

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO
MOVIMENTO HUMANO

Efeito da natação sobre as estruturas histológica e molecular dos
músculos esqueléticos e no eletrocardiograma de ratas envelhecidas.

Douglas Massoni Ramos

2015

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DOUGLAS MASSONI RAMOS

Efeito da natação sobre as estruturas
histológica e molecular dos músculos
esqueléticos e no eletrocardiograma de ratas
envelhecidas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Ciências do Movimento Humano, Área de concentração: Biodinâmica, Linha de pesquisa: Avaliação e Reabilitação Funcional.

Orientadora: Profª Drª Adriana Pertille

PIRACICABA
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Marjory Harumi Barbosa Hito CRB-8/9128

R175e	Ramos, Douglas Massoni Efeito da natação sobre as estruturas histológica e molecular dos músculos esqueléticos e no eletrocardiograma de ratas envelhecidas/ Douglas Massoni Ramos. – 2015. 57 f. : il. ; 30 cm. Orientadora: Adriana Pertille. Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, 2015. 1. Natação. 2. Envelhecimento. 3. Músculo esquelético. I. Ramos, Douglas Massoni. II. Título.
-------	---

CDU – 797.2

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que contribuíram para que essa obra fosse concluída, em especial à minha família, por todo apoio e o incentivo durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por me permitir a oportunidade da realização de mais um sonho;

Aos meus pais, Madalena e João (*in memoriam*), pelo incentivo, paciência e por todo amor e carinho, por acreditarem e confiarem mim e pelo suporte dado até nos dias de hoje.

As minhas irmãs, Andréia e Adriana, pelas palavras de incentivo.

A Prof^a Dr^a Adriana Pertille, pela orientação, dedicação e paciência durante todo esse processo, além do apoio, incentivo e pelas palavras de sabedoria ditas nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Silva, pelas contribuições feitas no decorrer do trabalho, contribuindo ricamente para a conclusão do protocolo experimental, além de toda atenção dada por ele quando necessária.

Aos membros da banca, por dispender um tempo para a contribuição e colaboração e correção do trabalho.

A todos os amigos do laboratório e aos colegas do mestrado, que contribuíram para a minha formação, mostrando visões diferentes que colaborou para minha evolução durante esse processo. Um agradecimento especial a minha amiga, Ana Claudia Petrini, pela rica contribuição dada nesse trabalho, pelo companheirismo e incentivo, sempre!

Agradeço aos colegas Paulo César de Oliveira, Rafaela Ferreira Bertochi, Éder João de Arruda e Luana Gomes de Oliveira, por toda contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

Ao corpo docente do PPG-CMH, pelo dom e arte de ensinar; pelos grandes exemplos deixados e por cada e todas as belas lições aprendidas.

Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares - CAPES/PROSUP, por nos permitir a oportunidade de evoluir ainda mais e por contribuir para o meu crescimento profissional, proporcionando acima de tudo, o crescimento científico.

Agradeço imensamente à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, sem vocês no meu caminho eu não teria chegado até aqui. O meu muitíssimo OBRIGADO!!

“A natureza é exatamente simples, se conseguirmos encará-la de modo apropriado. Essa crença tem-me auxiliado, durante toda a minha vida, a não perder as esperanças, quando surgem grandes dificuldades de investigação.”

Albert Einstein

RESUMO

O processo do envelhecimento é caracterizado pelo comprometimento dos tecidos, órgãos e sistemas. A atividade física é um estímulo que oferece subsídio para o desenvolvimento e manutenção do músculo. O objetivo do estudo foi verificar a eficácia do treinamento de natação sobre a estrutura dos músculos esquelético e cardíaco de ratas envelhecidas. Foram utilizadas 30 ratas da linhagem Wistar, com oito meses de idade, divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais denominados grupo sedentárias (SED, n= 15) e grupo treinadas (TR, n= 15). Os animais do grupo SED foram mantidos em gaiolas de polietileno de tamanho grande, sem a realização de exercícios físicos, por quatro meses. Já os animais do grupo TR foram previamente adaptados ao meio aquático e posteriormente submetidos ao exercício físico de natação, três vezes por semana, com duração de 60 minutos e sem acréscimo de carga, durante o mesmo período. A temperatura da água foi mantida a $30^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. Após o período de treinamento, agora com 12 meses de idade, foi realizada a análise eletrocardiográfica e posteriormente os animais foram eutanasiados e os músculos diafragma, sóleo e gastrocnêmio branco foram retirados para análise morfométrica e o immunoblotting. Para a verificação da normalidades dos dados, foi utilizado o teste estatístico Shapiro Wilk, seguido do teste t de Student para os dados paramétricos e Wilcoxon para não paramétricos, quando comparado os grupos. Para a análise eletrocardiográfica foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos dados e para a variância foi utilizado ANOVA seguido de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para dados paramétricos e teste de Man Whitney para dados não paramétricos adotando um valor de $p < 0,05$. A análise histológica demonstrou que o gastrocnêmio branco (GB) apresentou maior área de secção transversa (AST) no grupo TR ($p < 0,05$). O tecido conjuntivo, não apresentou diferença estatística significativa em nenhum dos músculos analisados. Na análise molecular foi possível verificar que houve diferença estatisticamente significativa no grupo TR, com redução do conteúdo da proteína calsequestrina (CSQ) nos músculos gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL). Em relação ao TGF β 1 foi possível verificar que houve redução no grupo treinado do músculo GB, quando observado com os demais músculos do mesmo grupo. No eletrocardiograma (ECG), foi observado diferença estatisticamente significativa nos valores do intervalo QTc do miocárdio, sendo que o grupo TR apresentou redução de 22,37% em relação ao grupo SED. Foi verificado que a amplitude da onda R foi 94% maior e a onda S obteve aumento de 15% em decorrência do treinamento. O treinamento de natação foi capaz de manter as condições estruturais do músculo gastrocnêmio, prevenindo assim a hipotrofia e favoreceu a bradicardia em repouso em ratas envelhecidas. O conteúdo da calsequestrina e do TGF- β 1 demonstraram capacidade adaptativa do animal frente ao treinamento, indicando que mesmo um exercício sem carga é capaz de promover efeitos positivos no músculo esquelético.

Palavras-Chave: Envelhecimento, natação, tipo de fibra, músculo esquelético

ABSTRACT

The aging process is characterized by the involvement of tissues, organs and systems. Physical activity is a stimulus that offers subsidies for the development and maintenance of muscle. The aim of this study was to verify the effectiveness of swimming training in different types of muscle fibers in rats. Were used 30 female Wistar rats, with eight months old, randomly divided into two experimental groups called sedentary group (SED, n = 15) and trained group (RT, n = 15). The animals of the SED group were kept in big size polyethylene cages without physical exercises for four months. The animals of the TR group were previously adapted to the aquatic environment and subsequently subjected to physical swimming exercise three times a week, lasting 60 minutes and without additional load during the same period. The water temperature was maintained at 30 ± 2 ° C. After the training period, now with 12 months old, was performed at ECG analysis and later the animals were euthanized and the diaphragm, soleus and white gastrocnemius muscles were removed for analysis using morphometric and immunoblotting. To verify the normality of the data, was used the statistical test Shapiro Wilk, followed by the Student t test for parametric data and Wilcoxon test for nonparametric when compared groups. For electrocardiographic analysis, the Kolmogorov-Smirnov (KS) test to verify the normality of the data and for variance was used ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison for parametric data and Man Whitney test for nonparametric data adopting a value of $p < 0,05$. Histological examination showed that the white gastrocnemius (GB) showed greater cross-sectional area (CSA) in the RT group ($p < 0,05$). The presence of connective tissue, did not show significant statistical difference in any of the analyzed muscles. In the molecular analysis we observed a statistically significant difference in the RT group, reducing the content of protein calsequestrin (CSQ) in white gastrocnemius (GB) and soleus (SOL). In relation to the TGF $\beta 1$ it was possible to find that there was a reduction in the trained group of the white gastrocnemius muscle, when it was observed among the other muscles in the same group. The electrocardiogram (ECG), showed statistically significant difference in the values of myocardial QTc interval, which decreased 22.37% in the TR group when compared to the SED group. It was found that the R-wave amplitude was 94% higher and the S wave had an increase of 15% as a result of training. exercise aerobic. The calsequestrin and TGF $\beta 1$'s content demonstrated the animal's adaptive capacity about the training, showing that an exercise without load is able to promote positive effects in the skeletal muscle.

Key words: Aging, swimming, type of fiber, skeletal muscles.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVO.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Grupos Experimentais.....	19
3.2. Procedimentos de Treinamento dos Animais.....	19
3.3. Protocolos de acompanhamento ao treinamento.....	20
3.4. ECG (eletrocardiograma).....	22
3.5. Eutanásia dos animais.....	23
3.6. Análises Histológicas.....	23
3.7. Técnica de Immunoblotting.....	24
3.8. Anticorpos.....	26
3.9. Análise dos resultados.....	26
3.10. Análise Estatística.....	27
4.RESULTADOS.....	28
4.1. ECG (Eletrocardiograma).....	28
4.2. Tecido Conjuntivo.....	30
4.3. Área de Secção Transversa (AST).....	31
4.4. Calsequestrina (CSQ).....	34
4.5. TGF - β 1.....	35
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXO	

1. INTRODUÇÃO

A musculatura esquelética constitui um dos maiores tecidos do corpo, possuindo a maior massa celular e maior componente proteico do organismo. Em consonância com motoneurônio compõe a unidade motora responsável pela aptidão e autonomia funcional do indivíduo, assim como seu desempenho físico (Deschenes, 2004).

O músculo estriado esquelético apresenta capacidade de adaptação quando submetido a diferentes formas de estímulos, por ser um tecido plástico (Vechetti Júnior et al., 2010).

Para Santos Junior et al. (2010), o tecido muscular é caracterizado por desempenhar contrações, gerando ciclos de encurtamento/estirando, esse mecanismo contrátil é determinante para a manutenção e preservação das fibras musculares.

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

Tanto as fibras musculares rápidas quanto as lentas, estão susceptíveis a mudanças em seu trofismo (Nascimento et al., 2008), em situações de desuso muscular ou no envelhecimento.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a população idosa como acima de 60 anos de idade (Baptista e Vaz, 2009). De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2000) estima-se que até

2020 o número de idosos no mundo irá dobrar; e no Brasil, projeta-se que 11% da população terá 60 anos ou mais.

O processo do envelhecimento é caracterizado pelo comprometimento dos tecidos, órgãos e sistemas reduzindo a capacidade de adaptação a estímulos internos e externos. Com o envelhecimento, a musculatura sofre modificações substanciais, resultando na diminuição da massa. Entretanto, há evidências de que a inervação deficiente dos motoneurônios é precedida do envelhecimento e apesar das fibras serem reinervadas por outros neurônios motores, esse processo é deficitário para solucionar as alterações decorrentes da idade, induzindo a uma atrofia das fibras musculares. (Negrão e Rondon, 2001)

Nesse período, o organismo sofre mudanças na composição corporal, aumentando assim a adiposidade e diminuindo a massa corporal magra, particularmente a massa muscular esquelética, que reduz cerca de 40% entre 20 e 60 anos de idade. Estas alterações estão relacionadas com o envelhecimento também em indivíduos saudáveis e fisicamente ativos, que podem apresentar perda muscular de 1 a 2% ao ano, principalmente nos membros inferiores, ganho de gordura corporal de 7,5% por década, a partir dos 40 anos, com alterações mais acentuadas após 50 anos de idade (Pierine, Nicola e Oliveira, 2009).

Carvalho e Soares (2004), em estudo de revisão da literatura, descrevem que a atrofia das fibras envelhecidas, inicia-se por volta dos 25 anos de idade, apresentando redução progressiva da área em cerca de 10% até próximo aos 50 anos. Após essa idade, o indivíduo começa a perder massa

de forma mais pronunciada nas fibras tipo II, com redução média de cerca de 26% entre os 20 e os 80 anos.

O processo de envelhecimento pode acarretar na diminuição da força muscular, acompanhada por alguns eventos como diminuição da área de secção transversa (AST), redução do número de fibras musculares, alteração na porcentagem de tecido muscular contrátil e déficit na inervação muscular, incluindo recrutamento e disparo de unidades motoras (Davini e Nunes, 2003).

Lieber (2002), Minamoto (2005) e Bar-Shai et al. (2008) descrevem que no envelhecimento além da diminuição de força e da massa muscular, ocorre também a mudança na tipagem das fibras musculares, tendenciando ao tipo I. Além disso, a redução progressiva de atividades que exijam força muscular contribui para o decréscimo das unidades motoras de fibras rápidas, tipo II (Minamoto, 2005).

Nesta fase observa-se também a inervação inadequada da musculatura principalmente as fibras do tipo II, que pode ser explicado pela diminuição no número de motoneurônios alfa, associada à escassez no número de unidades motoras. Embora possa haver a reinervação por neurônios motores subjacentes, as alterações advindas desse fato resultam, geralmente, em atrofia seletiva das fibras musculares, contribuindo para a diminuição da área de secção transversa (AST) do músculo esquelético estriado (Davini e Nunes, 2003; Degens, 2007).

Estudo realizado em humanos avaliou, por meio de biópsia e técnica de imunohistoquímica, as diferenças na AST dos músculos extensores de joelho entre jovens, com idade média de 23 anos e idosos com idade média de 71 anos. Após seis meses de treinamento resistido, praticado três vezes na

semana, observou-se que a AST do músculo foi 14% menor e o tamanho da fibra muscular tipo II foi 29% menor nos idosos quando comparados aos jovens. Os autores concluíram que o declínio da massa muscular esquelética no envelhecimento é atribuído, principalmente, à redução no tamanho das fibras musculares do tipo II (Nilwik et al., 2013).

Devido a esse declínio com o avanço da idade, o risco de doenças para essa população pode aumentar potencialmente, uma vez que as alterações metabólicas e funcionais podem ser somadas ao índice de patologias, fraturas e quedas, conduzindo para curtos períodos de inatividade, podendo exacerbar a sarcopenia já instalada (Wall, Dirks e Van Loon, 2013).

A atividade física é um estímulo que oferece subsídio para o desenvolvimento e manutenção do músculo. Campos et al. (2002), Bickel et al. (2005) e Bezerra et al. (2009) relatam que a atividade física é capaz de favorecer o aumento da força e da AST.

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

O treinamento muscular de força induz a hipertrofia, sendo capaz de conservar as características estruturais e mecânicas do músculo esquelético em longo prazo, preservando os novos núcleos celulares que são desenvolvidos no tecido muscular durante o período de treinamento (Bruusgaard e Gundersen, 2008).

Quanto ao treinamento físico de resistência (aeróbico), se realizado de forma regular, é capaz de favorecer as respostas celulares do músculo esquelético, colaborando para o aumento da vascularização e melhorando a densidade capilar nas fibras (Adolfsson, 1986).

A AST da fibra muscular pode ser favorecida por meio do exercício de resistência, uma vez que ocorre a manutenção através da capacidade aeróbica (Suominen, 2007).

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

Brum et al. (2004) destacam que exercícios diferentes podem caracterizar respostas distintas ao sistema cardiovascular, sendo que, exercícios aeróbicos realizados de forma prolongada geram efeitos hipotensos maiores e mais duradouros.

O treinamento físico de baixa intensidade tem um efeito significativo na redução da resistência vascular periférica, demarcado pela atenuação da vasoconstrição, ampliação da função endotelial e das alterações estruturais da microcirculação. Com a prática de atividade física, a adenosina que é liberada pelo organismo pode ser importante na prevenção e no tratamento da hipertensão, podendo influenciar o fluxo sanguíneo para o miocárdio, favorecendo a bradicardia. Além da ação vasodilatadora coronariana, a adenosina tem um papel de destaque na regulação do fluxo sanguíneo

coronário, apresentando um importante papel no sistema cardiovascular. (Barros et al., 2011).

Além dos benefícios supracitados, o treinamento físico é capaz de favorecer a hipertrofia cardíaca, que é considerada fisiológica e desenvolvida de forma simétrica no coração, sendo que as mudanças estruturais são dependentes da natureza, duração e intensidade do exercício (Magalhães et al., 2008).

O aumento da massa muscular encontrada na hipertrofia cardíaca refere-se a sobrecarga de trabalho nas sessões de exercício durante o treinamento (Barbier et al., 2006; Carreño et al., 2006). Esta hipertrofia é um mecanismo fisiológico compensatório, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, desta forma sendo responsável pela manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos (Colan, 1997; Urhausen e Kindermann, 1999).

Com a prática da atividade física, o tecido muscular sofre diversas modificações bioquímicas decorrentes dos microtraumas. Frente a isso, o tecido muscular passa por processos de inflamação e regeneração, acontecendo basicamente duas etapas: regeneração da miofibrila e produção de tecido conjuntivo (TC). Estes dois processos ocorrem simultaneamente e são eventos competitivos, visto que a produção excessiva de TC é capaz de inibir completamente a regeneração muscular (Lehto, Jarninen e Nelimarkka, 1986).

Evidências científicas indicam claramente que a atividade física é uma forma independente para reduzir e/ou prevenir uma série de declínios funcionais associados com o envelhecimento (Nelson et al., 2007).

Mediante a necessidade de entendimento sobre as adaptações do tecido muscular envelhecido, este trabalho visa subsidiar os profissionais da área da saúde sobre os efeitos do treinamento físico sobre os tecidos muscular e cardíaco de ratas velhas.

A hipótese do trabalho é que o treinamento físico aeróbico, em longo prazo, minimiza os efeitos deletérios do envelhecimento, preservando a AST das fibras musculares, principalmente as fibras do tipo II e trazendo benefícios cardiovasculares.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Verificar a eficácia do treinamento de natação sobre a estrutura dos músculos esquelético e cardíaco de ratas envelhecidas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do treinamento de natação, três vezes na semana, prolongado e sem carga;
- Verificar o perfil eletrocardiográfico após o treinamento;
- Analisar morfometricamente os músculos gastrocnêmio branco, sóleo e diafragma, por meio da área de secção transversa e percentual de tecido conjuntivo;
- Analisar o conteúdo da proteína calsequestrina e da citocina TGF- β 1 nos animais sedentários e treinados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 30 ratas da linhagem Wistar, com idade de oito meses. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UNIMEP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos a ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum*. Foram alocados quatro animais por gaiola de polietileno de tamanho grande. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética sobre o Uso de Animais (CEUA) da UNIMEP, sob o protocolo 09/13 (Anexo).

3.1. Grupos Experimentais:

Os animais foram divididos em dois grupos:

- Sedentárias (SED, n=15): mantidos nas gaiolas sem nenhum tipo de intervenção;
- Treinadas (TR, n=15): realizaram o exercício de natação por um período de 4 meses.

3.2. Procedimentos de Treinamento dos Animais

Os animais do grupo TR foram submetidos ao exercício de natação, três vezes por semana, em dias alternados, com dois dias de descanso. Inicialmente as ratas realizaram 10 minutos de atividade, com acréscimo de cinco minutos por sessão, até totalizar 60 minutos.

O treinamento foi realizado em um aquário de 1mx45cmx45cm (Figura 2), com sistema de aquecimento térmico e de drenagem de água, para troca da

mesma conforme necessário. A temperatura da água foi controlada por meio de um termômetro, a fim de mantê-la em $30^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

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

Os animais tendem a nadar por um período de tempo equivalente a 5 e 10 minutos, e posteriormente se mantêm em flutuação constante, apenas com a cabeça fora da água (Van Meeteran et al., 1997). Dessa forma, os animais foram estimulados durante todas as sessões, através da turbulência na água, realizada por meio da agitação manual e de um bastão de plástico, a fim de exigir maior controle do animal no decorrer do exercício (Figura 2).

3.3. Protocolos de acompanhamento ao treinamento:

Durante os 4 meses de treinamento dos animais foram realizadas as seguintes análises:

- Quantificação do consumo alimentar e hídrico a cada 3 dias: controlados no biotério, por meio da avaliação da quantidade ingerida de ração e água nas gaiolas de cada grupo;
- Pesagem dos animais: os animais foram pesados quinzenalmente em uma balança de precisão, marca (GEHAKA, BG 1000).

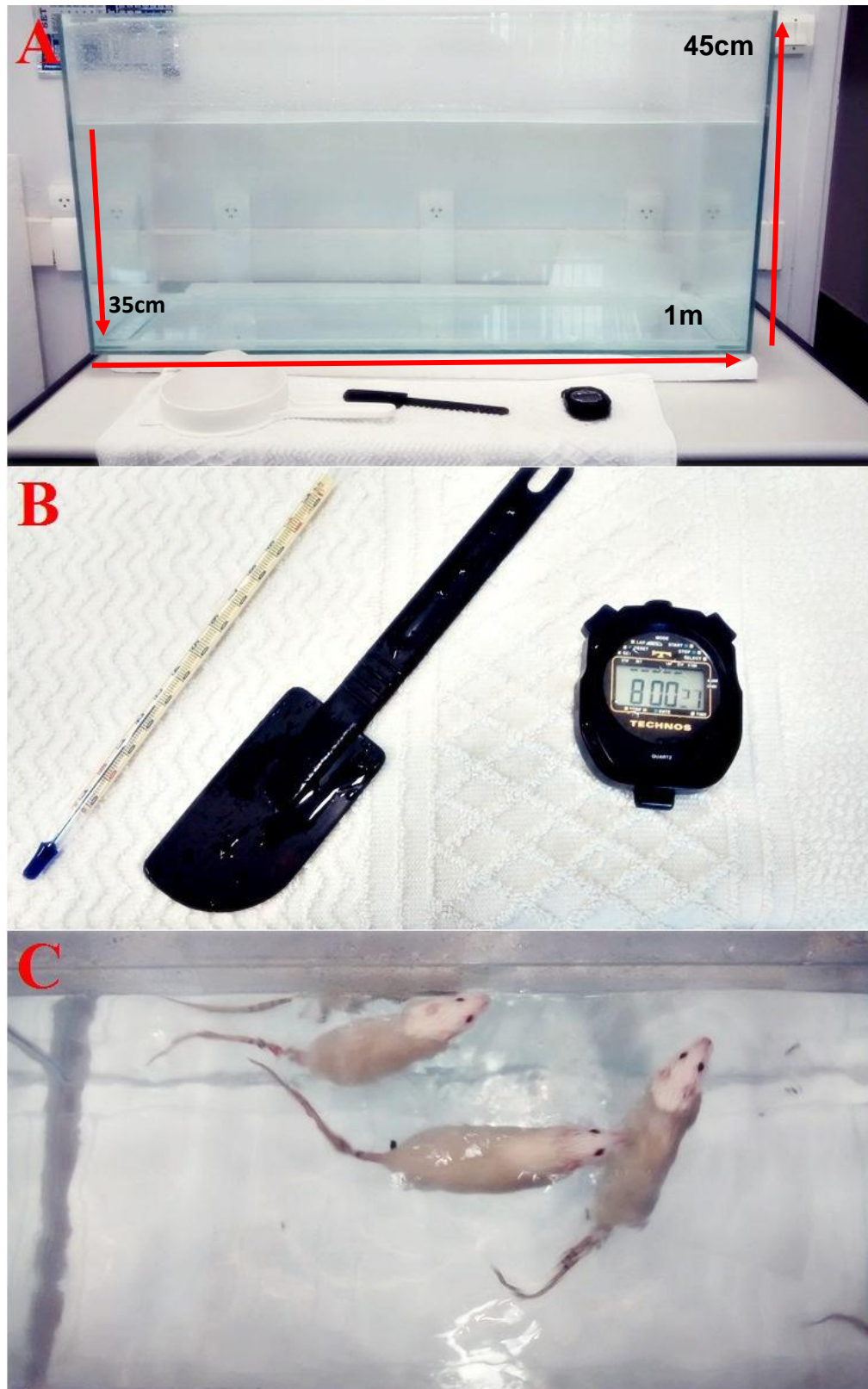


Figura 2 – Sessões de natação dos animais. (A) aquário; (B) termômetro, bastão de plástico para a turbulência durante as sessões e cronômetro para controle do tempo das sessões; (C) ratas realizando o protocolo de natação proposto.

3.4. ECG (eletrocardiograma)

Após o término do treinamento, os animais dos dois grupos foram anestesiados com Pentobarbital sódico (40mg/Kg, ip), para análise eletrocardiográfica. A escolha do anestésico foi embasada no contexto de que os barbitúricos não alteram o perfil elétrico cardiovascular (Kumar et al., 1995).

Os eletrodos foram conectados aos canais do eletrocardiógrafo (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF), com sensibilidade N e velocidade de 50 mm/segundo (Figura 3).

O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isométrica definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ($QTc = QT / \sqrt{RR}$).



Figura 3: Representação do sistema *heartware* para captação do ECG.

3.5. Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, em dose de 0,09 e 0,06 mL/100g de peso corporal, respectivamente. Após sinais de anestesia geral, os animais foram perfundidos com PBS (perfusão cardíaca) e os músculos gastrocnêmico branco (GB), sóleo (SOL) e diafragma (DIA) foram retirados, pesados e divididos em duas partes iguais, sendo uma parte destinada à técnica de microscopia de luz e a outra parte destinada à técnica de imunoblotting.

3.6. Análises Histológicas

Parte dos músculos diafragma, sóleo e gastrocnêmio branco esquerdo de cada animal foram fixadas em suporte de madeira com tragacanth gum, imerso em isopentano à -80° C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -195° C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70° C. Para obtenção dos cortes, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23° C, e seccionados transversalmente utilizando um criostato (modelo HYRAX C 25 - Zeiss). Cortes transversais seriados com espessura de 8 µm foram coletados para as análises:

- **Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE):** Para análise da AST das fibras musculares. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina segundo a rotina do laboratório, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

- **Coloração por Tricrômico de Masson:** Para marcação de TC. Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, lavados em água corrente e imersas em solução de Masson (0,7g de Ponceau Fucsina, 0,03g de Fucsina ácida, 0,7g de Orange G e 100mL de solução de ácido acético 0,2%), banhadas em solução de ácido acético a 0,2% e mergulhadas em solução de verde-luz, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan.

3.7. Técnica de Immunoblotting

- **Preparação de Extrato Total:** parte dos músculos foi cortada em pequenos pedaços e homogeneizada em tampão específico, com volume variando entre 600 a 1000 uL, a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total.
- **Eletroforese:** As amostras dos extratos protéicos foram tratadas com tampão Laemmli, acrescido de ditiotreitol 100 mM e aquecidas em banho seco por 5 minutos. Em seguida, 50 µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). Foram obtidos 3 extratos protéicos por grupo. A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada

em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal contendo 5% de leite desnatado, por 1 hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10 µg de anticorpo primário diluído em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado e 2,5 µg de anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Pierce) por 5 minutos e, em seguida, o sinal fluorescente foi captado no equipamento G-Box (GeneSys).

Após obtenção de bandas, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7,5; β -*Mercaptoethanol* 0,1M; Uréia 8M) durante 1h, à 60° C. Posteriormente as membranas foram incubadas em Tris-HCl 1M pH 7,5 por 30 min para neutralizar o *stripping*, lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato de hidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes condições fisiológicas.

3.8. Anticorpos

- **Anticorpos Primários**

- TGF- β 1, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039;
- Calsequestrina; rabbit polyclonal, Thermo Fisher Scientific, PA-913;
- Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), mouse monoclonal, Santa Cruz, sc59540.

- **Anticorpos Secundários**

- Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2004;
- Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005.

3.9. Análises dos resultados

Para a análise da AST foram utilizados dois cortes aleatórios por lâmina, sendo uma lâmina para cada animal, onde foram contadas aproximadamente 250 fibras por animal de cada músculo.

As lâminas foram observadas ao microscópio de luz com câmera acoplada, com objetiva de 20x e conectado a um computador com software *Image Pro-Plus® 6.0* (Media Cybernetics).

A mensuração de TC, nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson foi realizada por meio do software *Image Pro-Plus® 6.0* (Media Cybernetics) com imagens adquiridas através de vídeo câmera (Nikon Express Series), acopladas ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400) com objetiva de 20x.

Foram analisadas seis imagens por animal, e, sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 88 intersecções, onde foram contabilizadas

aquelas que se sobrepunham sobre TC e posteriormente transformadas em porcentagem (%).

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

3.10. Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o pacote estatístico “Bioestat versão 5.9”. Para a verificação da normalidade dos dados, foi utilizado o teste estatístico Shapiro Wilk. Após a análise das normalidades, as comparações foram realizadas entre os grupos SED e TR. Sendo assim, para a comparação dos dados foi utilizado o teste t de Student quando os dados foram paramétricos e Wilcoxon para os dados não paramétricos. Para todos os casos, foi adotado um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

Para a análise eletrocardiográfica, os dados coletados foram tabulados e posteriormente analisados pelo pacote estatístico “SPSS versão 17.0”. A análise estatística foi executada pela aplicação do teste Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos dados. Assim sendo, para as comparações entre os grupos foi aplicado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para dados paramétricos e teste de Man Whitney para dados não paramétricos. Em todos os casos foi adotado um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

4. RESULTADOS

O peso corporal, bem como, o peso dos músculos dos animais não apresentou diferença estatística significativa entre os dados, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1: Média e desvio padrão do peso corporal e dos músculos gastrocnêmio branco (GB), sóleo (SOL) e diafragma (DIA) de todos os grupos estudados em gramas. SED: sedentárias, TR: treinadas.

Grupos	Peso Corporal (g)	GB (g)	SOL (g)	DIA (g)
SED	295,3± 9,1	0,417±0,07	0,135±0,02	0,198±0,10
TR	304,13±21,1	0,459±0,28	0,172±0,01	0,203±0,09

No que diz respeito ao consumo alimentar e hídrico os resultados demonstram que o consumo da ração foi maior ($p=0.02$) para as ratas do grupo TR. O consumo hídrico foi semelhante entre os grupos, como observado na tabela 2.

Tabela 2: Média, desvio padrão, valor de p da quantidade ingerida de ração e água semanalmente nos grupos sedentárias (SED) $n=15$ e treinadas (TR) $n=15$.

	TR	SED	P
RAÇÃO (g)	231,38±40,53	203,42±23,72	0,02*
ÁGUA (mL)	221,93±84,18	218,187±95,73	0,90

4.1. ECG (Eletrocardiograma)

Iniciou-se avaliando a frequência cardíaca, seguindo a regra da diferença entre o pico de duas ondas R consecutivas. Foram observados valores médios 15% menores no grupo TR (Figura 4).



Figura 4: Em A apresenta-se o registro das ratas do grupo SED e em B um complexo de ondas ampliadas. Em C visualiza-se o sinal captado das ratas do grupo TR e em D observa-se um complexo de ondas ampliadas captadas das mesmas.

O ângulo do coração (SÂQRS) também foi avaliado e, dessa forma, foi observado que as ratas do grupo TR desenvolveram um ângulo de aproximadamente $50,6^\circ$ de diferença entre as ratas do grupo S, sendo esse um coração mais verticalizado.

Nos valores do intervalo QTc, que corresponde ao tempo necessário para realizar a repolarização do miocárdio, foi observado diferença estatisticamente significativa, onde o grupo TR apresentou redução de 22,37% em relação ao grupo SED, como demonstra a tabela 3.

Tabela 3: Frequência cardíaca (FC, bat/min), ângulo do miocárdio (SÂQRS) e parâmetros dos intervalos e segmentos das ondas eletrocardiográficas (ms) de ratas sedentárias (SED) e treinadas (TR). Os valores estão expressos em média \pm dp, n=10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SED.

	FC (bat/min)	SÂQRS	QTc (ms)	QRS (ms)	IPR (ms)	SPR (ms)
SED	324,50 \pm 7,4	23,2 \pm 6,4	143,25 \pm 9,8	45,7 \pm 0,7	37,7 \pm 1,1	11,1 \pm 0,5
TR	275,58 \pm 9,0*	73,8 \pm 5,7*	111,20 \pm 8,6	47,1 \pm 1,1	38,3 \pm 1,5	12,4 \pm 1,4

Foi analisada a amplitude da onda R e S, que corresponde à ativação ventricular. Nesse caso, verificou-se que a voltagem da onda R foi 94% maior e a onda S apresentou um aumento de 15% em decorrência do treinamento (Figura 5).

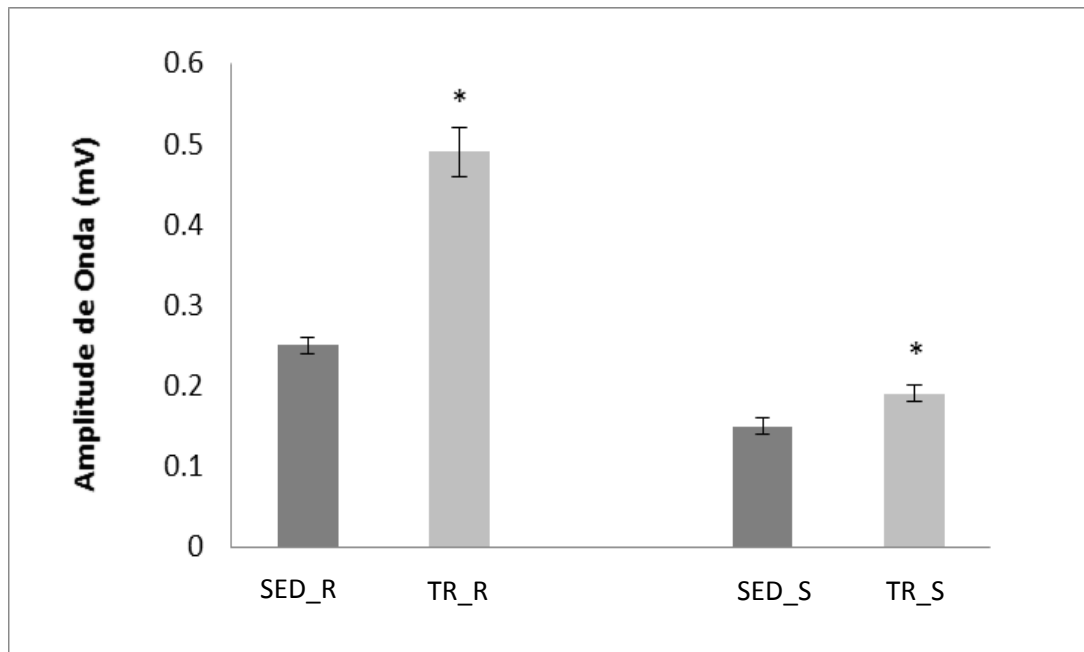


Figura 5: Amplitude da onda R e S (mV) das ratas sedentárias (SED) e Treinadas (TR). Os valores correspondem à média \pm dp, n=10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SED.

4.2. Tecido Conjuntivo

Ao analisar a porcentagem da área do tecido conjuntivo dos músculos, foi possível observar que os valores de SED e TR foram similares, não havendo diferença estatisticamente significativa (Figura 6).

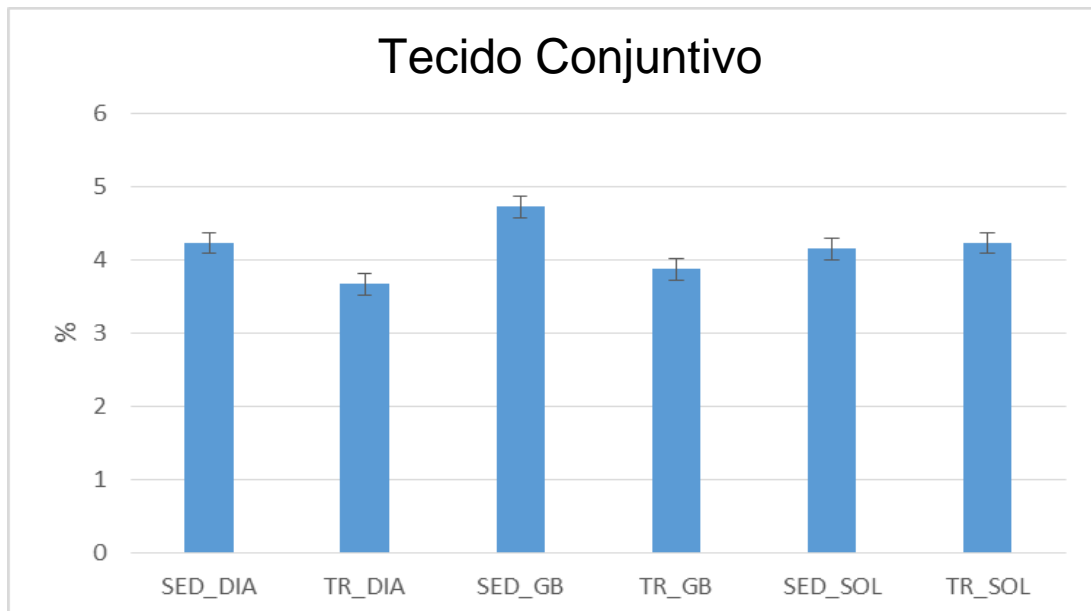


Figura 6: Porcentagem de área do tecido conjuntivo do músculo diafragma (DIA), gastrocnêmio branco (GB) e sóleo(SOL) nos grupos analisados. SED: sedentárias; TR: treinadas

4.3. Área de Secção Transversa (AST)

Ao analisar a área de secção transversa foi possível observar que nas fibras dos músculos diafragma e sóleo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos SED e TR. Nas fibras do músculo gastrocnêmio branco houve aumento no grupo TR ($p=0,015$), quando comparado ao SED (Figura 7).

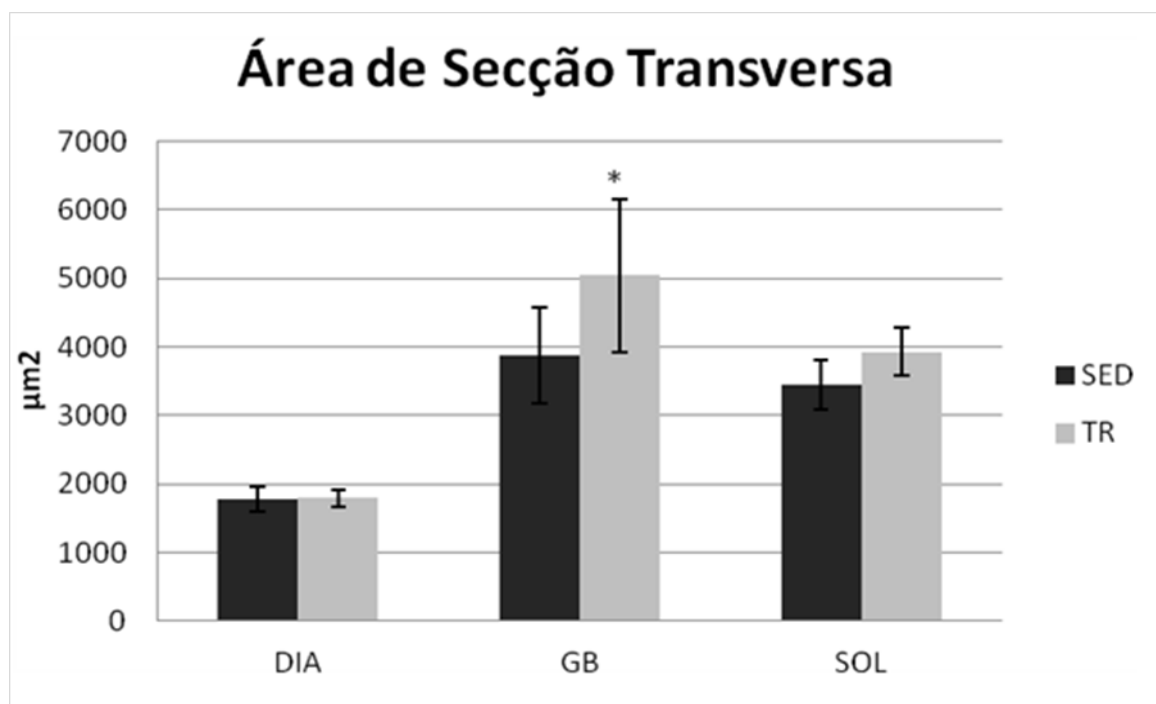


Figura 7: Média e desvio padrão da área de secção transversa dos músculos diafragma (DIA), gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL) nos grupos sedentários (SED) e treinados (TR). *diferença do respectivo grupo SED ($p < 0,05$).

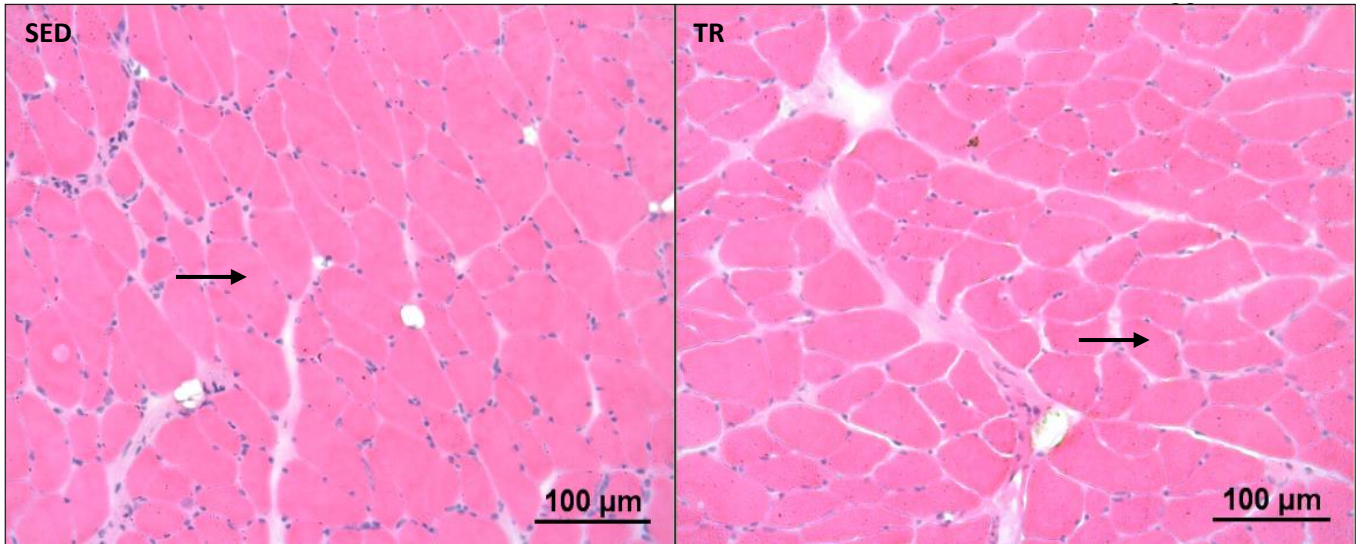


Figura 8: Cortes transversais do músculo diafragma corados com HE. Grupo: SED: sedentárias e TR: treinadas; Aumento: 20x (barra = 100 μm). As setas indicam uma fibra muscular de cada grupo.

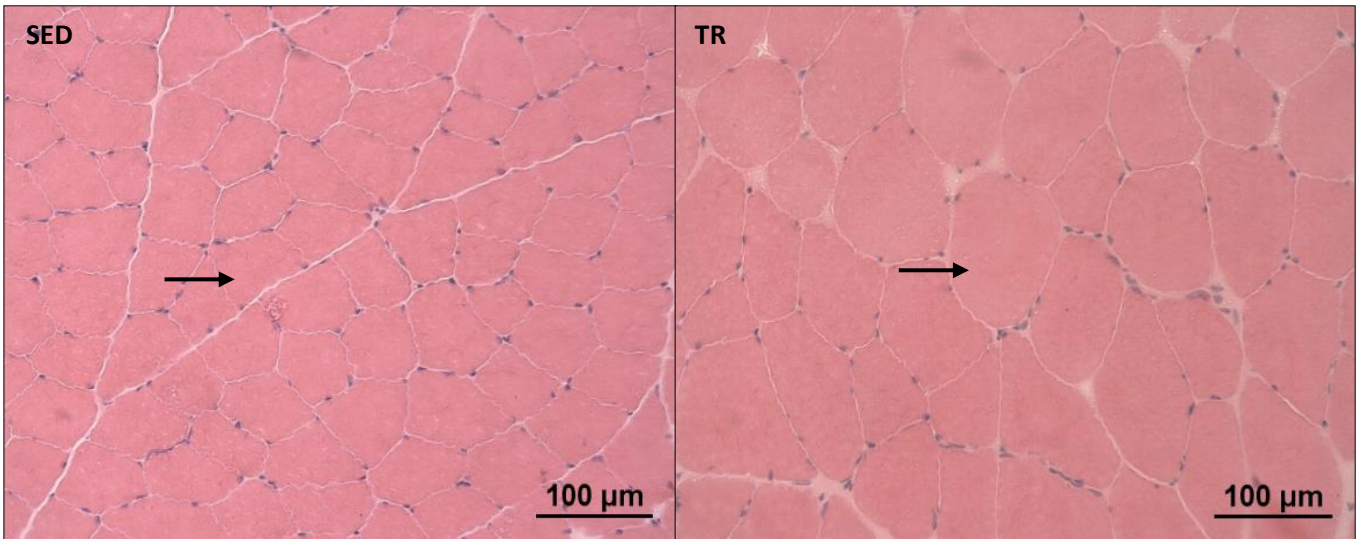


Figura 9: Cortes transversais do músculo gastrocnêmio branco corados com HE. Grupos: SED: sedentárias e TR: treinadas; Aumento: 20x (barra = 100 μm). As setas indicam uma fibra muscular de cada grupo. Nota-se a diferença da área de secção transversa das fibras apontadas.

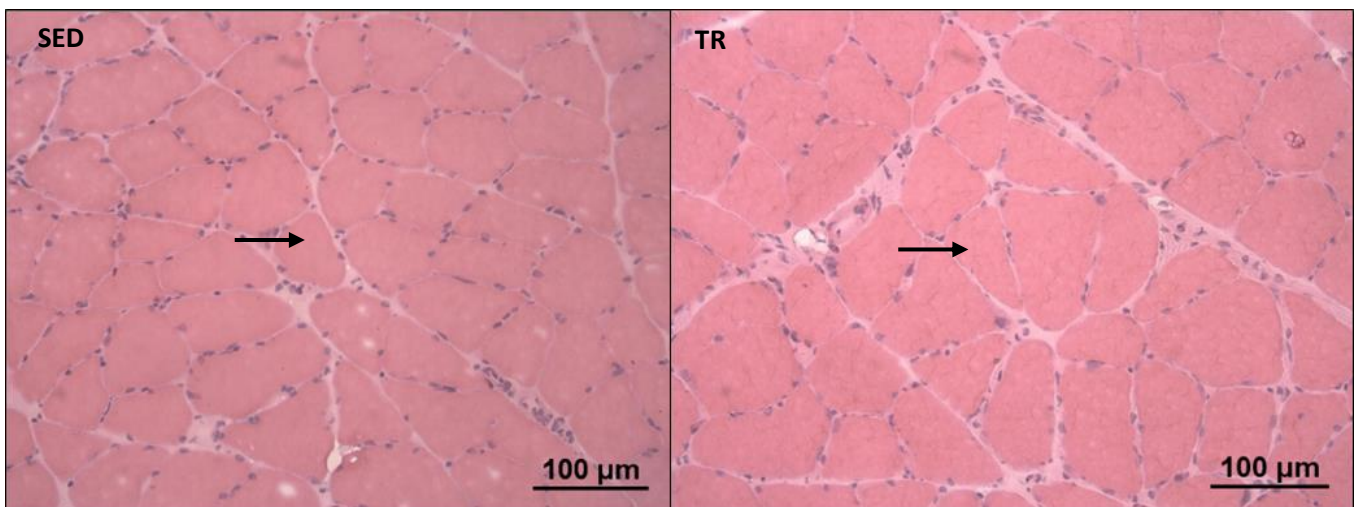


Figura 10: Cortes transversais do músculo sóleo corados com HE. Grupos: SED: sedentárias e TR: treinadas; Aumento: 20x (barra = 100 μm). As setas indicam uma fibra muscular de cada grupo.

4.4. Calsequestrina (CSQ)

No que concerne a quantidade da proteína calsequestrina foi possível verificar que houve redução significativa no grupo treinadas, nos músculos gastrocnêmio branco ($p < 0,05$) e sóleo ($p < 0,05$); (Figura 11).

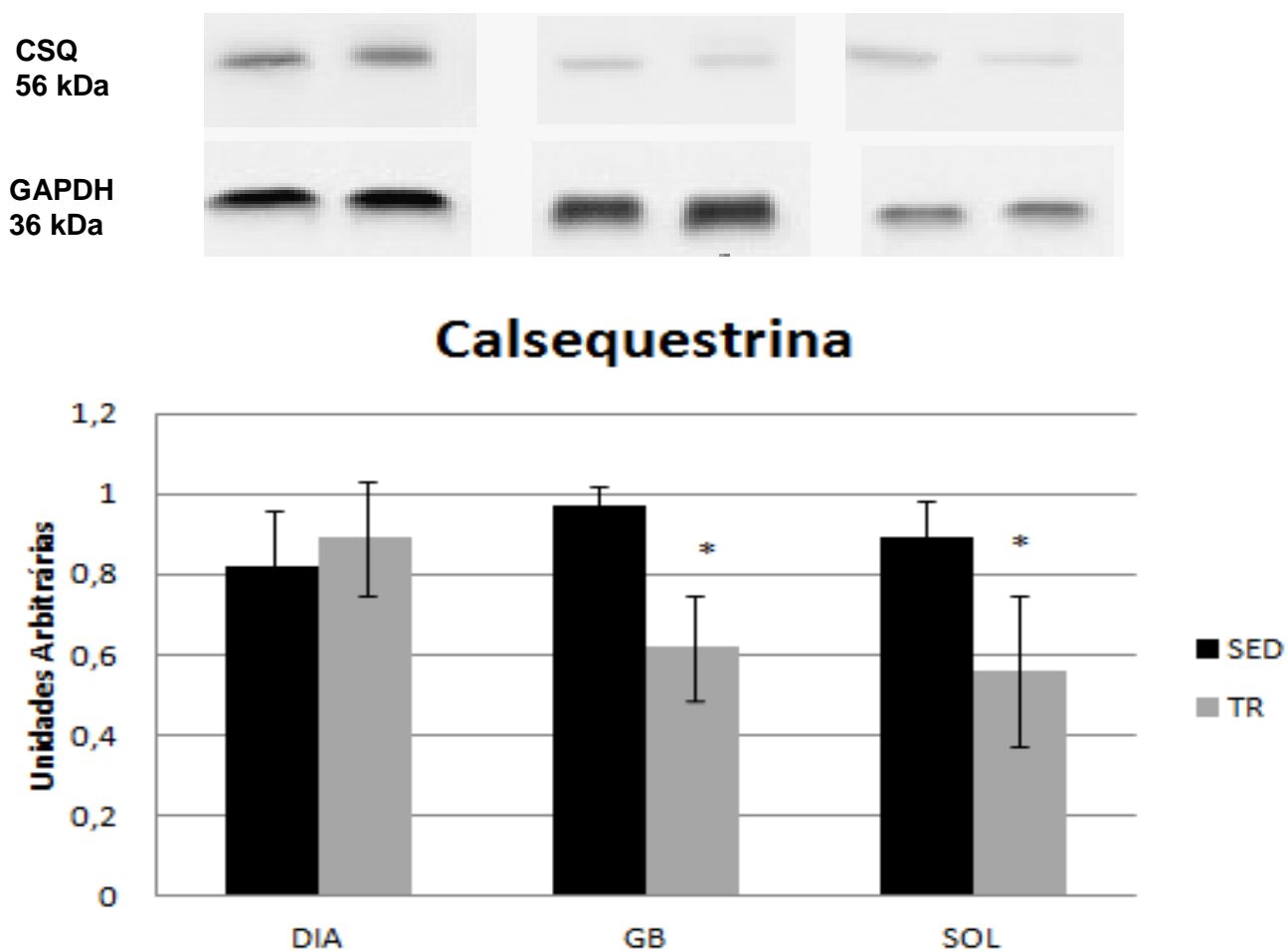


Figura 11: Bandas imunorreativas de Calsequestrina (CSQ) e o controle interno (GAPDH) e valores do conteúdo da proteína dos músculos diafragma (DIA), gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL); SED: sedentárias; TR: treinadas; * difere do respectivo grupo sedentária.

4.5. TGF - β 1

Em relação ao TGF- β 1, foi possível verificar que houve redução significativa no grupo treinadas do músculo gastrocnêmio branco, em relação ao grupo sedentário ($p < 0,05$); (Figura 12).

TGF- β 1
25 kDa

GAPDH
36 kDa

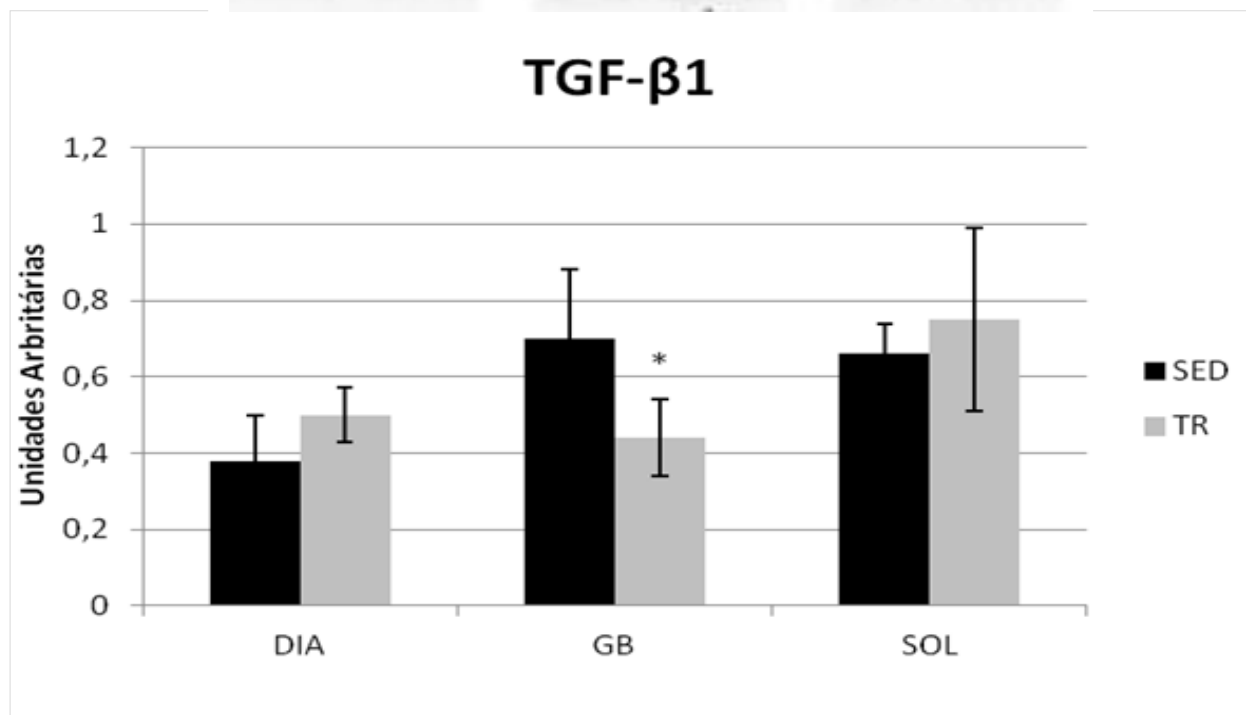


Figura 12: Bandas imunorreativas do TGF- β 1 do controle interno (GAPDH) e valores do conteúdo da citocina dos músculos diafragma (DIA), gastrocnêmio branco (GB) e sóleo (SOL); SED: sedentárias; TR: treinadas; * difere da sedentária do mesmo grupo ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

De acordo com estudos epidemiológicos e transversais, a população adulta adota até 150 minutos semanais de prática de atividade física, representando em torno de 40 a 55% de praticantes no Brasil (Marcondelli et al., 2010).

Existe uma variedade de práticas de atividade física, das quais estão a caminhada, musculação, futebol, ciclismo e ginástica. A caminhada por sua vez, representa a atividade mais adotada entre essa porcentagem, sendo praticada entre duas e três vezes na semana, durante 60 minutos (Dumith, Domingues e Gigante, 2009). Baseado nas recomendações da OMS (WHO, 2011), o protocolo escolhido neste estudo objetivou se aproximar da prática comum entre os seres humanos, sendo realizado três vezes na semana, sem carga e com um acúmulo de 180 minutos semanais.

Os dados demonstram que as ratas do grupo treinadas tiveram, durante o período de treinamento físico aeróbico de quatro meses, maior ingestão de alimento, porém, não aumentaram o peso corporal final quando comparado com as ratas do grupo sedentárias.

Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Silva, Melo e Oliveira (2007), que avaliou o efeito do treinamento físico na massa corporal de ratos. Nesta avaliação os animais foram divididos em três grupos: treinamento anaeróbico, por meio do aparelho de agachamento, com 75% do teste de carga máxima e aeróbico: por meio da corrida em esteira ergométrica realizados três vezes por semana, durante 12 semanas. Os resultados mostraram que o peso corpóreo final dos animais exercitados e não exercitados se manteve igual

estatisticamente, independentemente do tipo de atividade ao qual foram submetidos. Segundo Rogatto e Luciano (2001), o maior consumo alimentar dos animais treinados, sem aumento de peso corporal, demonstra a efetividade do treinamento físico no sentido de favorecer um equilíbrio energético.

Dentre os principais parâmetros cardiovasculares que sofrem alterações frente ao exercício físico aeróbico, está a redução da frequência cardíaca em repouso demonstrada no coração hipertrofiado de ratos treinados (Medeiros et al., 2000; Barros et al., 2011)

A frequência cardíaca esperada de ratos sedentários é de aproximadamente 344 bpm (Santos et al., 2010). Os resultados do presente estudo mostram que o grupo SED segue o padrão esperado, enquanto o grupo TR apresentou uma diminuição média de 15%, ou 48 bpm.

Dessa forma, adaptações anatômicas cardiovasculares benéficas foram observadas, fazendo com que as ratas submetidas ao treinamento tenham bradicardia em repouso. Medeiros et al. (2000), em estudo realizado com animais treinados por meio da natação, com sessões de 60 minutos, cinco vezes por semana, durante oito semanas, enfatizaram que a bradicardia em repouso é considerada um eficiente marcador do efeito do treinamento físico aeróbico, e que, a natação representa um tipo de treinamento físico eficaz nas adaptações do sistema cardiovascular, considerando o treinamento físico em ratos um bom modelo experimental para se estudar tais adaptações.

A fim de observar se ocorreu a hipertrofia ventricular esquerda, os dados do presente estudo estão de acordo com a pesquisa descrita na literatura por Cardinot et al. (2013), que relataram que ventrículos esquerdos hipertrofiados

apresentam um aumento na amplitude da onda R, que demonstra a despolarização ventricular.

A elevação de voltagem da onda R pode ser justificada pela angulação do coração, uma vez que o grupo TR apresenta-o mais verticalizado, aumentando a amplitude da onda R na variação D2 (Póvoa e Souza, 2008). Pressupõe-se que essa verticalização seja decorrente da hipertrofia do ventrículo esquerdo, a fim do coração se adaptar anatomicamente as estruturas ao seu redor. Uma vez que as dimensões internas do ventrículo esquerdo aumentam uniformemente pela sobrecarga do exercício, ocorre um aumento da cavidade que, posteriormente, é acompanhada da hipertrofia no miocárdio do ventrículo esquerdo.

A onda S é pouco descrita em estudos experimentais, porém em humanos, o aumento de voltagem pode ser um sinal de hipertrofia ventricular esquerda (Deccache, 2009). Dessa forma, o aumento de sua amplitude nas ratas treinadas em longo prazo sugere uma alta demanda elétrica, a fim de despolarizar um ventrículo hipertrofiado.

Um menor intervalo do QTc indica uma repolarização curta ou precoce (Corrado et al., 2006). Assim, a diminuição, embora não significativa estatisticamente, do intervalo QTc (intervalo QT corrigido pela fórmula de Bazett) no grupo TR é considerado um dado relevante na pesquisa. Entretanto, uma vez que o intervalo QRS entre os grupos são semelhantes, é possível inferir que houve uma adaptação elétrica a fim de suportar a carga do exercício, realizando o início da repolarização do miocárdio de maneira precoce.

No que concerne ao efeito do exercício físico regular como forma de prevenção de doenças cardiovasculares, como por exemplo, o infarto agudo do miocárdio, há divergências entre estudos na literatura.

Veiga et al. (2013) avaliaram as repercussões do infarto do miocárdio, em ratas submetidas ao exercício físico prévio, na qual foram divididas em quatro grupos experimentais, sendo um grupo sedentário, um grupo que realizou exercício, um grupo sedentário infarto e um grupo exercício infarto. A indução de IM seguiu protocolo bem estabelecido e foi realizada toracotomia no hemitórax esquerdo de cada animal. O coração foi exteriorizado e a ligadura da coronária descendente anterior esquerda foi realizada por meio de fio de polietileno 6-0. O coração foi rapidamente reposicionado, e o tórax fechado após hiperinsuflação pulmonar. Os animais submetidos à falsa cirurgia passaram pelos mesmos procedimentos cirúrgicos, mas sem a ligadura da coronária. Desta forma, a confirmação diagnóstica do IM foi realizada por ecodopplercardiografia, seis semanas após a cirurgia de indução de IM. O treinamento foi continuado por período total de oito semanas, cinco dias por semana, 60 minutos/dia. Verificaram que o exercício físico por natação, não atenuou as alterações induzidas pelo IM nas ratas.

Em contrapartida, Freimann et al. (2005) realizaram o treinamento físico de natação, seguido da indução do infarto do miocárdio (IM) em ratos, os animais foram divididos em 3 grupo, sendo um grupo controle, o outro submetido ao IM, e o terceiro submetido ao IM com a realização de exercício físico. Após a indução do IM os animais foram mantidos durante 4 semanas sem nenhum tipo de exercício. Após o termino do período, todos foram submetidos ao protocolo de natação por um período de sete semanas,

realizando os treinamentos durante seis vezes na semana com um tempo equivalente a 90 minutos de atividade e nesse caso, foi observado redução significativa na área do IM, redução da cicatriz e aumento da densidade das arteríolas, corroborando com o estudo de McElroy, Gissen e Fishbein (1978), na qual foram divididos em 4 grupos, sendo um controle, um controle infartado, um controle natação e um infartado submetido ao treinamento de natação, durante 5 semanas, realizando o exercício 5 vezes na semana com duração de 60 minutos. Observaram também uma redução na área do IM em ratos machos treinados previamente. Entretanto, os estudos supracitados tiveram um período de treinamento prévio, de oito, sete e cinco semanas, respectivamente, e todos com frequência de cinco vezes semanais.

Sendo assim, foi possível observar no presente estudo que, apesar do treinamento realizado três vezes na semana, em dias intercalados e com uma frequência de 60 minutos, foi possível observar que esse tempo é capaz de promover adaptações no organismo, favorecendo modificações consideráveis no músculo esquelético.

Com a prática da atividade física é comum ocorrer microtraumas nos tecidos, caracterizada por uma resposta inflamatória inicial seguida de uma fase marcada por fibrose cicatricial, que resulta na diminuição significativa da extensibilidade, causando rigidez das estruturas musculoesqueléticas (Gonçalves, Gurjão e Gobbi, 2007).

Lehto, Jarninen e Nelimarkka (1986) relatam que o aumento de produção de TC é capaz de inibir a capacidade de regeneração muscular e de dificultar o seu dinamismo. Porém, foi possível observar no presente estudo que a porcentagem de tecido conjuntivo dos grupos foi similar, ou seja, o

treinamento de natação proposto manteve a porcentagem similar ao grupo sedentário, o que se observa em relatos de Gonçalves, Gurjão e Gobbi (2007) que a atividade física pode ser um importante fator para o remodelamento do tecido conjuntivo e das fibras de colágeno, prevenindo assim a diminuição da amplitude de movimento.

Sabe-se que a tipagem de fibras musculares sofre alterações no processo de envelhecimento, sendo que as fibras do tipo II são mais afetadas nesse período, ao passo que tendem a uma inervação deficiente ao longo do tempo (Degens, 2010). É sabido que outros fatores, como a imobilização, por exemplo, são capazes de multiplicar essa degradação muscular durante o envelhecimento devido ao seu desuso. (Lieber, 2002; Tanaka, Kariya e Hoshino, 2004; Minamoto, 2005).

Morse et al. (2005) afirmam ainda que a redução da AST do músculo de idosos parece estar associado à diminuição na sua capacidade de produção de força.

Os dados da análise morfométrica demonstraram que o treinamento de natação não interferiu na AST dos músculos diafragma (fibras mistas) e sóleo (predomínio de fibras tipo I). Entretanto, no músculo gastrocnêmio branco (predomínio de fibras tipo II) houve aumento da AST no grupo treinado.

Os resultados obtidos no estudo mostram que o protocolo de treinamento utilizado foi efetivo estimular a hipertrofia das fibras musculares tipo II, minimizando as alterações que decorrem do envelhecimento, quando realizado por no mínimo três vezes na semana.

Quando há o acréscimo de carga no treinamento, os resultados são diferentes. Nascimento et al. (2008) ao avaliarem o efeito de um treinamento de

natação, com 60 minutos de duração, três vezes na semana, com incremento de carga de até 8% da massa corporal, durante seis semanas, observaram redução na proporção de fibras musculares do tipo II do músculo tibial anterior. Já no músculo SOL verificaram que o treinamento de natação causou aumento nas fibras do tipo IIA (rápida) e diminuição nas fibras tipo I (lenta), caracterizando o treinamento de força do músculo quando há carga.

O treinamento de força (anaeróbico) é capaz de induzir o aumento no tamanho das fibras musculares, que está diretamente relacionada a massa muscular das fibras tipo II, com destaque em IIA (Campos et al., 2002).

Para que ocorra um efeito favorável no processo de contração muscular, as sinalizações das proteínas, como por exemplo o cálcio, precisam estar em perfeito funcionamento (Beard e Dulhunty, 2015). O trânsito de cálcio pelo retículo sarcoplasmático é um processo ativo, complexo, que envolve a participação de vários componentes. Por exemplo, sistemas de membrana e intracelulares de cálcio (canais tipo-L, rianodina, calsequestrina) regulam a quantidade de cálcio ofertado às proteínas contráteis durante o processo de contração (Zarnoff et al., 2009).

Para Pette e Staron (2001), todos os músculos são capazes de se adaptar as demandas funcionais com o aumento da atividade. Esta plasticidade se baseia principalmente em mudanças nas propriedades das fibras musculares. Apesar das diferenças nos tipos de fibras, todos os músculos utilizam o cálcio como sua principal molécula reguladora e de sinalização. Assim sendo, as proteínas envolvidas com o cálcio tem papel importante na contração de uma fibra muscular (Berchtold, Brinkmeier e Muentener, 2000).

Trappe et al. (2003) concluíram que o declínio da força muscular é devido a alterações na velocidade de contração ou na sensibilidade de Ca^{2+} do aparelho contrátil. Delbono, O'Rourke e Ettinger (1995) salientam ainda que a diminuição da liberação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, decorrente do processo de envelhecimento, pode acarretar dificuldade no desempenho da musculatura em idosos.

Deste modo, ao analisar umas dessas proteínas que se liga ao cálcio, a calsequestrina (CSQ), localizada no retículo sarcoplasmático, foi possível verificar que os músculos GB e SOL do grupo TR apresentaram redução no seu conteúdo.

Kinnunen e Mänttari (2012) analisaram a expressão da proteína CSQ em diferentes tecidos musculares de ratas jovens, divididas aleatoriamente em três grupos e submetidas aos protocolos de treinamento. Um grupo realizou exercícios em esteira de alta intensidade, de curta duração, outro grupo o exercício foi de baixa intensidade e longa duração durante seis semanas, e outro grupo foi o controle (sedentário). Verificou-se que o nível de CSQ após o treinamento foi reduzido significativamente nos músculos SOL do grupo que realizou treinos de baixa intensidade e de longa duração, porém apresentaram aumento no músculo GB.

Devido à escassez de estudos relacionando CSQ e treinamento, os resultados do presente estudo sugerem que a diminuição da concentração de proteína no GB ocorreu pela idade dos animais.

Lamboley et al. (2015) avaliaram o músculo vasto lateral de indivíduos jovens e idosos e verificaram que há pequena concentração de Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático em fibras de indivíduos velhos, que

resulta na diminuição da liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático no citosol, comprometendo assim a qualidade da contração muscular. Entretanto, não foi observado redução no conteúdo de CSQ.

A citocina TGF- β 1 é entendida por agir em vários processos celulares como a diferenciação e apoptose, angiogênese, proliferação de fibroblastos produção da matriz extracelular, que podem resultar em fibrose (Heldin, Miyazono e Dijke, 1997).

Os resultados do presente estudo indicam redução estatisticamente significativa do conteúdo de TGF- β 1 no músculo GB treinado, quando comparado ao sedentário. Analisando a porcentagem de área de tecido conjuntivo, nota-se que houve o menor percentual no músculo GB do grupo TR, entretanto sem diferença estatística. A redução do TGF- β 1 e aumento da AST no músculo GB do grupo TR, indica que o protocolo proposto foi eficaz para este músculo.

Apesar de a literatura descrever que as fibras musculares do tipo II são mais afetadas com o processo de envelhecimento, verificou-se que o treinamento aeróbico é capaz de prevenir possíveis alterações do tecido muscular envelhecido. Acredita-se que o treinamento de força simultânea ao treinamento aeróbico deve ser considerado durante as práticas clínicas, com o intuito de trabalhar todos os tipos de fibras musculares.

Tendo em nota os resultados aqui encontrados, sugere-se que outros estudos devem ser realizados, a fim de comparar treinamentos aeróbicos e anaeróbicos com a mesma frequência semanal, e também, com a associação dos dois treinamentos no mesmo modelo experimental.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o treinamento de natação foi capaz de manter as condições estruturais do músculo gastrocnêmio, levando a hipertrofia muscular e mantendo a quantidade de tecido conjuntivo similar em todos os músculos analisados, além de favorecer a bradicardia em repouso. O conteúdo da proteína calsequestrina e da citocina TGF- β 1 demonstraram a capacidade adaptativa do animal frente ao treinamento, indicando que mesmo um exercício regular, sem carga e realizado três vezes na semana promove efeitos positivos no músculo esquelético de ratas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

Baptista RR, Vaz MA. Muscle architecture and aging: functional adaptation and clinical aspects; a literature review. *Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo.* 2009; 16 (4): 368-73.

Barbier J, Lebillier E, Ville N, Rannou-Bekono F, Carré, F. Relationships between sports-specific characteristics of athlete's heart and maximal oxygen uptake. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation,* 2006, 13(1): 115-121.

Barros JGD, et al. Treinamento físico de natação promove remodelamento cardíaco e melhora a perfusão sanguínea no músculo cardíaco de SHR via mecanismo dependente de adenosina. *Rev. Bras Med Esporte.* 2011 junho; 17(3): 193-197

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

* Baseadas Na Norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005

Beard NA, Dulhunty AF: C-terminal residues of skeletal muscle calsequestrin are essential for calcium binding and for skeletal ryanodine receptor inhibition. *Skeletal Muscle*, 2015.

Berchtold MW, Brinkmeier H, Muentener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000, 80:1215–1265.

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

Bezerra P, Shou S, Crowley Z, Brooks L, Hooper A. Effects of unilateral electromyostimulation superimposed on voluntary training on strength and cross-sectional area. *Muscle Nerve*, 2009; 40: 430–437.

Bickel, C.S.; Slade, J.; Mahoney ED.; Haddad D.; Dudley A.; Adams GR. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol*. 2005. 98:482–488.

Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev Paul Educ Fis*. 2004; 18:21-31.

Bruusgaard JC, Gundersen K. In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118(4):1450-7.

Campos GE, Luecke TJ, Wendeln H.K. Toma K. Hagerman FC. Murray, TF, Ragg KE. Ratamess NA. Kraemer WJ. Staron RS. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol.* 2002.88:50-60.

Cardinot T, Moretti A, Mattos K, Brum P, Souza H. Comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca em camundongos LDLr-/- submetidos a programa preventivo de treinamento físico aeróbico. *Coleção Pesquisa em Educação Física.* 2013; 12(1):71-78.

Carreño, J.E., Apablaza, F., Ocaranza, M.P., Jalil, J.E. Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Revista Española de Cardiología*, May 2006, 59 (5): 473-486.

Carvalho J, Soares JMC: Envelhecimento e força muscular - breve revisão. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2004, 4 (3): 79-93

Colan, S.D. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. *Cardiology Clinics*, Aug.1997, 15(3): 355-372.

Corrado D, et al. Trends in Sudden Cardiovascular Death in Young Competitive Athletes After Implementation of a preparticipation Screening Program. *JAMA*. 2006; 296:1593-1601.

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

Deccache W. ECG para o clínico – Laudo e Orientação Terapêutica. 1ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009: 73-87

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

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

Delbono O, O'Rourke KS, Ettinger WH. Excitation-calcium release uncoupling in aged single human skeletal muscle fibers. *J Membr Biol*, 1995; 148: 211-222.

Deschenes MR. Effects of Aging on Muscle Fibre Type and Size. *Sports Med* 2004;34:809-824.

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

Freimann S, Scheinowitz M, Yekutieli D, Feinberg MS, Eldar M, Kessler-Icekson G. Prior Exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. J Am Coll Cardiol. 2005; 45(6):931-938.

Gonçalves, R., Gurjão, ALD., Gobbi, S.: efeitos de oito semanas do treinamento de força na flexibilidade de idosos. Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum. 2007;9 (2)145-153.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perfil dos idosos responsáveis pelos domicílios no Brasil. Rio de Janeiro; 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>.

Kinnunen S, Mänttari S: Specific effects of endurance and sprint training on protein expression of calsequestrin and SERCA in mouse skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil, 2012, 33:123–130.

Kumar S, Kela AK, Mehta VL, Shukla AK: Preferred anesthetic agents in experimental cardiology: A study on rat electrocardiogram. *Indian J. Pharmacol*, (27) 127-129, 1995.

Lamboley CR, Wyckelsma VL, Dutka TL, McKenna MJ, Murphy RM, G.D. Lamb: Contractile properties and sarcoplasmic reticulum calcium content in type I and type II skeletal muscle fibres in active aged humans. *Journal of Physiology*, 2015: 1-16.

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

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

Magalhães, FDC et al., hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte* – 2008, 7 (1): 189-193.

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

McElroy CL, Gissen SA, Fishbein MC. Exercise induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation*. 1978; 57(5):958-962.

Medeiros A, et al. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Rev Paul Educ Fís, São Paulo*. 2000; 14(1):7-15.

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

Morse CI, Thom JM, Reeves ND, Birch KM, Narici MV. In vivo physiological cross-sectional area and specific force are reduced in the gastrocnemius of elderly men. *J Appl Physiol*. 2005; 99 (3):1050-5.

Nascimento CCF, Padula N, Milani JG, Shimano AC, MartinezEZ, Mattiello-Sverzut AC. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle to swimming, immobilization and rehabilitation. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41 (9): 818-824.

Negrão CE, Rondon MUPB. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8(1): 1-7.

Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, et al. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American

College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Medicine Science Sports Exercice*. 2007; 39(8):1435-1445.

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

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

Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol*. 2001; 115:359–372.

Pierine DT, Nicola M, Oliveira EP. Sarcopenia: alterações metabólicas e consequências no envelhecimento. *Rev Bras. Ciencia e Movimento* 2009;17(3):96-103.

Póvoa R, Souza D. Análise crítica do eletrocardiograma e do ecocardiograma na detecção da hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens*. 2008; 15(2):81-89.

Rogatto GP, Luciano E. Influência do treinamento físico Intenso sobre o metabolismo de proteínas. *Motriz Jul-Dez*, 2001, 7(2): 75-82.

Santos MRV, Souza VH, Menezes IAC, Biterncurt JL, Rezende-Neto JM, Barreto AS, Cunha FA, Marçal RM, Teixeira-Silva F, Quintans-Júnior LJ, Barbosa APO. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade de Sergipe. Scientia Plena. 2010; 6(10):1-6.

Santos-Júnior FFU, Alves JSM, Machado AAN, Carlos OS, Ferraz ASM, Barbosa R. Alterações Morfométricas em Músculo Respiratório de Ratos Submetidos à Imobilização de Pata. Rev Bras Med Esporte. 2010; 16(3): 215-218.

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

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

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

Trappe S, Gallagher P, Harber M, Carrithers J, Fluckey J & Trappe T: Single muscle fibre contractile properties in young and old men and women. J Physiol, 2003: 47-58.

Urhausen, A., Kindermann, W. Sports-specific adaptations and differentiation of the athlete's heart. *Sports Medicine*, Oct. 1999, 28(4): 237-244.

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

Vechetti Júnior IJ, Aguiar AF, Souza RWA de, Silva MDP. Efeitos do treinamento aeróbio e de força sobre a área de secção transversal (ast) das fibras do músculo plantar de ratos. *Coleção Pesquisa em Educação Física – 2010*. 9(4): 1981-4313.

Veiga et al. Repercussões cardíacas após exercício e infarto do Miocárdio em Ratas Submetidas Previamente a Exercício Físico. *Arq Bras Cardiol*. 2013; 100(1):37-43.

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

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

<http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en>.

Zarnoff, LAM., Paiva, SAR., Duarte, DR., Spadaro, J.:Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas. Arq Bras Cardiol 2009; 92(2):157-164

Anexo

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



Piracicaba, 18 de setembro de 2013

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

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

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

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Carlos Alberto da Silva', is placed on a light green rectangular background.

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