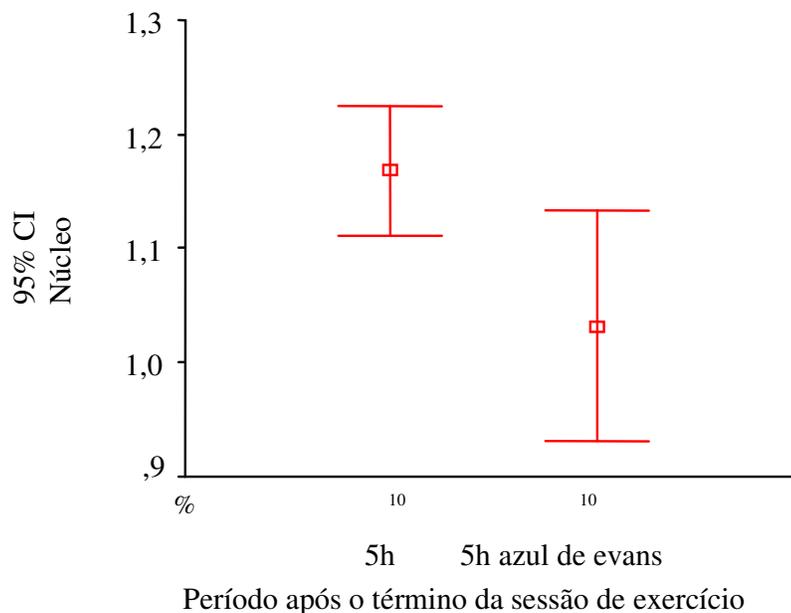


Gráfico 4: Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste T para amostras independentes, quantidade de núcleos – 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, 5H azul de Evans – 5 horas após o término da sessão de exercícios que recebeu o corante azul de Evans, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média. As diferenças não foram significativas entre os grupos. ($p < 0,05$).

5.6.3. Análise da quantidade de fibras nas células musculares dos grupos controle e exercitados

No gráfico 5 está representado o percentual de fibras musculares dos grupos controle e exercitados através da análise de imagens. Os valores variaram entre 81% e 93% nos diferentes grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos 2 horas (2H) e 3 horas (3H) e entre os grupos 3 horas (3H) e 4 horas (4H). Contudo, foram observadas diferenças entre todos os grupos experimentais (2H, 3H, 4H e 5H) em comparação ao grupo controle (93%), nos valores de: 90%, 89,5%, 89%, 81,5% respectivamente. O grupo 2 horas apresentou valores entre 88% e 90% enquanto que os grupos 4 horas e 5 horas apresentaram valores entre 85% e 88%; 80,5% e 81,5% respectivamente o que indica diferença significativa entre os grupos; sendo que os grupos 3 horas e 5 horas apresentaram valores entre 87% e 89%; 80,5% e 81,5% quando comparados apresentaram diferença significativa; já os grupos 4 horas e 5 horas apresentaram valores em torno de 85% e 88%; 80,5% e 81,5% o que também apresentou diferença significativa entre os grupos.

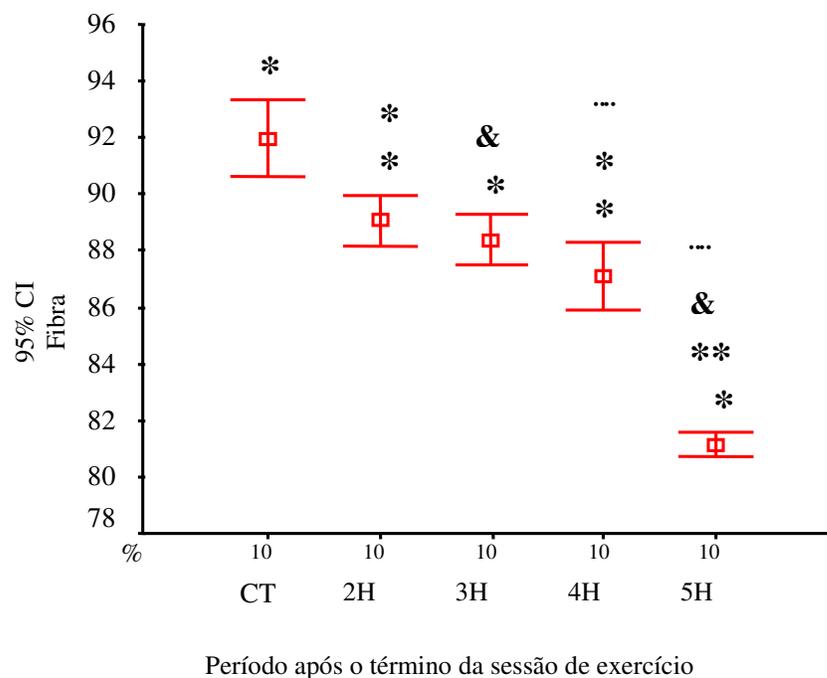


Gráfico 5: Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste Tukey HSD, quantidade de fibras. CT – controle, 2H – 2 horas após o término da sessão de exercício, 3H – 3 horas após o término da sessão de exercícios, 4H – 4 horas após o término da sessão de exercícios, 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média. A diferença entre os grupos 2H, 3H, 4H e 5H em relação ao grupo CT foram consideradas significativas (*); as diferenças entre os grupos 2H e 4H foram significativas (**); as diferenças entre os grupos 2H e 5H foram significativas (***), as diferenças foram significativas entre os grupos 3H e 5H (&); as diferenças foram significativas entre os grupos 4H e 5H (···). ($p < 0,05$).

No gráfico 6 está representado o percentual de fibras musculares dos grupos exercitados através da análise de imagens. Os valores variaram entre 80,5% e 81,5% para o grupo 5 horas e 87% e 91% para o grupo 5 horas azul de Evans. Não houve diferença significativa entre estes grupos.

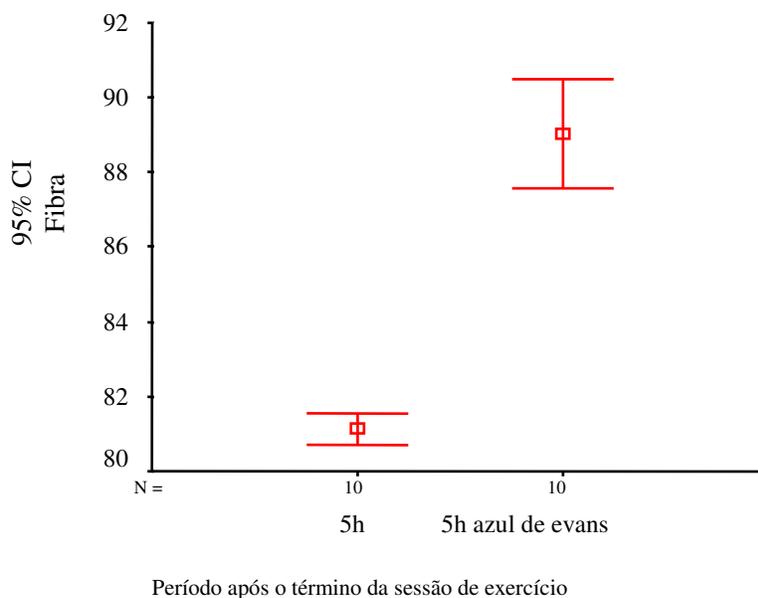


Gráfico 6: Gráfico obtido através da análise estatística dos dados das secções histológicas das células musculares (EDL) de ratos submetidos a uma única sessão de exercício físico de corrida de baixa-moderada intensidade até a exaustão, obtidos através do teste T para amostras independentes, quantidade de fibras – 5H – 5 horas após o término da sessão de exercícios, 5H azul de Evans – 5 horas após o término da sessão de exercícios que recebeu o corante azul de Evans, número de imagens = 10. 95% de probabilidade da média. As diferenças não foram significativas entre os grupos. ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os relatos da literatura em grande maioria fornecem informações sobre os danos musculares causados por exercícios que apresentam biodinâmica de contração predominantemente concêntrica. Neste tipo de contração, a quantidade de força desenvolvida é aproximadamente duas vezes superior à força desenvolvida nas contrações isométricas, porém, o número de pontes cruzadas ativas é somente 10% maior em relação às contrações concêntricas, o que gera alta tensão na estrutura muscular e baixo número de unidades motoras recrutadas, implicando em estresse mecânico e aumento da tensão por área de secção transversa, fato que pode causar danos às fibras por estarem extremamente alongadas e os sarcômeros distendidos, tornando-se frágeis e incapazes de manter a tensão necessária, o que pode desencadear modificações no interior da célula muscular, como: aumento da concentração de água no interior da miofibrila (edema muscular) aumento da concentração da enzima creatina quinase no sangue, ruptura do sarcolema e desorganização da linha Z e miofibrilas vizinhas, todos indícios de dano muscular (CLARKSON e SAYERS, 1999; KUIPERS et al, 1983; KOMULAINEN e VIHKO, 1994; SMITH et al, 1989); TRICOLLI, 2001).

Quanto aos exercícios com predominância da biomecânica de contrações concêntricas, observa-se que estes também são capazes de causar danos musculares, porém em menor proporção, como: edema e inflamação aguda, sem indícios de danos ultraestruturais (KOMULAINEN e VIHKO, 1994; KUIPERS et al, 1983; SMITH et al, 1989).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os aspectos estruturais e ultraestruturais do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos *Wistar* em curto

prazo, após uma única sessão de exercício físico de corrida que apresentava biomecânica predominantemente concêntrica, até a exaustão de baixa-moderada intensidade.

Funcionalmente o músculo EDL apresenta propriedades arquitetônicas referentes a um agente extensor durante a execução de movimentos, ou seja, atua de forma a produzir força moderada e alta capacidade de velocidade em atividades como caminhada e corrida como resultado do seu comprimento (3,55 cm) e de sua baixa área seccional (5,6cm²), isto possibilita a extensão do membro (pé) e o ajuda a manter-se estável no atrito com o solo, o que durante o exercício de corrida aumenta devido à velocidade das passadas (LIEBER, 1992).

Após análise dos relatos da literatura, observou-se que os autores não relatavam as regiões musculares que apresentavam maior lesão causada pelo exercício físico. Por este motivo, o corante vital azul de Evans foi utilizado com o objetivo de avaliar possíveis alterações vasculares e demarcar qual região e período pós-exercício sofreram maior impacto causado pelo exercício físico no músculo EDL. Seguindo esta idéia, Hamer et al (2002) observaram que este corante foi capaz de demarcar alteração de permeabilidade da membrana em ratos *mdx* após exercício de alongamento forçado (semelhante ao exercício excêntrico) e concluíram que este corante foi capaz de indicar a permeabilidade alterada da membrana após vinte minutos.

Neste estudo, observou-se que após a utilização do corante vital azul de Evans a maior ocorrência de extravasamento de corante foram nas regiões proximal e distal do músculo EDL, porém em maior proporção na região distal; observou-se também que a resposta do corante foi tempo-dependente, ou seja, os períodos pós-exercício em que a coloração apresentou-se mais forte foram entre 4 e 5 horas, com maiores evidências após 5 horas do término da sessão (**figura 6 e 7**).

Confirmando estes dados, Botelho et al (2005) ao submeterem ratos *Wistar* à eletroestimulação do músculo tibial anterior por 90 minutos por meio de 2 eletrodos fixados no nervo fibular, onde o músculo encontrava-se em flexão plantar máxima, os animais foram sacrificados 5 dias após este evento. Foram analisadas as regiões proximal, medial e distal deste músculo, e observou-se por meio de microscopia de luz que as três regiões sofreram lesão estrutural, porém a região mais lesada foi a distal, mostrando que as regiões mais extremas, ou seja, as mais próximas aos tendões são as que sofrem maior sobrecarga biomecânica, e que em músculos de membros posteriores, a região distal parece ser a mais lesada em comparação à região proximal.

As amostras analisadas deste estudo demonstraram que ao realizar exercícios de corrida com intensidade baixa-moderada até a exaustão com biomecânica de contração predominantemente concêntrica, a não ocorrência de alterações macroscópicas nos grupos de animais controle (não exercitados) a àqueles sacrificados após 2 e 3 horas do final da sessão de exercício, sendo as imagens muito semelhantes (**figura 6**), assim como as alterações estruturais analisadas por meio de microscopia de luz (**figura 8 a-b**). Diferentemente, Komulainen e Vihko (1995) submeteram ratos *Wistar* ao exercício com predominância de biomecânica de contração concêntrica com intensidade baixa-moderada que não levou os animais à exaustão na velocidade inferior à utilizada neste estudo (17m/min) e inclinação 13,5°, músculo sóleo) estes pesquisadores observaram que o tecido muscular apresentou edema, alteração resultante do aumento do consumo de oxigênio durante a realização do exercício que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio e o organismo encontra-se em situação de estresse oxidativo desequilibrando os sistemas prooxidante e antioxidantes de maneira que o primeiro seja dominante, resultando em

lipoperoxidação da camada lipídica da membrana celular, interrupções temporárias nas bombas de ATP dependentes de cálcio, ocasionando alterações intracelulares.

Os dados deste estudo também divergem dos encontrados por Kuipers et al (1983) que após 2 horas do término da sessão de exercício em ratos *Wistar* com predominância da biomecânica de contração concêntrica em forma de corrida por 60 minutos a 30m/min (não exaustivo, o tempo de corrida representou um total de 70% deste valor – 42 minutos) de intensidade média, onde se observou neutrofilia após 2 horas do término da sessão no músculo sóleo em ratos não treinados, além de alterações ultraestruturais focais 24 horas após o término da sessão de exercício.

Quanto à análise morfométrica, os grupos 2 horas e 3 horas apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle, porém sem diferenças entre si quanto à análise do espaçamento entre fibras, os resultados indicam que as fibras apresentam-se normais (**gráfico 1**), pois, em relação aos grupos 4 horas e 5 horas os resultados foram significativos, e estes grupos apresentaram valores mais elevados (**gráfico 1**), resultado semelhante foi encontrado na microscopia de luz (**figura 9**).

Devido ao exercício aumentar o consumo de oxigênio em até 35 vezes em relação ao estado de repouso, e isto ocasionar alterações na permeabilidade da membrana o que leva a edema, além do aumento intracelular de cálcio que ativa a via da enzima xantina oxidase e ativar as proteases dependentes de cálcio que convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase e esta utiliza o oxigênio molecular como acceptor de elétrons gera o radical superóxido, e causa aumento da concentração de catecolaminas, fatores que associados levam à célula a sofrer apoptose (DEL MAESTRO, 1980; PAL YU, 1994; CLEBIS e NATALI, 2001; PHANEUF e LEEWENBURGH, 2001).

O número de núcleos nas células musculares pode ser alterada devido ao processo de apoptose, ou devido à resposta inflamatória aguda, desta forma foi realizada a medida a análise por meio da microscopia de luz, medida morfométrica dos núcleos das amostras deste estudo. Observou-se que ao nível da microscopia de luz os grupos 2 horas, 3 horas e controle apresentaram semelhança (**figura 8 a-b**), enquanto que a morfometria demonstrou diferença significativa destes dois grupos em relação ao controle, onde o grupo 2 horas apresentou valor maior que o grupo 3 horas, 4 horas. Porém, o grupo 5 horas apresentou maiores valores e somente significativos entre o grupo 3 horas (**gráfico 3**).

O grupo que apresentou maior número de núcleos foi o 5 horas em relação também ao grupo 5 horas azul de Evans (**gráfico 4**), resultado semelhante à microscopia de luz (**figura 10**), ultraestruturalmente, observaram-se modificações nas células musculares dos grupos 5 horas e 5 horas azul de Evans em relação ao controle e entre si, com presença de núcleos picnóticos provavelmente resultantes de um processo apoptótico, de forma que o aumento do número de núcleos pode estar relacionado à resposta inflamatória aguda (**figura 11 e 12**), resultados que se apresentam semelhantes aos encontrados por Newham et al (1983). Estes autores ao analisarem as respostas de exercícios concêntricos e excêntricos, observaram em humanos jovens que a corrida com biomecânica predominantemente excêntrica pode causar alterações ultraestruturais imediatamente após o exercício como alterações focais. Porém 30 minutos e 24 horas após o exercício as alterações foram mais extensivas, como desorganização de fibras e linhas Z. Já os exercícios com predominância biomecânica de contração concêntrica em humanos, não causaram alterações ultraestruturais, observou-se também que as alterações imediatas ocorrem devido ao estresse mecânico e as alterações tardias aos fatores químicos, sendo considerado uma das principais, a alteração da concentração de cálcio que leva à danos na membrana.

Em relação ao número de fibras, os resultados foram significativos em relação ao grupo controle, de forma que, diferentemente dos resultados anteriores, os grupos controle, 2 horas, 3 horas apresentaram valores superiores em relação aos grupos 4 horas e 5 horas (**gráfico 5**), em relação aos grupos 5 horas e 5 horas azul de Evans não foram apresentadas respostas significativas (**gráfico 6**). Estes dados indicam que devido ao maior número de fibras no grupo controle de forma sucessiva até o grupo 5 horas, que as fibras podem estar sofrendo algum tipo de alteração, após a sessão de exercício de forma tempo-dependente, tal qual uma redução no tamanho da fibra, ou até mesmo um processo necrótico após 5 horas do exercício físico.

Observa-se neste estudo, que o motivo pelo qual as alterações ocorrem são pelo fato da carga mecânica imposta ao sistema muscular ser alta, porém em menor proporção aos exercícios predominantemente realizados com biomecânica de contrações excêntricas, ocorreram nas estruturas celulares de forma significativa, porém não ocorreram alterações ultraestruturais de forma significativa. A velocidade e tempo de execução correspondem à intensidade leve-moderada de forma gradativa e contínua.

O protocolo de exaustão aplicado sobre os animais, foi capaz de promover alterações estruturais podendo ser consideradas microlesões com conseqüente resposta inflamatória, sem atingir aspectos ultraestruturais de forma severa, tal qual alterações nos sarcômeros. O processo inflamatório e de regeneração são observados somente após 4 e 5 horas após a sessão de exercício.

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

- Alterações teciduais observadas na microscopia de luz foram evidenciadas terem início 4 e 5 horas após o término da sessão de exercício físico. O exercício físico de baixa-moderada intensidade quando executado de forma contínua promove alterações celulares no músculo EDL devido à carga mecânica imposta e fatores químicos que alteram a permeabilidade da membrana, porém com pequenas alterações significativas ao nível da microscopia de luz.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

AOI, W; NAITO, Y; TAKANAMI, Y; KAWAI, Y; SAKUMA, K; ICHIKAWA, H; YOSHIDA, N; YOSHIKAWA, T. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, 37: (4) 480-487, 2004.

BARBANTI, V. J. **Teoria e prática do treinamento esportivo**, 2 ed. São Paulo: Edgar Blucher LTDA., 1994.

BARREY E., VALLETE JP., JOUGLIN M., PICARD B., GEAY Y. and ROBELIN J., Enzyme-linked immunosorbent assay for myosin chains in the horse. **Reproduction and Nutrition Development**, 35: 619-628, 1995.

BARROSO, R; TRICOLI, V; UGRINOWITSCH, C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, 13(2): 111-122, 2005.

BAYNES, J; DOMINICZAK, M. **Bioquímica Médica**. 1ª ed. Manole, 2000.

BERCHTOLD, M; BRINKMEIER, H; MUNTENER, M. Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. **Physiological reviews**, 80 (3): 1215-1265, 2000.

BERNARDI, P. Mitochondria in muscle cell death. **Italian Journal Neurological Sciences**, 20:395-400, 1999.

BORGES, E; DOMINGUES, S. P. T.; MILANO, L. F.; VERLENGIA, R. Padronização de protocolo de exaustão em esteira ergométrica com intensidade progressiva para ratos Wistar. In: **XX II Congresso Latinoamericano e 1 Ibero Americano**, 2006, Argentina.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. Norma NBR 14724/2002. As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2001.

BORGES, E; DOMINGUES, S. P. T.; MILANO, L. F.; VERLENGIA, R. Padronização de protocolo de exaustão em esteira ergométrica com intensidade progressiva para ratos Wistar. In: **XX II Congresso Latinoamericano e 1 Ibero Americano**, 2006, Argentina.

BROOKE, M. H., KAISER, K. K., Three “myosin ATPase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. **Journal Histochemistry & Cytochemistry**, 18: 670-672, 1970.

BOTELHO, A. P; FACIO, F. A; MINAMOTO, V. B. Modelo de lesão no músculo tibial anterior de rato induzida pela estimulação elétrica neuromuscular / Model for electrical stimulation-induced muscle damage. **Revista brasileira de fisioterapia**; 9(3):313-318, 2005.

CAMPOS, G; LUECKE,T; WENDELN, H; TOMA, K; HAGERMAN, F; MURRAY, T; RAGG, K; RATAMESS, N; KRAEMER, W; STARON, R. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Europe Journal Applied Physiology**, 88: 50-60, 2002.

CLEBIS, N; NATALI, M. Lesões musculares provaocadas por exercícios excêntricos. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, 9: (4), 47-53, 2001.

CLARKSON, P; NOSAKA, K; BRAUN, B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Medicine and Science in Sports Exercise**, 24: (5), 512-520, 1992.

CLARKSON, P; SAYERS, S. Etiology of Exercise-Induced Muscle Damage. **Journal Applied Physiology**, 24(3): 324-348, 1999.

CLOSE, R.I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, 52 (1), 129-197, 1972.

DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta. Physiological. Scandinavia**, 492: 153-168, 1980.

DELP, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **Journal of Applied Physiology**, 80: 261-270, 1996.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Color atlas of histology. Philadelphia, editora Lippincott, 1ª edição, 1994.

GOBATTO CA.,MELLO MA., SIBUYA CY.,AZEVEDO JR., SANTOS LA., KOKUBUM E. Maximal lactate steady state in rats submitted in swimming exercise. **Biochemical Physiology A Molecular Integrity Physiology**, 130 (1): 21 – 27, 2001.

GREEN, H; TUPLING, R; ROY, B; O'TOOLE, D; BURNETT, M; GRANT, S. Adaptations in skeletal muscle exercise metabolism to a sustained session of heavy intermittent exercise. **American Journal Endocrinology Metabolic**, 278: E118-E126, 2000.

Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vols. 1 e 2 do Canadian Council on Animal Care” (1993).

GUTH, L., SAMAHA, F. J., Qualitative differences between actomiosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. **Experimental Neurology**, 25: 138-152, 1969.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine.** 2 ed., Oxford, Clarendon Press, 1989.

HAMER.P.W; MCGEACHIE, J.M; DAVIES, M.J; GROUNDS, M.D. Evans Blue Dye as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **Journal of Anatomy**, 200 (1), 69–79,2001

HAMILTON, M; BOOTH, F. Skeletal muscle adaptation to exercise: a century of progress. **American Physiological Society**, 88: 327-331, 2000.

HAUNSTETTER, A. IZUMO, S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Circulation Research**, 82(11):1111-1129, 1998.

HENGARTNER, M. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407, 2000.

HIKIDA, R; STARON, R; HAGERMAN, F; SHERMAN, W; COSTILL, D. Muscle fiber necrosis associated with human marathom runners. **Journal of the Neurological Sciences**, 59:185-203, 1983.

HWANG, JH; RA, YJ; LEE, KM; GHIL, SH. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. **Archives Physiology Medicine Rehabilitation**, 87(1): 20-26, 2006.

JESSEN, N; GOODYEAR, L. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle **American Physiological Society**, 99: 330-337, 2005.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

KAMI, K; SENBA, E. In vivo Activation of STAT3 Signaling in Satellite Cells and Myofibers in Regenerating Rat Skeletal Muscles. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 50(12): 1579-1589, 2002.

KERR JF, HARMON B, SEARLE J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. **Journal Cellular Science**, 14(3):571-585, 1974.

KNIGHT, K; MESSINA, A; HURLEY, J; ZHANG, B; MORRISON, W; STEWART, A. Muscle cells become necrotic rather than apoptotic during reperfusion of ischaemic skeletal muscle. **International Journal Experimental Pathology**, 80: 169-175, 1999.

KREGEL, K. C. Molecular Biology of thermoregulation invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal Applied Physiology**, 92: 2177-2186, 2002.

KROEMER, G; DALLAPORTA, B; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator apoptosis and necrosis. **Annual Review Physiology**, 60:619-642, 1998.

KUIPERS, H; DRUKKER, J; FREDERIK, M; GEURTEN, P; KRANENBURG, V. Muscle degeneration after exercise in rats. **International Journal Sports Medicine**, 4: 45-51, 1983.

KOMULAINEN, J; VIHKO, V. Exercise-induced necrotic muscle damage and enzyme release in the four days following prolonged submaximal running in rats. **Pflugers Archives**, 428(3-4): 346-351, 1994.

KOMULAINEN, J; VIHKO, V. Does increased Serum Creatine Kinase activity Reflect Exercise-Induced Muscle Damage in Rats? **International Journal Sports Medicine**, 16: 150-154, 1995.

LAURINO, C; ALLOZA, J.F; OLIVEIRA, A. Lesão Muscular. **Supertreinamento**, 1994.

LEEUWENBURGH, C; HEINECKE, W. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. **Current Medicinal Chemistry**, 8: 829-838, 2001.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure and function**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992.

LIU, Y; GAMPERT, L; NETHINGE, K; STEINACKER, M. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. **Frontiers and Bioscience**, 11: 2802 – 2827, 2006.

MAJNO, G., JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal Pathology**, 146: 3-15, 1995.

McARDLE, F; SPIERS, S; IDEMIR, H; BEAVER, A; IWANEJKO, L; McARDLE, A; JACKSON, M. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. **Journal Physiology**, 561:(1), 233-244, 2004.

McGINNIS, P.M. **Biomêcanica do esporte e exercício**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

MERRICK, M. Secondary Injury After Musculoskeletal Trauma: A review and Update. **Journal of Athletic Training**, 37(2): 209-217, 2002.

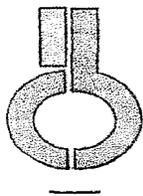
NEWHAM, D; MCPHAIL, G; MILLS, K; EDWARDS, R. Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. **Journal of the Neurological Sciences**, 61:109-122, 1983.

OKANO, A.H. Desempenho físico e respostas eletromiográficas dos músculos vasto lateral, vasto medial e reto femoral durante esforços intermitentes anaeróbio em ciclistas. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

TALAG, T. Residual muscular soreness as influenced by concentric, eccentric, and static contractions. **Research Quarterly of the American Association for health, physical education**, 44:458-469, 1973.

TRICOLI, W. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular tardia. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, 9: (2), 39-44, 2001.

9. ANEXOS**9.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Cidade Universitária “ Armando Salles de Oliveira”
Av. Prof Lineu Prestes, 2415 CEP 05508-000 SP-Brasil
Telefone (55)(011) 30917733 – telefax (55)(011)30917438
Email: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n 049 nas fls. 5 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rozangela Verlengia, Coordenadora da Linha de Pesquisa *Caracterização da lesão muscular (apoptose ou necrose) no músculo de ratos e humanos frente ao exercício físico intenso e a resposta de defesa e reparo* do qual participou(aram) o(s) aluno(s): Leonardo Silveira, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSAO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em 28.09.2004.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof Dr Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

ANEXO 2 - Preparação Histológica

Reagentes

Os reagentes utilizados durante a microscopia de luz e a microscopia eletrônica foram: Xilol PA (Labsynth® Ltda), Álcool Etílico Absoluto P.A (Labsynth ® Ltda), Álcool Etílico Absoluto P.A (Labsynth® Ltda) diluído em água destilada nas concentrações 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, água destilada, tampão PBS (- pH 7,2 +/- 0,1 – Laborclin® Ltda), tampão cacodilato de sódio, tetróxido de ósmio (Sigma ®), Clorofórmio P.A (Synth®), Ácido acético P.A (Synth®), Alúmen de Potássio (Synth®), Iodato de potássio (Synth®), Bromato de Potássio (Mallinck Rodt ®), Ácido Pícrico (J.T Braker Ltda®), Borato de sódio (Synth®).

Os fixadores utilizados foram: Metacan P.A (Synth®), Glutaraldeído P.A (Sigma®), Óxido Propileno P.A (Sigma®). Os corantes utilizados foram: Hematoxilina P.A de Harris (CAQ ® Ltda), Eosina Amarelada P.A (CAQ ®Ltda) e Evans Blue P.A (CAQ ® Ltda). Foram utilizadas a Historesina (Histosec® Pastilhas Merck ®), Resina de Epóxi (Sigma®), Bálsamo do Canadá Sintético (Labsynth®), Anestésico Thionembutal (Tiopental Sódico - CAQ ® Ltda).

Equipamentos e material descartável

Os equipamentos utilizados foram: Esteira ergométrica (Modelo ERL, New Primer, 110 volts), Estufa de secagem e esterilização (Modelo 315 SE Fanem®), Micrótomo (Jobil ®), Ultramicrótomo (JEOL®), Microscópio de Luz (Nikon) com câmera acoplada

(Nikon Coolpix 5000), Microscópio Eletrônico (JEOL®) com câmera acoplada (Megaplus Model 1.4i), microscópio LEICA ATC 2000 com câmera acoplada COOPLIX NIKON® 5400, Banho Maria (Boekel®).

Os materiais descartáveis utilizados foram: luvas de látex para procedimentos (Aurelia®), Lâminas para microscopia (Normax®), Lamínulas (Corning®), becker de diversos tamanhos (Satelit®), tubos Falcon (TRP®), materiais cirurgicos: pinça para dissecação (Erwin Guth®), tesoura cirúrgica (Erwin Guth®), seringa descartável (BD Plastipak®), agulha descartável 3 mL (BD Plastipak®)

Foram utilizados os programas Cânon® (Zoom Browser EX 4.1) para a captura de imagens, os softwares Windows®, Excel® e o Programa Adobe®Photoshop® 7.0.

Preparo das amostras (microscopia de luz)

- Fixação em Metacan (Metanol P.A 60%, Clorofórmio P.A 30%, Ácido acético P.A 10%) por 5 horas;
- 12 horas em PBS (PBS em pó em 1000 mL de água destilada)
- desidratação em soluções crescentes de álcool etílico:
 - 50% (2 trocas com duração de 15 minutos cada)
 - 70% (2 trocas com duração de 20 minutos cada)
 - 80% (30 minutos)
 - 95% (30 minutos)
 - 100% (absoluto P.A, 4 trocas com duração de 1 hora cada)

- diafanização que consistiu em passagens por soluções crescentes de xilol:
 - xilol puro P.A (3 trocas com duração de 20 minutos cada)
- Inclusão em Historesina (2 trocas com duração de 1 hora cada)
- seccionado em micrótomo na espessura de 5 μ m na posição longitudinal
- Montagem das secções em lâminas de vidro
- desparafinização processo que envolve a passagem por diferentes concentrações de xilol P.A e álcool etílico absoluto P.A
 - solução de xilol puro P.A (no período de 25 minutos)
 - concentração de 1:1 de xilol puro P.A e álcool etílico absoluto P.A (5 minutos)
 - hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico:
 - álcool absoluto P.A (10 minutos)
 - 95% (5 minutos)
 - 80% (5 minutos)
 - 70% (10 minutos)
 - água destilada (15 minutos)
 - coloração com Hematoxilina de Harris (0,5 g Hematoxilina P.A, 25 g alúmen de Potássio, 0,1g Iodato de potássio para 400ml de água) no período de 4 a 5 minutos
 - Eosina Amarelada (Eosina (2g Eosina P.A, 20ml de água destilada, 1g Bromato de Potássio, 160ml água destilada, 20ml de solução saturada de ácido pícrico) no período de 1 a 10 minutos.

- desidratação com (banhos rápidos) de soluções crescentes de álcool etílico, 70%, 80%, 95%, 70% e 100% (com 3 trocas de 2 minutos),
 - álcool absoluto P.A
 - xilol na concentração 1:1 (5 minutos)
 - clarificação com xilol puro P.A (2 minutos)
 - xilol puro P.A novamente, o qual permaneceu até a montagem das lamínulas sobre as lâminas com Bálsamo de Canadá.

As lâminas foram observadas e fotografadas por Microscópio de Luz com câmera acoplada .

Preparo das amostras (Microscopia eletrônica)

- fixação em 2,5% de glutaraldeído (25 mL PBS – 0,2M – 5 mL de glutaraldeído P.A, completar com água destilada para 50 mL) em tampão cacodilato de sódio 0,2 mol/L, pH 7.2 (solução A – cacodilato de sódio 4,28g em 50 mL água destilada, solução B – ácido clorídrico 0,1N, solução A mais B e completar com água destilada (q.s.p) até completar 100 mL) durante 2 horas sob gelo, seguido de tampão lavagem e fixação durante 1 hora em tetróxido de ósmio (1mL de tetróxido de ósmio 4%, 1 mL de água destilada, 2mL tampão fosfato);
- desidratação álcool etílico absoluto P.A nas concentrações 70% (2 trocas com duração de 15 minutos cada) , 95% (4 trocas com duração de 15 minutos cada) e 100% (duas trocas de 15 minutos cada), logo após, embebido em óxido de propileno (duas trocas de 15 minutos cada) e na

concentração 1:1 de óxido propileno e resina de epóxi durante 24 horas. Após estes processos, o material foi incluso na posição longitudinal em resina epóxi.

Primeiramente foram obtidas secções semi-finas (400nm) longitudinais coradas com azul de toluidina (azul de toluidina 1,0 g, borato de sódio 4,0g, álcool etílico absoluto P.A 4,0 mL e água destilada 400 mL) em banho rápido e submetidas as fogo até que o corante evapore, logo após foram identificadas as regiões lesionadas para que fossem feitos os cortes ultrafinos (80nm). Através do microscópio eletrônico de transmissão JEM 1010®ELETRON MICROSCOPE APARENT, as imagens dos cortes ultra-finos foram obtidas através da câmera acoplada KODAK® (Megaplug model 1,4,i) .

ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância : DIA x BRANCO; DIA X NÚCLEO e DIA x FIBRA

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BRANCO	2,000	4	45	,111
NÚCLEO	1,441	4	45	,236
FIBRA	1,999	4	45	,111

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BRANCO	Between Groups	591,299	4	147,825	90,284	,000
	Within Groups	73,680	45	1,637		
	Total	664,979	49			
NÚCLEO	Between Groups	,669	4	,167	11,712	,000
	Within Groups	,643	45	,014		
	Total	1,312	49			
FIBRA	Between Groups	639,144	4	159,786	80,157	,000
	Within Groups	89,703	45	1,993		
	Total	728,847	49			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: BRANCO

Tukey HSD

(I) DIA	(J) DIA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	2,00	-2,5160*	,57225	,001	-4,1420	-,8900
	3,00	-3,4920*	,57225	,000	-5,1180	-1,8660
	4,00	-4,5320*	,57225	,000	-6,1580	-2,9060
	5,00	-10,3680*	,57225	,000	-11,9940	-8,7420
2,00	,00	2,5160*	,57225	,001	,8900	4,1420
	3,00	-,9760	,57225	,441	-2,6020	,6500
	4,00	-2,0160*	,57225	,008	-3,6420	-,3900
	5,00	-7,8520*	,57225	,000	-9,4780	-6,2260
3,00	,00	3,4920*	,57225	,000	1,8660	5,1180
	2,00	,9760	,57225	,441	-,6500	2,6020
	4,00	-1,0400	,57225	,377	-2,6660	,5860
	5,00	-6,8760*	,57225	,000	-8,5020	-5,2500
4,00	,00	4,5320*	,57225	,000	2,9060	6,1580
	2,00	2,0160*	,57225	,008	,3900	3,6420
	3,00	1,0400	,57225	,377	-,5860	2,6660
	5,00	-5,8360*	,57225	,000	-7,4620	-4,2100
5,00	,00	10,3680*	,57225	,000	8,7420	11,9940
	2,00	7,8520*	,57225	,000	6,2260	9,4780
	3,00	6,8760*	,57225	,000	5,2500	8,5020
	4,00	5,8360*	,57225	,000	4,2100	7,4620

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NÚCLEO

Tukey HSD

(I) DIA	(J) DIA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	2,00	-,2640*	,05345	,000	-,4159	-,1121
	3,00	-,1680*	,05345	,023	-,3199	-,0161
	4,00	-,1980*	,05345	,005	-,3499	-,0461
	5,00	-,3480*	,05345	,000	-,4999	-,1961
2,00	,00	,2640*	,05345	,000	,1121	,4159
	3,00	,0960	,05345	,389	-,0559	,2479
	4,00	,0660	,05345	,731	-,0859	,2179
	5,00	-,0840	,05345	,523	-,2359	,0679
3,00	,00	,1680*	,05345	,023	,0161	,3199
	2,00	-,0960	,05345	,389	-,2479	,0559
	4,00	-,0300	,05345	,980	-,1819	,1219
	5,00	-,1800*	,05345	,013	-,3319	-,0281
4,00	,00	,1980*	,05345	,005	,0461	,3499
	2,00	-,0660	,05345	,731	-,2179	,0859
	3,00	,0300	,05345	,980	-,1219	,1819
	5,00	-,1500	,05345	,054	-,3019	,0019
5,00	,00	,3480*	,05345	,000	,1961	,4999
	2,00	,0840	,05345	,523	-,0679	,2359
	3,00	,1800*	,05345	,013	,0281	,3319
	4,00	,1500	,05345	,054	-,0019	,3019

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: FIBRA

Tukey HSD

(I) DIA	(J) DIA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	2,00	2,9060*	,63141	,000	1,1119	4,7001
	3,00	3,6060*	,63141	,000	1,8119	5,4001
	4,00	4,8480*	,63141	,000	3,0539	6,6421
	5,00	10,8420*	,63141	,000	9,0479	12,6361
2,00	,00	-2,9060*	,63141	,000	-4,7001	-1,1119
	3,00	,7000	,63141	,801	-1,0941	2,4941
	4,00	1,9420*	,63141	,028	,1479	3,7361
	5,00	7,9360*	,63141	,000	6,1419	9,7301
3,00	,00	-3,6060*	,63141	,000	-5,4001	-1,8119
	2,00	-,7000	,63141	,801	-2,4941	1,0941
	4,00	1,2420	,63141	,298	-,5521	3,0361
	5,00	7,2360*	,63141	,000	5,4419	9,0301
4,00	,00	-4,8480*	,63141	,000	-6,6421	-3,0539
	2,00	-1,9420*	,63141	,028	-3,7361	-,1479
	3,00	-1,2420	,63141	,298	-3,0361	,5521
	5,00	5,9940*	,63141	,000	4,1999	7,7881
5,00	,00	-10,8420*	,63141	,000	-12,6361	-9,0479
	2,00	-7,9360*	,63141	,000	-9,7301	-6,1419
	3,00	-7,2360*	,63141	,000	-9,0301	-5,4419
	4,00	-5,9940*	,63141	,000	-7,7881	-4,1999

*. The mean difference is significant at the .05 level.

BRANCOTukey HSD^a

DIA	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
,00	10	7,3340			
2,00	10		9,8500		
3,00	10		10,8260	10,8260	
4,00	10			11,8660	
5,00	10				17,7020
Sig.		1,000	,441	,377	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000.

NÚCLEOTukey HSD^a

DIA	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
,00	10	,8200		
3,00	10		,9880	
4,00	10		1,0180	1,0180
2,00	10		1,0840	1,0840
5,00	10			1,1680
Sig.		1,000	,389	,054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000.

FIBRATukey HSD^a

DIA	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
5,00	10	81,1300			
4,00	10		87,1240		
3,00	10		88,3660	88,3660	
2,00	10			89,0660	
,00	10				91,9720
Sig.		1,000	,298	,801	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10,000.

Nonparametric Correlations

Teste de normalidade das variáveis

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		BRANCO	NÚCLEO	FIBRA	DIA
N		50	50	50	50
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	11,5156	1,0156	87,5316	2,8000
	Std. Deviation	3,68388	,16365	3,85674	1,73793
Most Extreme Differences	Absolute	,195	,151	,198	,155
	Positive	,195	,086	,127	,146
	Negative	-,124	-,151	-,198	-,155
Kolmogorov-Smirnov Z		1,378	1,066	1,397	1,096
Asymp. Sig. (2-tailed)		,045	,206	,040	,181

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Correlations

			DIA	BRANCO
Spearman's rho	DIA	Correlation Coefficient	1,000	,906**
		Sig. (2-tailed)	,	,000
		N	50	50
	BRANCO	Correlation Coefficient	,906**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	,
		N	50	50

** . Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

Correlations

			DIA	NÚCLEO
Spearman's rho	DIA	Correlation Coefficient	1,000	,495**
		Sig. (2-tailed)	,	,000
		N	50	50
	NÚCLEO	Correlation Coefficient	,495**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	,
		N	50	50

** . Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

Correlations

			DIA	FIBRA
Spearman's rho	DIA	Correlation Coefficient	1,000	-,901**
		Sig. (2-tailed)	,	,000
		N	50	50
	FIBRA	Correlation Coefficient	-,901**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	,
		N	50	50

** . Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

Teste Estatístico T para amostras independentes: grupo 5h x grupo 5h azul de evans

Teste de normalidade das variáveis

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

DIA			BRANCO	NÚCLEO	FIBRA
5h	N		10	10	10
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	17,7020	1,1680	81,1300
		Std. Deviation	,62988	,07955	,59645
	Most Extreme Differences	Absolute	,199	,256	,186
		Positive	,141	,124	,186
		Negative	-,199	-,256	-,132
	Kolmogorov-Smirnov Z		,629	,810	,589
	Asymp. Sig. (2-tailed)		,823	,527	,878
5h azul de evans	N		10	10	10
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	10,0980	1,0320	89,0320
		Std. Deviation	1,71805	,14148	2,06140
	Most Extreme Differences	Absolute	,171	,211	,156
		Positive	,122	,122	,156
		Negative	-,171	-,211	-,137
	Kolmogorov-Smirnov Z		,540	,666	,494
	Asymp. Sig. (2-tailed)		,932	,767	,968

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Group Statistics

DIA		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
BRANCO	5h	10	17,7020	,62988	,19919
	5h azul de evans	10	10,0980	1,71805	,54329
NÚCLEO	5h	10	1,1680	,07955	,02516
	5h azul de evans	10	1,0320	,14148	,04474
FIBRA	5h	10	81,1300	,59645	,18861
	5h azul de evans	10	89,0320	2,06140	,65187

Teste T para amostras independentes

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
BRANCO	Equal variances assumed	8,028	,011	13,141	18	,000	7,6040	,57866	6,38829	8,81971
	Equal variances not assumed			13,141	11,377				,000	7,6040
NÚCLEO	Equal variances assumed	1,242	,280	2,650	18	,016	,1360	,05133	,02816	,24384
	Equal variances not assumed			2,650	14,174				,019	,1360
FIBRA	Equal variances assumed	9,188	,007	-11,644	18	,000	-7,9020	,67861	-9,32771	-6,47629
	Equal variances not assumed			-11,644	10,496				,000	-7,9020

9.4 ATIVIDADES REALIZADAS COM ESTE PROJETO

XXII Congreso Latinoamericano y Iro Iberoamericano de Ciencias Fisiológicas 4 ai
7 de noviembre, 2006

International Society for Beart Research
XV Meeting - Latin American Section

Solis 453 «CI078AA1), Ciudad de Bueeos Aires,Argentina www.cougreso-alad.safisiolOrg.ar
Orgaoizad by tbe Argeutine Physiological Society
[www .s~lfisiol.on!.flr_](http://www.s~lfisiol.on!.flr_); [sêlfisiol\(a\)safisiol.org. ï r](mailto:sêlfisiol(a)safisiol.org. ï r)

Por la presente se certifica que la contribución cuyo autor principal es

Livia Pascoti Lapin

ha sido aceptada y presentada en forma de "poster" en este Congreso

~

Prof Mario Parisi
Congress Vice-President, Presidente
Sociedad Argentina de Fisiología



XXII Congreso Latinoamericano y Iro Iberoamericano de Ciências Fisiológicas

Solis 453 «CI078AAI), Ciudad de Buenos Aires, Argentina www.congreso-alacf.safisiol.org.ar
Organizado por la Sociedad Argentina de Fisiología, www.safisiol.org.ar; safisiol@safisiol.org.ar

Por la presente se certifica que

Livia Pascoti Lapin

participó de este Congreso y presentó un trabajo titulado

Lesão muscular e exercício concêntrico: Aspectos Histológicos em diferentes períodos pos-exercício. Uvia Lapin¹; Estela Belivacquaz; Luis Cláudio Silva Tangerin⁰¹; Luis Felipe Teixeira¹; Wagner Silva¹; Adriane Palanch¹; Cláudia Cavaglieri¹; Rozangela Verlengia¹. ¹ Núcleo de Performance Humana - Mastrado em Educação Física, Faculdade de Ciências da Saúde- UNIMEP, Piracicaba - SP, Brasil. ² Laboratório de Biologia Trofoblasto, Departamento de Biologia do Trofoblasto, São Paulo, Brasil.

en la ciudad de Buenos Aires de 4 a 7 de noviembre de 2006

Prof. Mario Parisi
Congress Vice-President
Presidente Sociedad Argentina de Fisiología