UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PRISCILA CAÇÃO BENEDINI DE OLIVEIRA ELIAS

**Análise das respostas musculares adaptativas frente a
protocolos de alongamento e exercício excêntrico,
aplicados após desuso do membro posterior de ratas em
desenvolvimento pós-natal**

Ribeirão Preto

2009

PRISCILA CAÇÃO BENEDINI DE OLIVEIRA ELIAS

**Análise das respostas musculares adaptativas frente a
protocolos de alongamento e exercício excêntrico,
aplicados após desuso do membro posterior de ratas em
desenvolvimento pós-natal**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de **Mestre em
Ciências da Reabilitação**.

Área de Concentração: Avaliação e Intervenção
do Sistema Neuromuscular e Cardiorrespiratório.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Mattiello-Sverzut

Ribeirão Preto

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Benedini-Elias, Priscila Cação Oliveira

Análise das respostas musculares adaptativas frente a protocolos de alongamento e exercício excêntrico, aplicados após desuso do membro posterior de ratas em desenvolvimento pós-natal.

147 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Avaliação e Intervenção do Sistema Neuromuscular e Cardiorrespiratório. Orientadora: Mattiello-Sverzut, Ana Cláudia

1. Desenvolvimento infantil. 2. Ratas. 3. Imobilização. 4. Exercício. 5. Alongamento muscular. 6. Sóleo. 7. Plantar. 8. Morfologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidata: Priscila Cação Benedini de Oliveira Elias

Título da dissertação: Análise das respostas musculares adaptativas frente a protocolos de alongamento e exercício excêntrico, aplicados após desuso do membro posterior de ratas em desenvolvimento pós-natal.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de concentração: Avaliação e Intervenção do Sistema Neuromuscular e Cardiorrespiratório.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Bênção - Morro do Cristo, Rifaina, São Paulo, Brasil

Dedico este trabalho aos alicerces da minha existência,
escolhidos por Deus...

Meus pais, **Gilberto e Izilda**, e minha irmã, **Leícia**, por me
mostrarem os verdadeiros princípios da felicidade na união e na
convivência intensa do nosso dia a dia!

Meu marido, **Moysés**, com quem venho formar
nossa nova família!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, primeiramente, minha orientadora **Profª Drª Ana Cláudia Mattiello-Sverzut**. Obrigada pela intensa e alegre convivência em todos esses anos, desde o início da sua docência na Universidade de São Paulo, quando você me contagiou com os anseios da pesquisa científica e, ao mesmo tempo, passou ensinamentos em todos os sentidos da vida. A amizade é verdadeira e por isso não terá fim... muito obrigada por tudo!

Agradeço

À **Universidade de São Paulo**, em particular **ao curso de Fisioterapia** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde iniciei minha formação profissional com muita satisfação e empenho na 1ª turma desse curso.

Ao **Programa de Pós-Graduação Ortopedia Traumatologia e Reabilitação**, pelo fortalecimento da minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **Fapesp** – pelo apoio científico e financeiro dado a este estudo (Processo Fapesp nº 07/51717-1), o que possibilitou realizá-lo com qualidade.

Ao Prof. Dr. **Luciano Neder Serafini**, do Departamento de Patologia, por compartilhar todo o laboratório para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **José Batista Volpon**, do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, por viabilizar o treino dos animais em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. **Edson G. Martinez** do Departamento de Medicina Social, pelos ensinamentos e apoio na análise estatística deste trabalho.

À grande amiga e professora, **Maria Paula Montiani Scandar**, por todo ensinamento teórico e prático na bancada, garantindo, assim, a qualidade na confecção dos materiais processados neste trabalho. E, ainda, pelas experiências de vida que nunca hesitou em ensinar.

À aluna de Iniciação Científica, **Mariana Calvente Morgan**, que iniciou sua carreira na pesquisa experimental e muito incrementou o andamento deste estudo através de sua dedicação e empenho.

Às amigas, **Juliana Cristina Polizello e Anabelle Silva Cornachione**, pela grande amizade e respeito que tenho por vocês que sempre compartilharam suas experiências e conhecimentos da nossa linha de pesquisa. Obrigada por dividirem momentos de sabedoria e auxiliarem diretamente essa conquista.

Às amigas, **Cyntia Rogean de Jesus Alves de Baptista e Tatiana Maciel Pizzato**, que, mesmo seguindo por caminhos científicos distintos, sempre estiveram disponíveis para apoiar e compartilhar seus conhecimentos e, ainda, para descontrair o nosso dia de trabalho, principalmente ao final dele. Obrigada, meninas, pela verdadeira amizade!

À amiga e técnica, **Deise Lúcia Chesca Simões**, por viabilizar processamentos realizados neste estudo, imprescindíveis para sua finalização, através de sua experiência profissional. Obrigada pelo seu apoio e amizade.

À amiga e técnica, **Ana Maria Anselmi**, do serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pelo suporte no desenvolvimento da Imunoistoquímica realizada neste trabalho com muita competência e profissionalismo.

Aos amigos do Laboratório de Neuropatologia, **Leonardo, Elder, Patrícia, Viviane, Beatriz, Tainan, Maria Laura, Gustavo, Paula, Michele**, por compartilharmos um agradável ambiente de trabalho, em que ocorreram tantos momentos de estudo e descontração.

Ao amigo, **Cláudio Back**, que fez parte de todo o início da minha experiência na pesquisa científica, tendo-me como aluna de Iniciação do seu projeto de Mestrado. Obrigada por transmitir toda a sua serenidade e conhecimentos na pesquisa com humanos que muito incrementou meu amadurecimento profissional.

Às secretárias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, **Maria de Fátima, Elisângela e Maria Goretti**, e às secretárias do Departamento de Patologia, **Neide, Rosângela e Camila**, por todo atendimento e informações concedidas durante a elaboração desta dissertação, feitos com muita solicitude.

Aos técnicos, **Paulo e Francisco**, que muito auxiliaram quando da fase experimental deste estudo com seus conhecimentos práticos na criação e manejo dos animais.

Às minhas amigas de infância, **Fabiola, Juliana, Natália, Marina e Mariela**, e também às amigas da 1ª Turma de Fisioterapia, **Priscila e Leticia**, pela grande escuta que me deram, sempre, e compartilharam anseios deste trabalho em momentos de amizade e carinho.

Aos meus avós, **Mario, Hermantina, Geraldo, Clarinda** e, minha bisavó, **Felícia**, pela dádiva da convivência em grande parte de minha vida, quando recebi tantas lições e bênçãos.

Ao meu marido, **Moisés**, que me apoiou incondicionalmente na carreira científica, desde a graduação, e perseverou junto comigo mantendo meus objetivos diante dos olhos para nunca abandoná-los. Obrigada por entender minhas ausências e, ainda, me coorientar nas importantes decisões de cada dia. Agradeço também à sua família que sempre me incentivou e compartilhou dessa fase de estudo... **Tatiana, Tamara, Eduardo, Tânia, Paulo Sérgio (Paizetin) e Márcia**.

À minha irmã, quase gêmea, **Letícia**, viemos traçando nossas vidas de forma parecida! Além de crescermos juntas, escolhemos a mesma carreira, na mesma Universidade, experimentando a mesma linha de pesquisa científica. Obrigada pela melhor amiga que você é para mim, seja qual for a fase da vida em que estivermos.

Aos meus pais, **Gilberto e Izilda**, que me deram o dom de existir e crescer em uma verdadeira família, sempre compartilhando todas as etapas da minha vida, e, nessa, não foi diferente. Obrigada pelo carinho, preocupação e zelo que sempre tiveram comigo e meus estudos, essa é mais uma etapa da minha formação acadêmica que cumpro graças aos ensinamentos que aprendi ao lado de vocês.

Ao meu **DEUS**, pela Vida, Força, Proteção, Fé e Luz que sempre pedi e Ele nunca me faltou...

TRABALHOS CIENTÍFICOS PRODUZIDOS COM OS DADOS DESTA DISSERTAÇÃO

MORGAN, M. C.; BENEDINI-ELIAS, P. C. O.; MATTIELLO-SVERZUT A. C. Alterações do músculo esquelético após o uso de modelo de imobilização para ratas em desenvolvimento pós-natal. In: 16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2008, Ribeirão Preto. 16º SIICUSP. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.

BENEDINI-ELIAS, P. C.; MORGAN, M. C.; GOMES, A. R.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Changes in postnatal skeletal muscle development induced by alternative immobilization model in female rat. **Anatomical Science International**, Carlton, v. 84, n. 3, p. 218-25, 2009.

CORNACHIONE, A. S.; CAÇÃO-BENEDINI, L. O.; BENEDINI-ELIAS, P. O. C.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Twenty-one days of eccentric exercise increment further capillarization of soleus muscle in adult rats than in baby rats after immobilization. In: 45th International Congress on Anatomy, 2009, Pilsen. 45th International Congress on Anatomy. Pilsen: Medical Faculty in Pilsen, 2009.

BENEDINI-ELIAS, P. C.; MORGAN, M. C.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Resposta angiogênica do alongamento em músculos de ratas bebês pós-imobilização. Submissão do trabalho In: XVIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia, 2009, Rio de Janeiro. XVIII COBRAAF. Rio de Janeiro: AFB, JZ Congressos, 2009.

MORGAN, M. C.; BENEDINI-ELIAS, P. C.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Adaptações angiogênicas do músculo esquelético em ratas em desenvolvimento pós-natal. Submissão do trabalho In: 17º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. 17º SIICUSP. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2009.

RESUMO

BENEDINI-ELIAS, P.C.O. **Análise das respostas musculares adaptativas frente a protocolos de alongamento e exercício excêntrico, aplicados após desuso do membro posterior de ratas em desenvolvimento pós-natal.** 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O presente estudo analisou as mudanças e adaptações geradas pelos protocolos de alongamento e exercício excêntrico nos músculos sóleo e plantar, após 10 dias de imobilização do membro posterior de ratas em desenvolvimento pós-natal. Para isso, 45 ratas da raça Wistar, com 21 dias de idade, foram divididas em 10 grupos: grupo imobilizado (GI); grupo imobilizado e treinado excentricamente por 10 dias (GITE₍₁₀₎) ou 21 dias (GITE₍₂₁₎); grupo imobilizado e alongado por 10 dias (GIAL₍₁₀₎) ou 21 dias (GIAL₍₂₁₎); grupo anestesiado (GA); grupo controle de 21 dias de idade (GC_(zero)); grupo controle do imobilizado de 31 dias de idade (GC_(Imob)); grupo controle de 10 dias com 41 dias de idade (GC₍₁₀₎); grupo controle de 21 dias com 52 dias de idade (GC₍₂₁₎). A imobilização foi aplicada por 10 dias no membro posterior direito dos animais, a fim de manter a posição de encurtamento dos músculos sóleo e plantar. Posteriormente, as ratas do GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎ passaram pelo período de treino excêntrico em esteira declinada, por 40 minutos. Enquanto os animais do GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ foram submetidos ao alongamento mantido por 40 minutos, através da fixação da dorsiflexão máxima permitida pelo tornozelo. Após os protocolos, os fragmentos dos músculos sóleo e plantar foram retirados e submetidos às reações histoquímica, imunoistoquímica e bioquímica. Análise qualitativa e quantitativa (isoformas de MHC, proporção de fibras, diâmetro menor e relação capilar/fibra) foram realizadas. Para análise estatística foi usado o Modelo Linear de Efeitos Mistos com nível de significância de 5% e Intervalo de Confiança de 95%. A partir da análise temporal do desenvolvimento muscular dos animais, foram observadas características de imaturidade dos músculos sóleo e plantar (fibras arredondadas, núcleos volumosos, reatividade do tecido), principalmente em animais com 21 e 31 dias de idade. Aumento progressivo do diâmetro das fibras e da relação capilar/fibra, em ambos os músculos, foram observados. O predomínio de FT1 e maior expressão da MHCI já estavam evidentes no músculo sóleo, mesmo de animais com 21 dias de idade. O músculo plantar apresentou predomínio de FT2D na análise da mATPase, e a avaliação das isoformas indicou predomínio da MHCIIId e MHCIIb. O procedimento de imobilização desencadeou alta reatividade do tecido, redução do diâmetro de todos os tipos de fibras, mudança na proporção das fibras (redução de FT1 no sóleo e aumento de FT2D no plantar) e na expressão das isoformas de MHC, e queda do número de capilares transversais. A aplicação do alongamento e exercício excêntrico provocou adaptações importantes como o aumento do diâmetro das fibras, modificação da proporção das fibras e aumento da relação capilar/fibra, em ambos os músculos. Da análise morfológica, o músculo sóleo apresentou maior reatividade, quando comparado ao músculo plantar, com grande quantidade de núcleos centralizados e halo basofílico. O treino excêntrico foi capaz de intensificar as respostas hipertrófica e angiogênica, principalmente no período de 21 dias de reabilitação. Portanto, o desenvolvimento muscular normal foi acompanhado por adaptações importantes que correspondem ao avançar da idade juntamente com o aumento da demanda funcional nessa fase. O dispositivo de imobilização foi eficaz para promover o desuso e encurtamento dos músculos avaliados. Diferenças nítidas entre a resposta adaptativa dos músculos sóleo e plantar são observadas em ambos os protocolos de reabilitação no animal bebê.

Palavras chaves: Desenvolvimento infantil. Ratas. Imobilização. Exercício. Alongamento muscular. Sóleo. Plantar. Morfologia.

ABSTRACT

Benedini-Elias, P.C.O. **Analysis of adaptive muscular responses to stretching and eccentric exercises applied after immobilization of the hindlimb in female rats in postnatal development.** 2009. 147 p. Master Dissertation - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo at Ribeirão Preto, 2009

This study analyzed changes and adaptations in the soleus and plantar muscles induced by stretching and eccentric exercise protocols applied after 10 days immobilization of the hindlimb in developing female rats. Forty-five Wistar female rats, 21 days old, were divided into 10 groups: Immobilized (IG); Immobilized and trained eccentrically for 10 days (IEG₍₁₀₎) or 21 days (IEG₍₂₁₎); Immobilized and stretched for 10 days (ISG₍₁₀₎) or 21 days (ISG₍₂₁₎); Anesthetized (AG); Control, 21 days old (CG_(zero)); Control of immobilized group, 31 days old (CG_(Immob)); Control group of 10 days, 41 days old (CG₍₁₀₎) or 21 days, 52 days old (CG₍₂₁₎). The animals had the right hindlimb immobilized for 10 days keeping the soleus and plantar muscles in a shortened position. Rats in the IEG₍₁₀₎ and IEG₍₂₁₎ groups were further submitted to eccentric training in a declining treadmill for 40 minutes, while the ones in groups ISG₍₁₀₎ and ISG₍₂₁₎ were stretched for 40 minutes by fixing the maximum ankle dorsiflexion. Fragments of the soleus and plantar muscles were removed and analyzed by histochemical, immunohistochemical and biochemical assays, after sacrifice of the animals. Qualitative and quantitative analysis were made of Myosin Heavy-Chain (MHC) isoforms, fiber proportion, minimum diameter and capillary/fiber ratio. Data was statistically analyzed by the method of Mixed Effects Linear Models with a significance level of 5% and confidence interval of 95%. Temporal analysis of muscle development suggested immaturity of soleus and plantar muscles (rounded fibers, voluminous nuclei and tissue reactivity) specially in animals aged from 21-31 days. Progressive increase of fiber diameter and the capillary/ fiber ratio was also observed. Predominance of FT1 fibers and higher MHCI expression were already evident in the soleus muscle even in 21 days old animals. Analysis of mATPase showed that FT2D fibers were predominant in the plantar muscle as were the isoforms MHCIIId and MHCIIb. Immobilization produced high tissue reactivity, diameter reduction in all fiber types, changes in fiber proportion (reduction of FT1 in the soleus and increase of FT2D numbers in the plantar muscles) and MHC isoform expressions and decreased number of transversal capillars. Both, stretching and eccentric exercises induced important adaptations like increased fiber diameter, modified fiber proportions and increased capillary/ fiber ratios in the soleus and plantar muscles. Morphological analysis indicated that the soleus was more reactive as compared to the plantar muscle, showing large quantities of centralized nuclei and a basophilic halo. Eccentric training induced greater hypertrophic and angiogenic responses, specially during the 21 days rehabilitation. Thus, normal muscular development in this phase was accompanied by major adaptations, which correspond to advancing age and increased functional demand. The immobilization apparatus was efficient in preventing use and promoting shortening of the muscles evaluated. Sharp differences between adaptive responses of soleus and plantar muscles were observed in both rehabilitation protocols applied to baby animals.

Key words: Child Development. Rats. Immobilization. Exercise. Muscle Stretching Exercise. Soleus muscle. Plantaris muscle. Morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Detalhamento da organização do músculo esquelético (SMITH et al., 1997).....29

Figura 2 - Procedimentos para imobilização do membro posterior. A - A parte superior do modelo é similar a uma camiseta confeccionada com tecido *viscolycra* (medidas em cm). B - Parte inferior, dividida em anterior e posterior, é feita com malha de aço e revestida com esparadrapos (medidas em cm). Para proteger o quadril e a região anterior da pata imobilizada, o algodão foi colocado em todo o compartimento anterior do dispositivo (asterisco). C - União das partes superior e inferior através de grampos. D - Após vestir a camiseta no animal, articulação fíbio-társica foi posicionada em flexão plantar máxima com *micropore* (cabeça de seta). E - O membro posterior direito foi fixado à parte anterior da malha de aço com uma tira de *micropore* na região do tornozelo (seta). F - União das partes anterior e posterior da malha de aço fixadas através da fita adesiva ao redor do quadril e tornozelo (asteriscos). G - Para a manutenção da qualidade e posição do dispositivo, foi fixada uma fita ao redor do abdômen do animal, entre a camiseta e a tela de aço (seta larga). Além disso, duas tiras de 0,5cm foram colocadas passando pela parte superior de ambos os ombros como um suspensório (seta fina).....46

Figura 3 - Esteira motorizada para ratos da marca Insight® - modelo EP-131 com declinação de 16°.....47

Figura 4 - Alongamento mantido pós-imobilização dos músculos sóleo e plantar através da flexão dorsal máxima da articulação do tornozelo, fixada por uma fita adesiva (asterisco) no membro posterior direito de ratas recém-desmamadas.....49

Figura 5 - Ilustração do *software* Qualiview® - Atonus durante a realização da análise morfométrica para proporção e diâmetro menor dos diferentes tipos de fibras. Observa-se algumas das variáveis medidas pelo programa, como: área, diâmetro menor (D. Menor) e diâmetro maior (D. Maior) demonstradas na tabela à direita da imagem. As fibras são indicadas com diferentes cores para facilitar sua visualização após a classificação de cada uma delas. Os comandos para contagem de fibras (proporção) e diâmetros são dados nos quadrados localizados no canto superior direito da figura.....53

Figura 6 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo e plantar do Experimento 1. A-D Músculo sóleo; E-H músculo plantar. A, E - GC_(zero); B, F - GC_(Imob); C, G - GC₍₁₀₎; D, H - GC₍₂₁₎. Observa-se a forma arredondada das fibras (*) nos animais menor de idade (21 e 31 dias). Variação no volume nuclear pode ser evidente entre as diferentes idades dos grupos e entre os músculos sóleo e plantar (seta). Barra: 60µm.60

Figura 7 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo nos grupos do Experimento 1.....63

Figura 8 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar nos grupos do Experimento 1.64

Figura 9 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo (A-F) e plantar (G-M) do Experimento 2. A, G - GC_(Imob); B, H - GI; C, I - GC₍₁₀₎; D, J - GIAL₍₁₀₎; E, L - GC₍₂₁₎; F, M - GIAL₍₂₁₎. Observa-se a forma arredondada das fibras do GI que apresentam tamanho muito reduzido comparado ao GC_(Imob) (*). Grande quantidade de núcleos centralizados foi observada no músculo sóleo dos grupos alongados (seta). Barra: 60µm.....79

Figura 10 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo nos grupos do Experimento 2.	82
Figura 11 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar nos grupos do Experimento 2.	83
Figura 12 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo (A-F) e plantar (G-M) do Experimento 3. A, G – GC _(Imob) ; B, H – GI; C, I – GC ₍₁₀₎ ; D, J – GITE ₍₁₀₎ ; E, L – GC ₍₂₁₎ ; F, M – GITE ₍₂₁₎ . Observa-se a forma arredondada das fibras do GI que apresentam tamanho muito reduzido comparado ao GC _(Imob) (*). Grande quantidade de núcleos centralizados foi observada no músculo sóleo dos grupos treinados por 10 e 21 dias (seta). Barra: 60µm	100
Figura 13 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo nos grupos do Experimento 3.	103
Figura 14 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar nos grupos do Experimento 3.	104
Figura 15 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo (A-D) e plantar (E-H). A, E – GIAL ₍₁₀₎ ; B, F – GITE ₍₁₀₎ ; C, G – GIAL ₍₂₁₎ ; D, H – GITE ₍₂₁₎ . Observa-se a forma arredondada das fibras dos grupos tratados por 10 dias (*) e grande quantidade de núcleo centralizado no músculo sóleo de todos os grupos (seta). Ressalta-se a maior reatividade do músculo sóleo quando comparado ao músculo plantar, principalmente nos animais tratados por 10 dias (A, E; B, F) Barra: 60µm	116
Figura 16 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo.....	119
Figura 17 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos de animais e procedimentos experimentais realizados.....	43
Tabela 2 - Combinação dos grupos de acordo com o objetivo de cada experimento.....	44
Tabela 3 - Intervalos, tempo progressivo do treino e distância percorrida pelos animais submetidos ao treinamento excêntrico pertencentes aos grupos GITE ₍₁₀₎ e GITE ₍₂₁₎	48
Tabela 4 - Intervalos de dia, tempo progressivo do alongamento e dose da anestesia aplicada nos animais dos grupos GIAL ₍₁₀₎ , GIAL ₍₂₁₎ e GA.	49
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso Inicial) e no dia do sacrifício (peso final), referentes ao Experimento 1. Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$).....	57
Tabela 6 - Quantidade média e desvio padrão ($\pm$ DP) das alterações patológicas do músculo sóleo, em número de fibras, referentes ao Experimento 1.....	58
Tabela 7 - Quantidade média e desvio padrão ($\pm$ DP) das alterações patológicas do músculo plantar, em número de fibras, referentes ao Experimento 1.	59
Tabela 8 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo do Experimento 1.	61
Tabela 9 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar do Experimento 1.....	62
Tabela 10 - Análise semiquantitativa das MHCs do músculo sóleo – Experimento 1.....	65
Tabela 11 - Valores percentuais relativos à expressão total de proteína (MHC) de cada grupo para o músculo sóleo – Experimento 1.	65
Tabela 12 - Análise semiquantitativa das MHCs do músculo plantar – Experimento 1.	66
Tabela 13 - Valores percentuais relativos à expressão total de proteína (MHC) de cada grupo para o músculo plantar – Experimento 1.....	67
Tabela 14 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) do músculo sóleo e plantar dos grupos controle estudados.....	67
Tabela 15 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso Inicial) e no dia do sacrifício (peso final), referentes ao Experimento 2. Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$).....	75
Tabela 16 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo sóleo, em número de fibras, referentes ao Experimento 2.....	77
Tabela 17 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo plantar, em número de fibras, referentes ao Experimento 2.	78
Tabela 18 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo do Experimento 2.	80
Tabela 19 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar do Experimento 2.....	81

Tabela 20 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo sóleo – Experimento 2.	84
Tabela 21 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo plantar – Experimento 2.	85
Tabela 22 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) do músculo sóleo e plantar dos grupos abordados no Experimento 2.	86
Tabela 23 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso Inicial) e no dia do sacrifício (peso final), referentes ao Experimento 3. Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$).	97
Tabela 24 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo sóleo, em número de fibras, referentes ao Experimento 3.	98
Tabela 25 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo plantar, em número de fibras, referentes ao Experimento 3.	99
Tabela 26 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo do Experimento 3.	101
Tabela 27 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar do Experimento 3.	102
Tabela 28 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo sóleo – Experimento 3.	105
Tabela 29 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo plantar – Experimento 3.	106
Tabela 30 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) do músculo sóleo e plantar dos grupos abordados no Experimento 3.	107
Tabela 31 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso Inicial) e no dia do sacrifício (peso final). Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$).	113
Tabela 32 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo sóleo, em número de fibras.	114
Tabela 33 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo plantar, em número de fibras.	115
Tabela 34 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo.	117
Tabela 35 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar.	118
Tabela 36 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo sóleo.	121

Tabela 37 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo plantar..... 121

Tabela 38 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) do músculo sóleo e plantar. 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FT1	-	Fibras Tipo 1
FT1C	-	Fibras Tipo 1C
FT2C	-	Fibras Tipo 2C
FT2AC	-	Fibras Tipo 2AC
FT2A	-	Fibras Tipo 2A
FT2AD	-	Fibras Tipo 2AD
FT2D	-	Fibras Tipo 2D
FT2DB	-	Fibras Tipo 2DB
FT2B	-	Fibras Tipo 2B
GC _(zero)	-	Grupo controle
GC _(Imob)	-	Grupo controle do imobilizado
GC ₍₁₀₎	-	Grupo controle de 10 dias
GC ₍₂₁₎	-	Grupo controle de 21 dias
GI	-	Grupo imobilizado
GIAL ₍₁₀₎	-	Grupo imobilizado e alongado por 10 dias
GIAL ₍₂₁₎	-	Grupo imobilizado e alongado por 21 dias
GA	-	Grupo anestesiado
GITE ₍₁₀₎	-	Grupo imobilizado e treinado excentricamente por 10 dias
GITE ₍₂₁₎	-	Grupo imobilizado e treinado excentricamente por 21 dias
ATPase	-	Adenosina trifosfatase miofibrilar
HE	-	Hematoxilina-eosina
NADH ₂ -TR		Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida tetrazolium redutase
NAS-BI.PA		Naftol AS-BI fosfatase
SDH		Desidrogenase succínica
rC/F	-	Relação capilar-fibra
MEC	-	Matriz extracelular
MHC	-	Cadeia pesada da miosina (<i>myosin heavy chain</i>)
MMPs	-	Metaloproteinases da matriz
VEGF	-	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	-	graus Celsius
cm	-	centímetro
g	-	grama
kg	-	kilograma
m	-	metro
m/min	-	metros por minuto
mg/kg	-	miligramas por kilograma
min	-	minuto
mL	-	mililitro
mm	-	milímetro
μm	-	micrômetro
s	-	segundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	24
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Músculo esquelético	27
3.2 Características do músculo esquelético	27
3.3 Classificação das fibras musculares	30
3.4 Morfologia e desenvolvimento muscular pós-natal	32
3.4.1 Em humanos.....	32
3.4.2 Em animais.....	33
3.4.3 Função neural e desenvolvimento	34
3.4.4 Idade de transição no desenvolvimento	35
3.4.5 Atividade hormonal e idade.....	36
3.5 Imobilização no período pós-natal.....	36
3.6 Alongamento e adaptação muscular pós-natal	38
3.7 Exercícios e respostas do músculo em desenvolvimento	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Animais	42
4.2 Grupos experimentais de estudo	42
4.3 Procedimentos experimentais	44
4.4 Preparação dos fragmentos musculares.....	50
4.5 Análises morfológica	52
4.6 Análise morfométrica	52
4.7 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 EXPERIMENTO 1 – Desenvolvimento muscular normal.....	57
5.1.1 Resultados.....	57
5.1.1.1 Peso corporal dos animais	57
5.1.1.2 Morfologia	58
5.1.1.3 Diâmetro menor das fibras	61
5.1.1.4 Análise de proporção	62
5.1.1.5 Análise Semiquantitativa das isoformas de MHC	64

5.1.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)	67
5.1.2 Discussão	68
5.2 EXPERIMENTO 2 – Alongamento mantido pós-imobilização	75
5.2.1 Resultados.....	75
5.2.1.1 Peso corporal.....	75
5.2.1.2 Morfologia	76
5.2.1.3 Diâmetro menor das fibras	80
5.2.1.4 Análise de proporção	81
5.2.1.5 Análise semiquantitativa das isoformas de MHC	84
5.2.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)	85
5.2.2 Discussão	86
5.3 EXPERIMENTO 3 – Treino excêntrico após desuso por imobilização	97
5.3.1 Resultados.....	97
5.3.1.1 Peso corporal.....	97
5.3.1.2 Morfologia	98
5.3.1.3 Diâmetro menor das fibras	101
5.3.1.4 Análise de proporção	102
5.3.1.5 Análise Semiquantitativa das isoformas de MHC	104
5.3.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)	106
5.3.2 Discussão	107
5.4 Análise comparativa dos protocolos: Alongamento mantido x treinamento excêntrico.....	113
5.4.1 Resultados.....	113
5.4.1.1 Peso corporal.....	113
5.4.1.2 Morfologia	114
5.4.1.3 Diâmetro menor	117
5.4.1.4 Análise de proporção	118
5.4.1.5 Análise semiquantitativa das isoformas de MHC	120
5.4.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)	122
5.4.2 Discussão	122
6 CONCLUSÕES	128
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
8 ANEXOS	139

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As afecções músculo-esqueléticas infantis apresentam alta prevalência na prática fisioterapêutica e requerem a aplicação de recursos e técnicas de reabilitação cada vez mais específicas. O conhecimento dos recursos terapêuticos utilizados e da resposta do tecido muscular, em constante transição, é imprescindível para o sucesso do tratamento de reabilitação adotado. Técnicas de alongamento e exercícios de resistência são empregados na abordagem da criança com o objetivo de prevenir, minimizar ou corrigir alterações físicas através da melhora funcional.

Estudos sobre as respostas adaptativas do sistema muscular no indivíduo em desenvolvimento, após o período de desuso e frente à aplicação de protocolos de reabilitação segmentar, são raros na literatura científica. Portanto, investigações que abordem as respostas adaptativas do tecido muscular em fase de crescimento e desenvolvimento, como observado na infância, são de extrema importância para a fundamentação da prática fisioterapêutica.

A partir desse propósito, modelos experimentais animais são utilizados por permitirem comparações com o tecido muscular de crianças, desde que respeitadas as limitações na extrapolação dos resultados, assim como no modelo adulto. As vantagens se mostram superiores às desvantagens. O período entre a 2ª e 3ª semana de vida do rato é caracterizado por inúmeras mudanças funcionais e teciduais. Nessa fase, ocorre aumento da demanda funcional com a saída do ninho, término da fase de desmame, transição da inervação polineural para a mononeural e do fenótipo das fibras musculares (PUNKT; NAUPERT; ASMOSEN, 2004). A idade do rato acima destacada representa a infância do animal, e corresponderá à fase alvo deste estudo.

Alterações da funcionalidade envolvem adaptações importantes do sistema musculoesquelético, que possui alta capacidade para se adequar às diferentes condições, representando importante mecanismo de plasticidade muscular. A diferenciação e maturação dos subtipos de fibras dos músculos esqueléticos são influenciadas diretamente

pelo padrão de inervação e pelos estímulos do meio ambiente durante o desenvolvimento motor infantil. A expressão das isoformas de MHC (*myosin heavy chain*) e a cinética da atividade da enzima mATPase de miosina se modificam desde o nascimento para se adequar ao aumento das demandas funcionais e determinam a classificação morfofuncional das fibras musculares (AGBULUT et al., 2003).

Além disso, o desenvolvimento pós-natal é caracterizado por importantes mudanças na atividade neuromuscular, na maturação da junção neuromuscular, no mecanismo excitação-contração e por grande aumento dos níveis de hormônio tireoideano (AGBULUT et al., 2003; PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004; SULLIVAN et al., 1995).

Mudanças relevantes da atividade neuromuscular, seja pelo excesso ou ausência de carga, têm mostrado influenciar a expressão fenotípica das fibras musculares esqueléticas (SULLIVAN et al., 1995), que se modificam para se adequarem às novas exigências. Portanto, alterações no desenvolvimento muscular nessa fase, primárias ou secundárias às afecções orgânicas, determinarão respostas adaptativas desse tecido. E, mais, a terapêutica a ser adotada para remediar as consequências das anomalias de desenvolvimento podem favorecer ou prejudicar a aquisição de funções motoras.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar as respostas morfológicas adaptativas dos músculos sóleo, formado por grande número fibras de contração lenta, e plantar, caracterizado pela maioria de fibras rápidas, de ratas em desenvolvimento pós-natal, mediante a aplicação de protocolos de treinamento do tipo alongamento e exercício excêntrico pós-imobilização segmentar.

Objetivos específicos

Experimento 1 – Desenvolvimento muscular normal

Acompanhar as adaptações típicas do desenvolvimento muscular nos músculos sóleo e plantar a partir de animais recém-desmamados de 21 dias, e subsequentes idades de 31, 41 e 52 dias.

Experimento 2 – Alongamento mantido pós-imobilização

Analisar as respostas adaptativas dos músculos sóleo e plantar frente à aplicação de protocolo de alongamento mantido, realizado durante 10 e 21 dias após o procedimento de imobilização.

Experimento 3 – Treino excêntrico após desuso por imobilização

Analisar os efeitos do exercício excêntrico aplicado durante 10 e 21 dias de reabilitação em animais submetidos previamente ao desuso por imobilização.

Análise comparativa dos protocolos: Alongamento mantido x treinamento excêntrico

Comparar as adaptações musculares desencadeadas por dois distintos protocolos de treinamento (alongamento x exercício excêntrico) nas respostas morfológicas dos músculos sóleo e plantar de animais submetidos à imobilização por um período de 10 dias.

Nos experimentos, as alterações musculares foram avaliadas através de:

- análise morfológica clássica;
- análise quantitativa, obtendo dados de diâmetro menor, proporção dos diferentes tipos de fibras e relação capilar/fibra;
- expressão das diferentes isoformas da cadeia pesada de miosina (MHC).

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

As principais relações morfológicas e terapêuticas do tecido muscular esquelético estão destacadas a seguir.

3.1 Músculo esquelético

O músculo esquelético é uma estrutura biológica complexa, especializada em gerar movimentos que possibilitam a aquisição de função e realização de diversas atividades por seres humanos e animais. Formados por estruturas contráteis (sarcômeros) e não contráteis (proteínas estruturais), os músculos apresentam propriedades plástica e elástica. Essas propriedades possibilitam sua adaptação às alterações da demanda funcional durante o desenvolvimento pós-natal, situações de inatividade, envelhecimento, técnicas de reabilitação como o alongamento e o exercício físico, com consequente reorganização de seus constituintes (COUTINHO et al., 2004; GOLDSPIK, 1998; KANNUS et al., 1998; PUNKT; NAUPERT; ASMOSEN, 2004) a fim de adequar seu desempenho.

3.2 Características do músculo esquelético

O músculo esquelético é formado por um conjunto células especializadas chamadas miofibras que são agrupadas em feixes denominados fascículos (Figura 1). As células musculares são de forma alongada, cilíndrica e polinucleada, com seus núcleos situados na periferia. As miofibras são formadas pelo conjunto de muitas miofibrilas compostas pela união de inúmeros sarcômeros em série e em paralelo, que correspondem à unidade contrátil do músculo esquelético (Figura 1). Cada miofibrila está envolvida por uma quantidade de tecido conjuntivo denominado endomísio. Os fascículos, agrupamento de miofibras, encontram-se envolvidos por outra camada de conjuntivo, o perimísio. Ao redor do músculo encontra-se o epimísio, que representa a camada mais externa de tecido

conjuntivo. Adicionalmente, axônios de nervos motores penetram o tecido conjuntivo não contrátil em suas diversas camadas para inervar, por meio de axônios terminais, cada miofibrila (KJÆR et al., 2003).

A miofibrila é composta por muitos miofilamentos que correspondem a fios finos formados por inúmeras moléculas de proteína, destaca-se aqui a importância da actina (filamentos finos) e a miosina (filamentos grossos) (Figura 1). A interação desses dois miofilamentos é essencial para que ocorra a contração muscular (SMITH et al., 1997).

Os miofilamentos finos de actina são compreendidos por actina, troponina e tropomiosina. Dois filamentos de actina estão torcidos um em torno do outro para formar parte do filamento de actina. A tropomiosina, outra proteína filamentar, apresenta também dois filamentos torcidos em torno da dupla hélice da actina. Por outro lado, a proteína globular troponina liga-se a uma região específica do filamento de tropomiosina e apresenta grande afeição pelos íons cálcio (Ca^{++}) (SMITH et al., 1997), sendo componente essencial para a ativação da contração muscular (CLARK et al., 2002).

O miofilamento grosso é composto por grandes moléculas de miosina, organizadas para formar um filamento longo (Figura 1). Cada molécula possui um alargamento, similar a uma cabeça, capaz de se mover e se ligar aos sítios da actina, gerando assim a contração ou relaxamento muscular (LEVITSKY, 2004).

Figura 1 - Detalhamento da organização do músculo esquelético

A membrana celular que envolve a fibra muscular é chamada sarcolema e seu citoplasma, que corresponde à unidade contrátil, é denominado sarcoplasma. Além de centenas de miofibrilas contráteis, estruturas importantes como mitocôndrias e retículo sarcoplasmático também estão presentes no sarcoplasma (SMITH et al., 1997). Importante conjunto de proteínas interliga essas duas regiões, sarcolema e sarcoplasma, formando o costâmero. A estrutura do costâmero contribui amplamente para a manutenção da integridade do sarcolema, visto suas funções de integração mecânica e celular, transmissão de força e sinalização química e mecânica (CAPETANAKI et al., 2007; KOMULAINEN et al., 1998).

Dentre as proteínas do costâmero, a desmina tem importante função na arquitetura e estabilidade da fibra muscular, unindo miofibrilas individualmente e conectando sarcômeros à membrana sarcoplasmática. Muito abundante no músculo esquelético, a desmina participa da manutenção da resistência muscular e em retransmiti-la aos tendões,

impedindo a interrupção da transmissão de força aos sarcômeros adjacentes (SHAH et al., 2004).

A distrofina é a proteína central de um complexo de proteínas multiméricas chamado complexo distroglicana que envolve os receptores transmembrana – α/β distroglicana (que se ligam à laminina), sarcoglicanas e distrobrevinas. A distrofina também realiza função importante na ligação entre o sarcolema, o costâmero (actina costamérica) e a matriz extracelular, sendo responsável pela organização estrutural e boa distribuição de força e estabilidade do sarcolema (CLARK et al., 2002). Outras proteínas estruturais como a distrobrevina, desmulina (muito presente no músculo em desenvolvimento), integrinas e merosina realizam importante função no ancoramento do aparato contrátil ao costâmero, na transmissão lateral de forças e na conexão do costâmero com proteínas de colágeno do tecido conjuntivo muscular (McCLUNG et al., 2004; SUNADA et al., 1994). Para visualização esquemática das proteínas ver figura em Ehmsen, Poon and Davies (2002).

A ausência de uma proteína específica ou de um grupo de proteínas do complexo produz enfraquecimento do sarcolema, que se encontra menos “ancorado” ao costâmero, e aumenta as chances de lesão à membrana durante a contração ou alongamento muscular.

3.3 Classificação das fibras musculares

O tecido muscular esquelético dispõe de ampla variedade de tipos de fibras com diferentes características contráteis, de forma que essa heterogeneidade acarretará em grande diversidade funcional, de acordo com o predomínio de determinado tipo de fibra (PETTE; STARON, 2000).

As fibras musculares recebem classificação baseada nas diferentes labilidades da atividade da enzima adenosina trifosfatase miofibrilar (mATPase), contida no filamento de miosina, mais precisamente na cadeia pesada da miosina (*myosin heavy chain* - MHC). A

3.4 Morfologia e desenvolvimento muscular pós-natal

3.4.1 Em humanos

O crescimento e diferenciação do músculo normal da criança são complexos, e padrões normais têm sido definidos de forma incompleta. O acompanhamento do desenvolvimento muscular é de grande relevância para perceber a maturação neuromuscular normal, obter métodos de avaliação diagnóstica e facilitar identificações de alterações musculares patológicas em bebês e crianças (VOGLER; BOVE, 1985).

Crianças de até 6 meses de idade apresentaram maior quantidade de fibras musculares tipo 2C (FT2C), fibras primitivas ou indiferenciadas predominantes no músculo fetal (VOGLER; BOVE, 1985), quando comparadas com crianças mais velhas. Essencialmente, todas as fibras tipo 2 de bebês são FT2C, e com o avançar da idade se diferenciarão em FT1, FT2A ou FT2B. A presença de FT2C além da infância não é necessariamente anormal, visto episódios de transição muscular também nessa fase. Bebês mostram ampla variação no número de FT1 e FT2A e, a partir de 1 ano de idade, eles apresentam mais da metade de FT1 nos músculos quadríceps, deltóide e reto abdominal. As FT1 tendem a apresentar tamanho similar, ou superior, às FT2, na criança normal. Para muitos tipos de fibras, o tamanho adulto é atingido entre 12 e 15 anos de idade. A variação do crescimento muscular na criança não difere entre os sexos em nenhuma idade (VOGLER; BOVE, 1985).

O músculo diafragma tem sido muito referenciado na literatura científica. Quando imaturo, por exemplo, é constituído exclusivamente por FT2C (ORLIAGUET; RIOU; LEGUEN, 2003). Essas fibras serão progressivamente substituídas e, ao nascimento, o músculo apresentará 40% de FT1, 30% de FT2B e 30% FT2C (ORLIAGUET; RIOU; LEGUEN, 2003). Além disso, ocorre aumento progressivo do diâmetro médio das fibras durante o desenvolvimento, e a superfície de secção aumenta progressivamente entre a 1ª e a 8ª semana de vida (FRATACCI et al., 1996). A expressão de isoformas adultas do MHC no músculo diafragma é

precoce e ocorre intensamente antes da 40ª semana de gestação (ORLIAGUET; RIOU; LEGUEN, 2003). Por outro lado, a isoforma fetal das MHCs persiste mais tardiamente, e permanece fortemente expressa até o nascimento quando o músculo apresenta 15% de MHCembrionário/neonatal, 32% de MHCI, 47% de MHCIIa e 6% MHCIIb (LLOYD et al., 1996). As fibras de tipo 2C coexpressam as isoformas fetal e adulta dos MHCs, já as fibras tipo 1 e 2B expressam exclusivamente as formas adultas. Assim, a persistência de 30% de FT2C ao nascimento testemunha a expressão tardia de isoformas fetais de MHC (ORLIAGUET; RIOU; LEGUEN, 2003).

3.4.2 Em animais

Modelos experimentais que utilizam animais são extensamente empregados para explorar possíveis correlações funcionais das transições pós-natais de MHC com as de crianças no início do desenvolvimento. A maturação de MHC em células dos músculos respiratórios de humanos pode ser comparada às mesmas células de ratos, entre o nascimento e o 21º dia de vida (WATCHKO; DAOD; SIECK, 1998).

Durante a gestação de ratos da raça Wistar, especificamente no 21º dia pré-natal, os tipos de fibras musculares ainda não podem ser identificados (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004). Em ratos recém-nascidos, as isoformas de MHC embrionária e neonatal são predominantemente expressas, como observado em músculos dos membros, diafragma e masseter (AGBULUT et al., 2003). Após o 1º dia de nascimento, é possível diferenciar as isoformas de MHC neonatal, MHC lento e MHC rápido das fibras somente através da técnica de imunoistoquímica (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004). As isoformas de MHC IIa e IIx são encontradas na primeira semana de vida nos músculos sóleo, plantar, diafragma e lingual (AGBULUT et al., 2003). Outro estudo confirmou a presença de MHCI e neonatal em músculo sóleo ao 6º dia de vida, porém, não detectaram a presença de MHCIIa (PICQUET et al., 1998). A isoforma IIb é a mais expressa em músculos rápidos na fase adulta, e foi detectada no 5º dia de vida dos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e gastrocnêmio (AGBULUT et

al., 2003). Através da técnica de histoquímica, até o 6º dia de vida todas as fibras do músculo sóleo foram identificadas com FT2C (PICQUET et al., 1998). No 8º dia, a atividade da enzima ATPase em pH 9,4 mostrou a diferenciação entre fibras lentas e rápidas e essas ainda expressavam MHC neonatal (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004). No músculo masseter, o MHC neonatal representou 15% do total de MHC nos três meses após o nascimento (AGBULUT et al., 2003). A diminuição da presença de FT2C no músculo é acompanhada por redução da expressão da isoforma de MHC neonatal. No músculo diafragma do rato, as isoformas MHC IId e IIb aparecem somente após o 14º dia de vida (ORLIAGUET; RIOU; LEGUEN, 2003).

No desenvolvimento do músculo sóleo, analisado entre o 8º e 75º dia de vida, é observada transição das FT2 para FT1, que resulta em aumento médio de 28,8% das FT1. Os músculos EDL e gastrocnêmio, caracterizados por contrações rápidas, apresentam diminuição do número das FT1 entre o 8º e 21º dia e, posteriormente, até o 75º dia de vida, a proporção de fibras permanece constante. O aumento das fibras glicolíticas em relação às glicolíticas/oxidativas é observado em músculos como EDL, sóleo, gastrocnêmio (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004) e plantar (ISHIHARA; TAGUCHI, 1991). Os subtipos de fibras 2A e 2B, identificadas em pH 4,3, foram observados no 21º dia de vida do rato (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004).

3.4.3 Função neural e desenvolvimento

A atividade neuromuscular realiza importante papel na estabilização do fenótipo específico das fibras musculares durante o desenvolvimento (AGBULUT et al., 2003). As propriedades metabólicas oxidativa e glicolítica das fibras são controladas pelas influências neuronais, conforme o padrão de ativação dos motoneurônios. Assim, a transição entre os diferentes tipos de fibras possui estreita relação com a função e controle motoneural (AGBULUT et al., 2003; ISHIHARA; TAGUCHI, 1991; PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004).

Mudanças funcionais durante o desenvolvimento pós-natal provocam alterações significativas na inervação muscular. A substituição da inervação polineural pela inervação focal, e o aumento do tamanho e complexidade da prega juncional são sinais de que as fibras e a junção neuromuscular têm atingido o fenótipo adulto maduro (JANSEN; FLADBY, 1990; SLATER, 1982). Em estudos experimentais, com ratos, foi observado que a junção neuromuscular desenvolve características adultas até a 2ª ou 3ª semana de vida (ORLIAGUET; RIOU; LEGUEN, 2003). Esse período coincide com o início da transição entre os tipos de fibras.

Unidades motoras rápidas são innervadas por motoneurônios maiores que as unidades motoras lentas. Quando ocorre estabilização da inervação mononeural, há rápido crescimento das fibras musculares, como observado em fibras diafragmáticas (PRAKASH et al., 2000). Entre 21º dia de vida e a idade adulta do rato, a superfície de secção das fibras aumenta mais de 120% com crescimento desproporcional das fibras 2 comparadas com as fibras 1 (164 vs 73%) (PRAKASH et al., 2000).

3.4.4 Idade de transição no desenvolvimento

O 21º dia pós-natal é a fase importante no desenvolvimento do rato, identificada como aquela em que aparecem os subtipos de fibras 2A, 2B e 2D (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004). É nessa fase que as fibras musculares deixam de apresentar inervação polineuronal, tornando-se mononeuronalmente innervadas. Os animais deixam o ninho e a demanda da postura e mobilidade dos membros é alterada. Para responder ao aumento da demanda funcional, atividades enzimáticas das fibras musculares desenvolvem sua capacidade máxima. Pode ser desencadeada a transformação de fibras oxidativas/glicolíticas em fibras somente glicolíticas, necessárias para desenvolver força rapidamente frente ao esforço (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004).

3.4.5 Atividade hormonal e idade

A atividade hormonal influencia a expressão das isoformas de MHC durante o desenvolvimento. O hormônio tireoidiano tem mostrado contribuir para a regulação da expressão de várias isoformas de miosina no músculo esquelético (IZUMO et al., 1986). O nível desse hormônio aumenta com o passar do tempo, atinge seu máximo entre a 2ª e 3ª semana após o nascimento e se estabiliza na 4ª semana de vida (D'ALBIS et al., 1990). O desenvolvimento das isoformas de MHC não é detectado muito além do pico máximo da expressão do hormônio tireoidiano em músculos rápidos (AGBULUT et al., 2003). Músculos funcionalmente distintos respondem diferentemente ao hormônio tireoidiano a partir da distribuição de receptores nucleares específicos, em que o mecanismo molecular da ação desse hormônio via nuclear específica ainda não está claro (YU et al., 2000; WHITE et al., 2001).

3.5 Imobilização no período pós-natal

O músculo esquelético de mamíferos possui alta capacidade para se adaptar a diferentes condições e posturas. Sua adaptação pode ser de natureza reversível ou irreversível, de acordo com a posição adotada por determinado período. A manutenção da massa e citoarquitetura do músculo esquelético requerem quantidade mínima de carga repetitiva e tensão. A redução da atividade física, como em situações de restrição ao leito e imobilização, gera diminuição da excursão funcional e da força do músculo envolvido (OKITA et al., 2004). Essas condições provocam alterações citoarquiteturais importantes, observadas no eixo longitudinal (encurtamentos e contraturas) e transversal (atrofia e hipertrofia/hiperplasia) do músculo (GOMES et al., 2007; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006; PICQUET et al., 1998).

Além disso, o tecido muscular inativo apresentará transtornos de circulação e edema, causados pela redução da densidade de capilares (CORNACHIONE, 2007; GOMES

et al., 2007). Proliferação do tecido conjuntivo perimisial também pode ser observada no músculo sóleo, após período de imobilização (GOMES et al., 2007). Alterações ligamentares e rigidez articular provocam limitação funcional do membro envolvido (LOITZ et al., 1989).

Ainda, frente às situações de encurtamentos musculares, o fenótipo da expressão de isoformas de miosina é afetado com a redução da carga no membro, como observado em músculos posturais como o sóleo (CORNACHIONE et al., 2007; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006; PICQUET et al., 1998). Nesse músculo, as fibras de contração lenta são mais acometidas que as fibras de contração rápida (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006; PETTE; STARON, 2000; PICQUET et al., 1998; SILVA et al., 2006).

Segundo Goldspink (1992), músculos jovens ou em desenvolvimento mostram adaptações mais intensas em resposta à diminuição da atividade muscular, quando comparadas aos adultos. A imobilização do músculo sóleo em diferentes estágios da maturação neural (períodos de inervação polineural e mononeural) desencadeia respostas teciduais variadas. O músculo sóleo imobilizado do 6º ao 12º dia de vida do rato (período de inervação polineural - imaturo) permaneceu com alta expressão das isoformas de MHC em desenvolvimento, como a isoforma neonatal (PICQUET et al., 1998). O nível de expressão da isoforma neonatal foi comprovado através do aumento do número de fibras indiferenciadas 2C e maior afinidade do sistema contrátil ao cálcio, que correspondem às características do estágio precoce do desenvolvimento (PICQUET et al., 1998). Assim, a imobilização na fase precoce do desenvolvimento pós-natal retardou o aparecimento das diferentes isoformas adultas de MHC.

Por outro lado, o músculo sóleo de ratos imobilizado entre o 17º e 23º dia de vida (com inervação mononeural – madura) foi capaz de induzir o aparecimento das isoformas de MHCIIb, que normalmente não são observadas em músculo de contração lenta como o sóleo (PICQUET et al., 1998). Concomitantemente, a imobilização provocou diminuição das FT1 e FT2C e o desaparecimento das isoformas de MHC neonatal (PICQUET et al., 1998). Outros estudos também apontam a transição de FT1 para FT2 (BOOTH AND KELSO, 1973; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006) no músculo sóleo de animais adultos. A expressão do gene MHCIIb foi rapidamente induzida pelo desuso no sóleo, e não foi observada em músculos

rápidos como o plantar e gastrocnêmio (LOUGHNHA et al., 1990). Dessa forma, a imobilização durante a inervação mononeural pode provocar mudanças nas características contráteis originais do músculo sóleo e, então, esse apresentará características contráteis mistas (PICQUET et al., 1998).

3.6 Alongamento e adaptação muscular pós-natal

O restabelecimento da amplitude de movimento normal e da funcionalidade do membro que sofreu restrição de movimento são importantes objetivos da atuação fisioterapêutica. O alongamento, recurso terapêutico muito usado na prática clínica, aborda indivíduos adultos e crianças, inclusive aquelas que se encontram em fase de desenvolvimento motor. Há aproximadamente 30 anos, os efeitos do alongamento em músculos encurtados vêm sendo estudados. Porém, alguns aspectos técnicos, como a adoção da periodicidade da aplicação desse programa de treinamento e aspectos citoarquiteturais, merecem melhor detalhamento científico (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1973; WILLIAMS; GOLDSPINK, 1983).

A frequência e duração da estimulação mecânica, realizada através da técnica de alongamento, são importantes fatores que influenciam as respostas de síntese ou degradação proteica e adaptação do tecido conjuntivo muscular. A aplicação da técnica de alongamento durante o período de imobilização, aplicada três vezes por semana por 40 minutos, determinou alterações degenerativas mais intensas do tecido muscular quando, comparado a uma vez por semana (GOMES et al., 2007). Porém, uma única sessão semanal não foi suficiente para prevenir a redução da massa muscular e do número de sarcômeros em série (GOMES et al., 2004). Sessões diárias de alongamento provocaram a reorganização das bandas de colágeno no tecido conjuntivo intramuscular em sóleos previamente imobilizados. Esse benefício não foi observado com a livre movimentação e o alongamento aplicado 3 vezes na semana (COUTINHO et al., 2006). Porém, não existe consenso na literatura para as alterações tróficas sofridas pelas fibras expostas ao desuso.

O alongamento mantido por 30 minutos, aplicado seis vezes por semana por três semanas consecutivas, foi capaz de induzir o aumento do diâmetro das FT1 em músculos sóleo previamente imobilizados (OKITA et al., 2001). Recente estudo mostrou que sessões de 40 minutos de alongamento, aplicados ao músculo sóleo sadio, 3 vezes por semana, aumentaram o número de sarcômeros em série e a área de secção transversa (COUTINHO et al., 2004). Sessões diárias de alongamento, realizadas após imobilização do músculo sóleo, provocaram hipertrofia das fibras musculares (COUTINHO et al., 2006).

Outros estudos, no entanto, não observaram sinais de hipertrofia após o uso de técnicas de alongamento. A redução da secção transversa das fibras foi evidente em músculos sóleo alongados após período de imobilização. E, ainda, alterações ultraestruturais significativas relacionadas ao processo de tumefação (GOMES et al., 2007) e alta reatividade celular foram observados, representando processos de degeneração e/ou regeneração desencadeados pelo alongamento (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006).

Mudança no fenótipo dos tipos de fibras musculares, influenciadas pela aplicação do alongamento, não apresenta muitos relatos e consenso entre os estudos. O rápido acúmulo da transcrição do gene MHCIIb, desencadeado pela inatividade do músculo postural sóleo, foi prevenido pelo alongamento passivo. E, ainda, o alongamento aplicado em músculos em desenvolvimento pós-natal pode impedir a expressão do MHCIIb nessa fase (LOUGHNHA et al., 1990). Porém, outro estudo mostra que a análise dos diferentes tipos de fibras de músculos sóleo, alongados após a imobilização, não apresentou alteração quando foi comparada com o grupo controle (GOMES et al., 2007).

3.7 Exercícios e respostas do músculo em desenvolvimento

Durante o desenvolvimento pós-natal, mudanças no comportamento do animal aumentam a exigência de grupos musculares conforme sua função. A demanda funcional e a atividade física são fatores fundamentais para o crescimento e diferenciação muscular. De acordo com a forma de ativação das fibras musculares, adaptações no tamanho da

fibra e na expressão de isoformas de MHC são desencadeadas no músculo envolvido (FITZSIMONS et al., 1990; SULLIVAN et al., 1995).

Ratas jovens, submetidas a treino de corrida por 8 semanas, apresentaram transição de isoformas rápidas (tipo IIb) para fibras lentas (tipos IId e IIa) no músculo plantar (SULLIVAN et al., 1995). Já no músculo sóleo de ratos adultos, houve aumento de fibras musculares com características oxidativas-glicolíticas (FOG), após ambos os treinos estático e dinâmico (MELICHNA et al., 1987). E, ainda, técnicas de eletroestimulação (ES), que simulam a ativação muscular durante o exercício, foram capazes de desencadear respostas como a hipertrofia das FT2 em músculos sóleo adultos previamente imobilizados (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006).

A atividade física apresenta bons resultados na recuperação de músculos sedentários, que sofreram imobilização. Exercícios de corrida aplicados em ratos, com frequência de 3 vezes por semana, restabeleceram as propriedades musculares e a amplitude de movimento perdidas durante o período de imobilização (SAKAKIMA et al., 2004).

O exercício excêntrico vem sendo muito avaliado, e alguns autores argumentam que o estímulo excêntrico aumenta a síntese de proteína. Dessa forma, o treinamento com contrações excêntricas provocaria maior estímulo para a hipertrofia muscular comparado com outros tipos de contração (MAYHEW et al., 1995). Porém, poucos estudos abordam esse tipo de exercício e, principalmente, sua influência em músculos durante o desenvolvimento pós-natal.

Ao considerar esse breve relato da literatura, pode ser destacado que poucos são os estudos científicos que abordam o tecido muscular em desenvolvimento frente à situação de imobilização e, principalmente, confrontando diferentes protocolos de treinamento terapêutico.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratas da raça Wistar foram fornecidas pelo Biotério Central da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto – USP com 21 dias de idade, que corresponde à fase de desmame e de início dos protocolos propostos neste trabalho. As ratas foram mantidas em grupos de quatro animais, dentro de gaiolas plásticas com livre acesso à alimentação peletizada e água. Todos os procedimentos para higienização e boa adaptação dos animais nas gaiolas foram realizados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA (Protocolo nº 042/2007) (ANEXO G).

4.2 Grupos experimentais de estudo

Os animais foram divididos em grupos experimentais descritos na Tabela 1. A combinação dos grupos em Experimentos, de acordo com a proposta apresentada no item Objetivos, está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 1 - Descrição dos grupos de animais e procedimentos experimentais realizados

Grupos	Número de animais	Procedimentos experimentais
Grupo imobilizado (GI)	6	Animais com 21 dias de idade permaneceram imobilizados por 10 dias e foram sacrificados.
Imobilizado e treinado excêntrico por 10 dias (GITE₍₁₀₎)	6	Animais com 21 dias de idade permaneceram imobilizados por 10 dias e depois passaram por período de treinamento excêntrico de 10 dias em esteira em declive e foram sacrificados.
Imobilizado e treinado excêntrico por 21 dias (GITE₍₂₁₎)	6	Animais com 21 dias de idade permaneceram imobilizados por 10 dias e depois passaram por período de treinamento excêntrico de 21 dias em esteira em declive e foram sacrificados.
Imobilizado e alongado por 10 dias (GIAL₍₁₀₎)	6	Animais com 21 dias de idade permaneceram imobilizados por 10 dias e depois passaram por período de alongamento de 10 dias e foram sacrificados posteriormente.
Imobilizado e alongado por 21 dias (GIAL₍₂₁₎)	6	Animais com 21 dias de idade permaneceram imobilizados por 10 dias e depois passaram por período de alongamento de 21 dias e foram sacrificados posteriormente.
Anestesiado (GA)	3	Animais com 21 dias de idade permaneceram livres na gaiola por 10 dias e depois passaram por período de anestesia de 21 dias, obedecendo aos mesmos dias de anestesia dos animais do Grupo IAL₍₂₁₎ e foram sacrificados posteriormente.
Controle (GC_(zero))	3	Animais sacrificados com 21 dias de idade.
Controle do imobilizado (GC_(imob))	3	Animais com 21 dias de idade permaneceram livres na gaiola por 10 dias e foram sacrificados.
Controle de 10 dias (GC₍₁₀₎)	3	Animais com 21 dias de idade permaneceram livres por 10 + 10 dias e foram sacrificados posteriormente.
Controle de 21 dias (GC₍₂₁₎)	3	Animais com 21 dias de idade permaneceram livres por 10 + 21 dias e foram sacrificados posteriormente.
TOTAL	45	

Tabela 2 - Combinação dos grupos de acordo com o objetivo de cada experimento

Experimentos	Grupos
Experimento 1	GC_(zero) GC_(imob) GC₍₁₀₎ GC₍₂₁₎
Experimento 2	GC₍₁₀₎ GC₍₂₁₎ GI GIAL₍₁₀₎ GIAL₍₂₁₎ GA
Experimento 3	GC₍₁₀₎ GC₍₂₁₎ GI GITE₍₁₀₎ GITE₍₂₁₎
Análise comparativa dos protocolos	GIAL₍₁₀₎ GIAL₍₂₁₎ GITE₍₁₀₎ GITE₍₂₁₎

4.3 Procedimentos experimentais

Técnica de imobilização

O uso da técnica de imobilização em ratas recém-desmamadas objetivou provocar o encurtamento do músculo sóleo e plantar através da imobilização da articulação fíbulo-társica

em flexão plantar máxima (WILLIAMS, 1988). O modelo utilizado para imobilização do membro posterior seguiu a proposta de Coutinho et al. (2002), na qual os itens como material utilizado, moldes da estrutura da peça e forma de fixação ao animal foram mantidos.

Adaptações indispensáveis, entretanto, foram incrementadas para garantir a efetividade da imobilização ao longo do tempo programado em ratas recém-desmamadas (BENEDINI-ELIAS et al., 2009). Essas adaptações foram: camiseta confeccionada em consonância com o tamanho do animal e correspondente crescimento e desenvolvimento, inserção de suspensório de tiras finas superior aos ombros para manter as patas dianteiras no dispositivo, higiene periódica da região genital como suporte à imaturidade do controle geniturinário, reposição sistematizada da parte inferior do dispositivo de acordo com o crescimento do animal.

Para introduzir o dispositivo, as ratas foram submetidas a anestesia via intraperitoneal com hidrato de cloral (4%). O modelo adaptado foi composto por duas partes: parte superior, similar a uma camiseta de *cotton*, que permitiu ao animal movimentar livremente a cabeça e os membros superiores (Figura 2A), e parte inferior dividida em anterior e posterior, composta por uma malha de aço que teve suas bordas envolvidas com fita adesiva e esparadrapo impermeável para prevenir lesões no corpo do animal (Figura 2B). Além disso, no compartimento anterior foi colocado revestimento de algodão para proteger a região anterior do membro (Figura 2B, asterisco). Em seguida, a parte inferior foi fixada à parte superior através de grampos (Figura 2C). Após esse procedimento, a camiseta foi vestida no animal e a articulação tíbio-társica foi mantida em flexão plantar máxima com *micropore* (Figura 2D, cabeça de seta) e fixada à malha de aço com fita adesiva (Figura 2E, seta). O membro posterior direito foi imobilizado através da união das partes anterior e posterior, fixadas com fita crepe na região do tornozelo e abdome do animal (Figura 2F - asteriscos).

A não destruição do dispositivo pelos roedores e sua retenção no animal foi garantida pela utilização de uma fita *silver tape* de 3cm de largura ao redor do abdômen do animal, na junção entre as partes superior e inferior (Figure 2G, seta larga). Foram ainda fixadas duas tiras de 0,5cm de largura que, a partir do abdômen, passavam pela parte superior de ambos os ombros semelhante a um suspensório, como pode ser observado na

Figura 2G (seta fina). Essa representa uma etapa adicional (BENEDINI-ELIAS et al., 2009) ao modelo descrito por Coutinho et al. (2002), tendo em vista o baixo peso corporal dos animais aqui utilizados.

Figura 2 - Procedimentos para imobilização do membro posterior. *A* - A parte superior do modelo é similar a uma camiseta confeccionada com tecido *viscolycra* (medidas em cm). *B* - Parte inferior, dividida em anterior e posterior, é feita com malha de aço e revestida com esparadrapos (medidas em cm). Para proteger o quadril e a região anterior da pata imobilizada, o algodão foi colocado em todo o compartimento anterior do dispositivo (asterisco). *C* - União das partes superior e inferior através de grampos. *D* - Após vestir a camiseta no animal, articulação tibio-társica foi posicionada em flexão plantar máxima com *micropore* (cabeça de seta). *E* - o membro posterior direito foi fixado à parte anterior da malha de aço com uma tira de *micropore* na região do tornozelo (seta). *F* - União das partes anterior e posterior da malha de aço fixadas através da fita adesiva ao redor do quadril e tornozelo (asteriscos). *G* - Para a manutenção da qualidade e posição do dispositivo, foi fixada uma fita ao redor do abdomen do animal, entre a camiseta e a tela de aço (seta larga). Além disso, duas tiras de 0,5cm foram colocadas passando pela parte superior de ambos os ombros como um suspensório (seta fina)

Os animais permaneceram imobilizados por 10 dias consecutivos e separados em número de 4, em gaiolas plásticas, com livre acesso à água e ração peletizada. A imobilização não impediu a alimentação e locomoção dos animais dentro da gaiola. No assoalho da gaiola foi colocada serragem para higienização trocada diariamente.

As adaptações efetuadas nos animais em fase de desenvolvimento pós-natal originaram um artigo científico publicado na revista *Anatomical Science International* (BENEDINI-ELIAS et al., 2009).

Técnica de treinamento em esteira em declive - protocolo excêntrico

Após a imobilização por 10 dias, os animais do GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎ passaram por período de 10 e 21 dias, respectivamente, de treinamento em esteira em declive (Figura 3), seguindo o protocolo desenvolvido por Norman et al. (2000), como mostra a Tabela 3. O período de exercício se iniciou com 10 minutos diários de corrida e, a cada dia, foram acrescentados 5 minutos até completar 40 minutos de treinamento. Esse aumento progressivo no período de treinamento foi fundamental para que o animal se adaptasse ao exercício e também para que não ocorresse sobrecarga nas estruturas óssea e muscular. A velocidade média da esteira foi de 17m/min com inclinação descendente de 16° (ARMSTRONG, OGILVIE, SCHWANE, 1983; HAYWARD et al., 1999; LYNN; MORGAN, 1994; TAKEKURA et al., 2001). Os animais realizaram esse protocolo de treinamento por 10 ou 21 dias, sendo 3 dias consecutivos de treino seguido por 1 dia de descanso. Segundo Norman et al. (2000), o objetivo desse intervalo foi reduzir o estresse dos animais e prevenir o *overtraining*, ou seja, o excesso de treinamento.

Figura 3 – Esteira motorizada para ratos da marca Insight® - modelo EP-131 com declinação de 16°

Tabela 3 - Intervalos, tempo progressivo do treino e distância percorrida pelos animais submetidos ao treinamento excêntrico, pertencentes aos grupos GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎

GITE ₍₁₀₎			GITE ₍₂₁₎		
Dia	Tempo (min)	Distância (m)	Dia	Tempo (min)	Distância (m)
1	10	119	1	10	145
2	15	196	2	15	215
3	20	215	3	20	290
4	Pausa	---	4	Pausa	---
5	25	340	5	25	350
6	30	410	6	30	510
7	35	490	7	35	544
8	Pausa	---	8	Pausa	---
9	40	626	9	40	640
10	40	615	10	40	650
			11	40	630
			12	Pausa	---
			13	40	690
			14	40	624
			15	40	650
			16	Pausa	---
			17	40	640
			18	40	630
			19	40	600
			20	Pausa	---
			21	40	610

Técnica de alongamento mantido

Posterior ao procedimento de imobilização, os animais dos grupos GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ passaram por período de 10 e 21 dias, respectivamente, de alongamento mantido, respeitando os dias, o tempo e o intervalo determinados no treinamento em esteira.

A técnica de alongamento mantido, para os músculos sóleo e plantar, foi realizada no membro posterior direito das ratas (Figura 4). A articulação do tornozelo foi fixada em flexão dorsal máxima por uma fita adesiva (GOMES et al., 2007). Para a realização do alongamento, os animais foram previamente anestesiados com hidrato de cloral (4%) via intraperitonal, como mostra a Tabela 4. Os animais do grupo GA foram apenas anestesiados paralelamente com os animais do GIAL₍₂₁₎ para verificar possíveis efeitos do anestésico sobre a musculatura analisada.

Figura 4 - Alongamento mantido pós-imobilização dos músculos sóleo e plantar através da flexão dorsal máxima da articulação do tornozelo, fixada por uma fita adesiva (asterisco) no membro posterior direito de ratas recém-desmamadas

Tabela 4 - Intervalos de dia, tempo progressivo do alongamento e dose da anestesia aplicada nos animais dos grupos GIAL₍₁₀₎, GIAL₍₂₁₎ e GA

GIAL ₍₁₀₎			GIAL ₍₂₁₎ e GA		
Dia	Tempo (min)	Anestésico (ml)	Dia	Tempo (min)	Anestésico (ml)
1	10	0,3	1	10	0,5
2	15	0,4	2	15	0,6
3	20	0,5	3	20	0,62 / 0,8
4	Pausa	---	4	Pausa	---
5	25	0,55	5	25	0,65
6	30	0,65	6	30	0,62 / 0,8
7	35	0,6	7	35	0,65
8	Pausa	---	8	Pausa	---
9	40	0,8	9	40	0,7
10	40	0,9	10	40	0,75
			11	40	0,78
			12	Pausa	---
			13	40	0,78 / 0,91
			14	40	0,8
			15	40	0,82
			16	Pausa	---
			17	40	0,85
			18	40	0,88
			19	40	0,9
			20	Pausa	---
			21	40	0,92

4.4 Preparação dos fragmentos musculares

Obtenção dos músculos

O músculo sóleo, com predomínio de unidades motoras lentas, e o plantar, com a maioria das unidades motoras rápidas, foram retirados após a realização dos protocolos descritos.

Para a dissecação dos músculos, os animais foram pesados e sacrificados com excesso de anestésico. Foi realizada uma incisão distal na tíbia do membro posterior direito, próxima à articulação do tornozelo, de forma a expor os músculos sóleo e plantar para a dissecação e retirada dos fragmentos. Esses foram envolvidos em talco e submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido. A estocagem foi feita em um *freezer* a -80°C até o processamento do material.

Processamentos histológico e histoenzimológico

Os fragmentos musculares de todos os animais dos grupos experimentais foram seccionados em cortes transversais com criótomo Leica CM 1850 UV à temperatura de -25°C . Os cortes tiveram espessura de $5\mu\text{m}$, colhidos em lamínulas de $24\times 32\text{mm}$.

O processamento contou com a metodologia de reações de coloração e reações histoenzimológicas: Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Gomori – modificado, Naftol AS-BI Fosfatase (NASBI-PAS, E.C.2.0.8.4.9.5.7) e Adenosina Trifosfatase Miofibrilar (mATPases, E.C.2.1.3.5.7.9.1), incubadas em meios ácidos e alcalinos com os seguintes valores de pH:

- sóleo: valores de pH – 9,8; 4,6; 4,3
- plantar: valores de pH – 10,4; 4,7; 4,6; 4,4.

As reações descritas foram desenvolvidas no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da FMRP-USP, seguindo a rotina de processamento desse laboratório.

Processamento imunoistoquímico para capilares

Os fragmentos foram seccionados (para obtenção de cortes transversais) em criótomo Leica CM 1850 UV à temperatura de -25°C . Foram obtidos cortes com espessura de $5\mu\text{m}$, colhidos em lâminas $26\times 76\text{mm}$. A técnica imunoistoquímica, realizada no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da FMRP-USP, contou com aplicação dos anticorpos *anti-rat CD31*. As lâminas foram fixadas em acetona gelada por 10 minutos, lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas em solução a 1% H_2O_2 por 15 minutos para bloquear a peroxidase endógena. As lâminas foram novamente lavadas e, em seguida, foi realizado o bloqueio da proteína com BSA 2% e *Normal Goat Serum* (S-1000 - Vector) por 20 minutos. Os excessos de líquido foram removidos e as amostras foram incubadas com anticorpo primário *mouse anti-rat CD31* a 4°C *overnight* com diluição de 1:6000. Realizado um controle negativo (*blank*), onde não foi gotejado o anticorpo primário no corte. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBST por 9 minutos e incubadas com o *link* amarelo (anticorpo secundário) do *kit* LSAB2-HRP durante 30 minutos. Seguiu lavagem e incubação com o *link* vermelho (Streptavidina Peroxidase) do mesmo *kit* no escuro por 10 minutos. Após esse procedimento foi realizada nova lavagem com TBST e TRIS-HCl para incubação do cromogênio DAB, durante 5 minutos. Seguiu-se lavagem em água destilada, coloração em hematoxilina por 10 segundos, desidratação e diafanização e, por fim, a montagem em Permount (Fisher).

Processamento bioquímico – eletroforese para MHC

A amostra dos fragmentos para análise bioquímica foi feita a partir da coleta de 20 a 30 cortes de cada músculo, colhidos em tubos *eppendorf*. Aos cortes foram acrescentados $450\mu\text{L}$ do seguinte meio: 10% (w/v) glicerol, 5% (v/v) 2 mercaptoetanol e 2,3% (w/v) dodecilsulfato de sódio (SDS) em 62,5mM de tampão Tris/HCL (pH 6,8). Os cortes foram agitados durante um minuto e aquecidos por 10 minutos em banho-maria a 60°C . Em seguida, pequenas porções do extrato ($5-7\mu\text{L}$) foram submetidas à eletroforese em gel (gradiente de 7-10%) de poliacrilamida (SDS) com 24-30 horas de corrida a 120V. Ao término do experimento, os géis foram corados com Coomassie Blue e depois submetidos a descoloração progressiva, mantendo-se somente a marcação das proteínas (BÄR; PETTE, 1988).

4.5 Análises morfológica

A análise qualitativa das lâminas foi feita em microscópio de luz Leica DM 2500. Os aspectos morfológicos genéricos do tecido muscular foram avaliados através da coloração H.E. e Tricrômico e também pelas reações enzimáticas SDH e NAS-BI.PA. A quantificação dos achados do tecido muscular foi realizada através da contagem dos mesmos em todo o fragmento muscular de cada animal.

Os subtipos específicos de fibras dos diferentes músculos foram classificados pela reação mATPase e análise bioquímica das cadeias de miosina, identificadas de acordo com sua aparente massa molecular, comparadas com marcadores de proteínas.

4.6 Análise morfométrica

Análise morfométrica foi realizada com auxílio do *software* QualiView – Atonus (Figura 5), a partir de imagens capturadas pela câmera de vídeo digital Leica DFC 300FX, conectada ao microscópio de luz Leica DM 2500 e a um microcomputador.

Análise de proporção

Para obter a proporção dos diferentes tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar, foram colhidas imagens de 3 campos aleatórios (objetiva de 40X) do fragmento de cada animal processado para ATPase miofibrilar. A análise de proporção do músculo sóleo e plantar foi realizada principalmente a partir de lâminas incubadas em meio ácido, com valor de pH 4,6.

SÓLEO

Foram quantificadas as fibras puras - fibras tipo 1 (FT1), fibras tipo 2A (FT2A) e fibras tipo 2D (FT2D) - e as fibras intermediárias/híbridas - fibras tipo 2C (FT2C), fibras tipo 2AC (FT2AC) e fibras tipo 2AD (FT2AD). Para confirmar a classificação das fibras FT2C e FT2AC, foi utilizado o valor de pH 4,3 que demonstra de forma clara a marcação desse tipo de fibra no músculo sóleo.

PLANTAR

Foram quantificadas as fibras puras - fibras tipo 1 (FT1), fibras tipo 2A (FT2A), fibras tipo 2D (FT2D), e fibras tipos 2B (FT2B) - e a fibra intermediária/híbrida - fibras tipo 2C (FT2C) na porção

profunda do fragmento muscular. Para confirmar a classificação das FT2C foi utilizado o valor de pH 4,4, enquanto, para confirmar as FT2B, foi utilizado o valor de pH 10,4. Esses valores de pH demonstram de forma clara a marcação desses tipos de fibras no músculo plantar.

Diâmetro menor

A escolha pela medida do diâmetro menor foi feita para evitar possíveis distorções consequentes ao seccionamento transverso imperfeito da amostra. A mensuração das fibras foi feita com o mesmo material e *software* (Figura 5) utilizado para a análise da proporção (ATPase miofibrilar), avaliando-se o diâmetro menor dos diferentes tipos de fibras, como descrito anteriormente, num total de 200 fibras, colhidas em 3 campos aleatórios (mínimo) do fragmento de cada animal.

Figura 5 - Ilustração do *software* Qualiview® - Atonus durante a realização da análise morfolométrica para proporção e diâmetro menor dos diferentes tipos de fibras. Observa-se algumas das variáveis medidas pelo programa, como: área, diâmetro menor (D. Menor) e diâmetro maior (D. Maior) demonstradas na tabela à direita da imagem. As fibras são indicadas com diferentes cores para facilitar sua visualização, após a classificação de cada uma delas. Os comandos para contagem de fibras (proporção) e diâmetros são dados nos quadrados localizados no canto superior direito da figura

Relação capilar-fibra (C/P)

Através da imunomarcagem feita pelo anticorpo CD31, foram contados capilares transversais e número de fibras a partir de imagens colhidas em 5 campos aleatórios (objetiva de 20X) das lâminas dos músculos sóleo e plantar dos grupos aqui estudados. A relação capilar/fibra é obtida através da divisão entre o valor total de capilares e a quantidade de fibras encontradas naquele campo.

Análise semiquantitativa das MHC

A análise semiquantitativa das bandas da cadeia pesada de miosina (MHC) foi feita por três examinadores independentes que avaliaram a quantidade relativa dos conteúdos das isoformas MHC. A avaliação das isoformas foi feita intragrupo para evitar distorções na comparação e quantificação das bandas, já que houve diferença na quantidade do conteúdo proteico total entre os grupos. Na análise foi utilizada a classificação descrita a seguir, levando-se em consideração a espessura e intensidade das bandas:

- 0 – banda não identificada macroscopicamente;
- 1 – banda muito estreita;
- 2 – banda estreita;
- 3 – banda moderada;
- 4 – banda espessa;
- 5 – banda muito espessa.

4.7 Análise estatística

A análise estatística para dados de peso corporal foi realizada através do teste ANOVA, seguido pelo teste Tukey-Kramer, utilizando-se o programa BioEstat 4.0 (AYRES et al., 2005). A estatística referente ao diâmetro menor, proporção de fibras e relação capilar-fibra dos músculos sóleo e plantar de cada animal foi realizada entre os grupos, utilizando-se o

Modelo Linear de Efeitos Mistos, com nível de significância de 5% ($\alpha=5\%$) e um intervalo de confiança de 95% (IC=95%), usando PROC MIXED do programa SAS versão 9.2.

A seguir, os itens resultados e discussão serão apresentados considerando os objetivos propostos nesta dissertação a partir da divisão dos grupos em experimentos (Tabela 2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 – Desenvolvimento muscular normal

5.1.1 Resultados

5.1.1.1 Peso corporal dos animais

O peso corporal dos animais foi obtido inicialmente com a idade de 21 dias e, posteriormente, quando alcançaram a idade correspondente ao grupo a que pertenciam. Os valores apresentados pelos animais dos grupos controle (Tabela 5) foram utilizados como referência para acompanhar o desenvolvimento dos animais dos experimentos seguintes, que sofreram as intervenções propostas neste trabalho.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso inicial) e no dia do sacrifício (peso final), referentes ao Experimento 1. Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$)

GRUPOS	PESO INICIAL (g) com 21 dias	PESO FINAL (g)
GC_(zero) 21d	59,3 (± 3)	59,3 (± 3)
GC_(Imob) 31d	51,6 ($\pm 2,4$)	118,0 ($\pm 5,3$)*
GC₍₁₀₎ 41d	57,3 ($\pm 3,5$)	218,6 ($\pm 19,4$) ^o
GC₍₂₁₎ 52d	54,1 ($\pm 3,4$)	239,6 ($\pm 12,3$)

Tukey-Kramer - * $p < 0,01$ comparado com GC_(zero)-21d; ^o $p < 0,01$ comparado com GC_(Imob)-31d
Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

A comparação entre os valores médios de peso inicial não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Através da análise da média do peso corporal final,

pode-se observar que a taxa de crescimento dos animais foi mais intensa entre as idades de 21 a 41 dias e, o peso médio dos animais de 41 ($GC_{(10)}$) e 52 dias ($GC_{(21)}$) de idade não apresentou diferença significativa.

5.1.1.2 Morfologia

A partir dos procedimentos histoquímicos, realizados para os fragmentos dos músculos sóleo e plantar, foi realizada a análise morfológica para avaliar possíveis alterações histopatológicas destacadas a seguir (Tabela 6 e 7). Foi realizada a análise detalhada do tipo varredura dos cortes transversais (corados em HE) para cada animal.

O músculo sóleo dos grupos controle, desde 21 até 52 dias de idade, apresentaram fibras com contornos arredondados e núcleos periféricos em sua maioria. Destaca-se que os animais do $GC_{(zero)}$ -21d e $GC_{(Imob)}$ -31d demonstraram maior reatividade do tecido muscular, núcleos volumosos e maiores em relação às fibras, que se tornaram mais arredondadas (Figura 6). O $GC_{(zero)}$ foi o grupo com maior número de achados, porém, destaca-se quantidade inferior a 5% das fibras que apresentaram essas características.

Tabela 6 - Quantidade média e desviopadrão ($\pm DP$) dos achados do músculo sóleo, em número de fibras, referentes ao Experimento 1

Alterações	Grupos	$GC_{(zero)}$ 21d	$GC_{(Imob)}$ 31d	$GC_{(10)}$ 41d	$GC_{(21)}$ 52d
Centralização nuclear		6 ($\pm 6,4$)	0,5 ($\pm 0,6$)	0	4,3 (± 3)
Fibras lobuladas		0	0	0	1,3 ($\pm 2,3$)
Degeneração/Necrose		2,5 ($\pm 2,4$)	0	0	0,3 ($\pm 0,6$)
Regeneração		0	0	0	0,3 ($\pm 0,6$)
Splitting		0,2 ($\pm 0,5$)	0	0	0,3 ($\pm 0,6$)
Lesão tipo <i>Central Core</i>		0	0	0	0
Halo basofílico		0	0	0	0

Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

O músculo plantar dos animais pertencentes ao GC_(zero)-21d e GC_(Imob)-31d apresentou fibras de forma arredondada com pouca variação do tamanho, núcleos volumosos e periféricos em sua maioria (Figura 6). Por outro lado, os animais do GC₍₁₀₎-41d e GC₍₂₁₎-52d apresentaram fibras de forma mais poliédrica e com maior variação de tamanho, núcleos periféricos em sua maioria e poucos achados específicos (Figura 6). Ressalta-se que a diferença no conteúdo mitocondrial era observada claramente entre as fibras de tamanhos variados, indicando alguns diferentes subtipos de fibras musculares.

Foi encontrada maior quantidade de alterações histopatológicas no GC_(zero), como é mostrado na Tabela 7. E, ainda, esse grupo apresentava maior reatividade do tecido muscular, núcleos volumosos e maiores em relação às fibras.

Tabela 7 - Quantidade média e desviopadrão ($\pm$ DP) dos achados do músculo plantar, em número de fibras, referentes ao Experimento 1

Alterações	Grupos			
	GC _(zero) 21d	GC _(Imob) 31d	GC ₍₁₀₎ 41d	GC ₍₂₁₎ 52d
Centralização nuclear	9,7 ($\pm$ 6,8)	1,7 ($\pm$ 2)	1 ($\pm$ 1)	1,5 ($\pm$ 2,4)
Fibras lobuladas	0,2 ($\pm$ 0,5)	0	0	0
Degeneração/Necrose	10 ($\pm$ 3,6)	1,2 ($\pm$ 0,9)	7 ($\pm$ 3)	2 ($\pm$ 1,4)
Regeneração	0,2 ($\pm$ 0,5)	0	0	1 ($\pm$ 1,1)
<i>Splitting</i>	2,7 ($\pm$ 2,2)	0,5 ($\pm$ 1)	0	0
Lesão tipo <i>Central Core</i>	0	0	0	0
Halo basofílico	1,7 ($\pm$ 1,7)	4 ($\pm$ 1,8)	9,7 ($\pm$ 3,8)	2 ($\pm$ 2)

Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

Figura 6 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo e plantar do Experimento 1. A-D Músculo sóleo; E-H: músculo plantar. A, E – $GC_{(0)}$; B, F – $GC_{(10)}$; C, G – $GC_{(10)}$; D, H – $GC_{(21)}$. Observa-se a forma arredondada das fibras (*) nos animais de menor idade (21 e 31 dias). Variação no volume nuclear pode ser evidente entre as diferentes idades dos grupos e entre os músculos sóleo e plantar (seta). Barra: 60 μ m

5.1.1.3 Diâmetro menor das fibras

No Experimento 1, o diâmetro menor demonstrou a variação no tamanho dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo (Tabela 8) e plantar (Tabela 9) ao longo do crescimento de ratas recém-desmamadas.

No músculo sóleo, o diâmetro menor de todos os tipos de fibras foi aumentado progressivamente com o avançar da idade dos animais. As FT1, FT2A, FT2AD e FT2D apresentaram aumento entre as idades de 21-31 dias e também entre 31-41 dias, como demonstrado na Tabela 8. Por outro lado, as FT2C e FT2AC aumentaram o diâmetro entre as idades de 21-31 dias e de 41-52 dias.

Quando feita a comparação entre os tipos de fibra do mesmo grupo, o GC_(zero)-21d e GC_(Imob)-31d apresentaram FT1 com diâmetro maior que todas as demais fibras ($p < 0,02$), que obtiveram valores muito similares. No GC₍₁₀₎-41d, as FT1 também apresentaram maior diâmetro ($p < 0,0004$), seguidas em ordem decrescente pelas FT2A, FT2AD, FT2D, FT2C e, por último, FT2AC. Entretanto, no GC₍₂₁₎-52d, as FT1, FT2D e FT2AC apresentaram diâmetros similares e maiores que as FT2A, FT2AD, FT2C ($p < 0,03$).

Tabela 8 - Valores médios do diâmetro menor (μm) e intervalos de confiança dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo do Experimento 1

Grupos Fibras	GC_(zero) 21d	GC_(Imob) 31d	GC₍₁₀₎ 41d	GC₍₂₁₎ 52d
FT1	23,36 (21,1 – 25,6)	29,2 [•] (26,9 – 31,4)	36,9 [*] (34,6 – 39,2)	37,9 (35,6 – 40,2)
FT2C	17,6 (15 – 20,2)	23,7 [•] (20,8 – 26,5)	25,9 (23 – 28,8)	32,3 [#] (29,3 – 35,2)
FT2AC	18,7 (16,1 – 21,2)	23,8 [•] (20,8 – 26,8)	24,9 (20,9 – 28,8)	35,8 [#] (32,3 – 39,3)
FT2A	19,2 (16,9 – 21,4)	26 [•] (23,7 – 28,3)	34 [*] (31,7 – 36,3)	35,4 (33,1 – 37,8)
FT2AD	19 (16,6 – 21,4)	25,9 [•] (23,4 – 28,4)	33,3 [*] (30,4 – 36,2)	35,8 (32,9 – 38,6)
FT2D	19,7 (15,9 – 23,5)	24,8 [•] (21,9 – 27,6)	31,2 [*] (27,8 – 34,5)	36,1 (30,2 – 41,9)

[•] $p < 0,03$ quando comparado com GC_(zero)-21d; ^{*} $p < 0,004$ quando comparado com GC_(Imob)-31d; [#] $p < 0,002$ quando comparado com GC₍₁₀₎-41d
Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

A Tabela 9 apresenta os valores médios do diâmetro menor para o músculo plantar, onde todos os tipos de fibra também apresentaram aumento do diâmetro conforme o avançar da idade dos animais. As FT1 apresentaram aumento entre as idades de 21 e 31 dias e também entre 41 e 52 dias. As FT2C apresentaram aumento somente próximo à idade de 52 dias, enquanto que nas FT2A, esse ocorreu a partir de 31 dias de idade. As FT2D e FT2B apresentaram aumento entre todas as idades dos grupos.

Foi realizada a comparação entre o diâmetro menor das fibras do GC_(zero)-21d, onde as FT1 e FT2B apresentaram diâmetro similar e maior que todas as demais fibras ($p < 0,003$). No GC_(Imob)-31d, as FT1 apresentaram maior diâmetro que todas as fibras ($p < 0,0001$), seguidas por ordem decrescente pelas FT2B, FT2D, FT2A e FT2C. E, por último, ambos os grupos GC₍₁₀₎-41d e GC₍₂₁₎-52d indicaram as FT2B com maior diâmetro ($p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente), seguidas por ordem decrescente pelas FT1, FT2D, FT2A e FT2C.

Tabela 9 - Valores médios do diâmetro menor (μm) e intervalos de confiança dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar do Experimento 1

Grupos Fibras	GC_(zero) 21d	GC_(Imob) 31d	GC₍₁₀₎ 41d	GC₍₂₁₎ 52d
FT1	20,5 (18 - 22,9)	27 [•] (24,6 - 29,5)	28,1 (25,7 - 30,5)	32,4 [#] (30 - 34,8)
FT2C	15,7 (12,3 - 19,1)	19,3 (16,6 - 22)	17,7 (12,7 - 22,8)	25,8 [#] (22,6 - 29,1)
FT2A	16,5 (14,2 - 18,8)	19,5 (17,2 - 21,8)	24 [*] (21,7 - 26,3)	28,8 [#] (26,5 - 31,1)
FT2D	16,7 (14,4 - 19)	20,7 [•] (18,4 - 22,9)	28,4 [*] (26,1 - 30,7)	32,2 [#] (30 - 34,5)
FT2B	19,8 (17,5 - 22,1)	23,8 [•] (21,4 - 26,1)	29,8 [*] (27,4 - 32,2)	34,8 [#] (32,4 - 37,2)

• $p < 0,02$ quando comparado com GC_(zero)-21d; * $p < 0,007$ quando comparado com GC_(Imob)-31d; # $p < 0,02$ quando comparado com GC₍₁₀₎-41d. Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

5.1.1.4 Análise de proporção

A análise de proporção dos diferentes tipos de fibras, no músculo sóleo dos grupos do Experimento 1, indicou predomínio de FT1 (Figura 7). Houve aumento de FT1 ($p = 0,0003$) e redução de FT2AD ($p = 0,03$) significativos entre as idades de 31 e 41 dias (GC_(Imob) vs GC₍₁₀₎).

• $p < 0,03$ quando comparado ao GC(lmob)-31d

Figura 7 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo nos grupos do Experimento 1. Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

De acordo com o crescimento dos animais, o músculo plantar apresentou aumento do número de FT2D, que predominou em todos os grupos, e redução da proporção de FT2B e FT2A ($p < 0,03$) (Figura 8). As FT1 e FT2C não apresentaram mudanças significativas com a idade.

Figura 8 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar nos grupos do Experimento 1. Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

5.1.1.5 Análise Semiquantitativa das isoformas de MHC

A análise semiquantitativa foi realizada intragrupos para evitar que as possíveis distorções de coloração entre as amostras dos grupos influenciassem a avaliação dos observadores.

No músculo sóleo de animais controle em diferentes idades, foram identificados 3 tipos de MHC: IIa, Neonatal e I (Tabela 10 e ilustração em ANEXO A). O discreto aparecimento da banda MHC_{neonatal} foi observado somente em animais recém-desmamados (GC_(zero)-21d), que também já possuem os subtipos de MHCIIa e I de forma evidente. Ressalta-se a similaridade na expressão entre os subtipos de MHCIIa e I que, quando é quantificada, demonstra valores muito próximos (Tabela 10). O predomínio da MHC I foi observado nos grupos GC_(zero)-21d e GC_(lmob)-31d, o que não ocorre no GC₍₁₀₎-41d e GC₍₂₁₎-52d que apresentaram predomínio de MHCIIa.

Tabela 10 - Análise semiquantitativa das MHCs do músculo sóleo – Experimento 1

MHC \ Grupos	GC_(zero) 21d	GC_(Imob) 31d	GC₍₁₀₎ 41d	GC₍₂₁₎ 52d
Embrionário	-	-	-	-
IIa	4	4	3	6
IIc	-	-	-	-
Neonatal	1	0	0	0
IIb	-	-	-	-
I	5	5	2	4

Classificação utilizada: 0 – Banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

Em busca da melhor interpretação dos resultados apresentados e comparação entre os achados na literatura, os valores absolutos descritos na avaliação entre os observadores (Tabela 10) foram transformados em porcentagens relativas. Considerou-se o total de 100% como a soma dos valores adotados em cada classificação do grupo e, a partir disso, foram calculadas as quantidades relativas de cada banda de MHC intragrupo (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores percentuais relativos à expressão total de proteína (MHC) de cada grupo para o músculo sóleo – Experimento 1

MHC \ Grupos	GC_(zero) 21d	GC_(Imob) 31d	GC₍₁₀₎ 41d	GC₍₂₁₎ 52d
Embrionário	-	-	-	-
IIa	40%	44%	60%	60%
IIc	-	-	-	-
Neonatal	10%	0	0	0
IIb	-	-	-	-
I	50%	56%	40%	40%

Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

As amostras do músculo plantar do Experimento 1 apresentaram 3 diferentes tipos de MHC: IId, IIb e I (Tabela 12 e ilustração em ANEXO A). A Tabela 12 demonstra os valores absolutos descritos na avaliação intragrupo de acordo com a classificação adotada, enquanto a Tabela 13 apresenta os valores percentuais relativos das bandas de MHC como descrito anteriormente. Observa-se que a MHCI teve expressão discreta em todos os grupos alcançando, 16,6% no GC₍₁₀₎-41d. Os tipos de MHCIIb e IId apresentaram valores mais expressivos no músculo plantar em todos os grupos (Tabela 13). Observa-se que o predomínio da MHCIIb ocorreu somente no GC_(zero)-21d com 55,5%. Os demais grupos apresentaram quantidades relativas iguais para a MHCIIb e IId.

O subtipo de MHCneonatal pode, possivelmente, ter sido expresso também no músculo plantar. Porém, a proximidade e a forte intensidade de coloração das bandas podem ter impedido sua identificação (ilustração em ANEXO A).

Tabela 12: Análise semi-quantitativa das MHC do músculo plantar – Experimento 1

MHC	Grupos	GC_(zero) 21d	GC_(Imob) 31d	GC₍₁₀₎ 41d	GC₍₂₁₎ 52d
Embrionário		-	-	-	-
IIa		-	-	-	-
IId		3	2	5	4
Neonatal		-	-	-	-
IIb		5	2	5	4
I		1	1	2	1

Classificação utilizada: 0 – banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

Tabela 13 - Valores percentuais relativos à expressão total de proteína (MHC) de cada grupo para o músculo plantar – Experimento 1

MHC \ Grupos	GC_(zero) 21d	GC_(Imob) 31d	GC₍₁₀₎ 41d	GC₍₂₁₎ 52d
Embrionário	-	-	-	-
Ila	-	-	-	-
IId	33%	43%	42%	44%
Neonatal	-	-	-	-
IIb	56%	43%	42%	44%
I	11%	14%	16%	12%

Cada grupo está indicado com a idade respectiva de seus animais (em dias)

5.1.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)

A análise da rC/F, a partir da fase pós-natal dos animais, indicou aumento progressivo do número de capilares nos músculos avaliados (Tabela 14). Esse achado foi visualizado através da comparação entre os animais de idades crescentes, tanto para o músculo sóleo (GC_(zero)-21d vs GC_(Imob)-31d p<0,0001; GC_(Imob)-31d vs GC₍₁₀₎-41d p<0,0001; GC₍₁₀₎-41d vs GC₍₂₁₎-52d p<0,9707) quanto para o músculo plantar (GC_(zero)-21d vs GC_(Imob)-31d p<0,0001; GC_(Imob)-31d vs GC₍₁₀₎-41d p<0,0001; GC₍₁₀₎-41d vs GC₍₂₁₎-52d p<0,9707).

Tabela 14 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) e intervalos de confiança do músculo sóleo e plantar dos grupos controle estudados

Músculos \ Grupos	GC_(zero) 21d	GC_(Imob) 31d	GC₍₁₀₎ 41d	GC₍₂₁₎ 52d
Sóleo	1,1 (0,9 – 1,2)	1,62* (1,4 – 1,8)	2,14# (2 – 2,3)	2,14 (2 – 2,3)
Plantar	0,6 (0,4 – 0,7)	1,0* (0,8 – 1,1)	1,14# (1 – 1,3)	1,24 (1,1 – 1,4)

*p<0,0001 comparado com GC_(zero); # p<0,0001 comparado com GC_(Imob)

O aumento da rC/F foi evidente entre as idades de 21 e 41 dias que demonstraram diferença estatística entre os valores encontrados. Porém, entre as idades de 41 (GC₍₁₀₎) e 52 dias (GC₍₂₁₎) não houve variação da rC/F, tanto para o músculo sóleo quanto para o plantar.

Observa-se que o músculo sóleo apresenta maiores valores da rC/F em todos os grupos quando comparado ao músculo plantar, visto suas propriedades de músculo postural com alto consumo oxidativo e recrutamento de maior aporte sanguíneo.

5.1.2 Discussão

O Experimento 1 acompanhou o desenvolvimento muscular normal de ratas, a partir da idade de 21 dias e peso corporal médio de 55,6g. O crescimento dos animais foi acompanhado pelo aumento da média do peso corporal dos grupos, que se mostrou mais evidente entre as idades de 21 e 41 dias. Yamaguchi et al. (2006) acompanharam o ganho de peso de ratos Wistar entre as idades de 35 a 70 dias. Eles demonstraram aumento do peso corporal com o avançar da idade, sendo que o maior ganho de peso ocorreu entre as idades de 35 e 42 dias. Pode-se sugerir que a partir de 40 dias de idade ocorra leve redução na taxa de crescimento dos animais, refletida no menor ganho de peso corporal. Tamaki e Uchiyama (1995) acompanharam o crescimento relativo de ratos Wistar a partir de 2 semanas de idade. Eles apontam que há rápido aumento do peso dos animais com alto coeficiente de correlação até a 10ª semana de vida, que corresponde à fase de maturação sexual dessa espécie.

Para o conhecimento das características principais do músculo esquelético, ocorridas nessa fase de desenvolvimento dos animais, foi realizada a análise morfológica dos músculos sóleo e plantar. Os músculos apresentaram características que comprovam a imaturidade do tecido em adaptação a novas demandas funcionais, dentre elas tem-se: fibras de forma muito arredondada, maior reatividade do tecido muscular, núcleos volumosos e maiores em relação às fibras. Grupos de animais de menor idade (GC_(zero) e GC_(imob)) demonstraram essas características de imaturidade tissular mais evidentes, indicando a ocorrência de processos adaptativos em resposta ao aumento da

funcionalidade nessa fase, caracterizada pela saída do ninho e desmame do animal (PUNKT; NAUPERT; ASMOSEN, 2004). Com o crescimento do animal, ocorre aumento no número de mionúcleos juntamente com a redução de seu tamanho (KAWANO et al., 2008).

Para corresponder ao aumento da demanda funcional, as fibras musculares podem adaptar-se através de mecanismos de hipertrofia muscular. Os achados do diâmetro menor auxiliam a identificar o crescimento muscular ocorrido durante o desenvolvimento de ratas recém-desmamadas.

O diâmetro menor de todos os tipos de fibras foi aumentado conforme o avançar da idade dos animais em ambos os músculos, sóleo e plantar. Tamaki e Uchiyama (1995) observaram aumento do diâmetro das fibras do músculo plantar de acordo com aumento do peso corporal dos animais, visualizado além da 10ª semana de vida, quando os animais iniciam a maturação sexual.

No músculo sóleo, todas as fibras apresentaram aumento do diâmetro menor durante a mesma fase do crescimento, exceto as FT2C e FT2AC, que coincidiu com a fase de maior aumento de peso corporal (21 a 41 dias) como mostrado anteriormente. Já no músculo plantar, as fibras apresentaram diferentes fases, quando sofreram aumento do diâmetro menor. Picquet et al. (1998) avaliaram a área de secção transversa das fibras do músculo sóleo entre as idades de 6 e 12 dias e entre 17 e 23 dias de vida de ratos. Eles não observaram variação da área das FT1, FT2A e FT2C entre as idades apontadas, visto os valores altos de desvio padrão das médias que limitaram a existência de diferença estatística. Também sugere-se que a variação de 5 dias entre as idades utilizadas possa ser insuficiente para visualizar o aumento da área de secção transversa das fibras.

Nakatani et al. (2000) avaliaram a área de secção transversa das FT1, FT2A e FT2B na porção profunda do músculo plantar, a mesma avaliada neste trabalho, de ratos adultos. Eles observaram que as FT2B apresentavam maior área em relação às FT1 e FT2A. O mesmo foi observado por Staron et al. (1999) nos músculos tibial anterior e extensor longo dos dedos (EDL), ambos com predomínio de fibras rápidas, em animais adultos. Para o músculo sóleo, com predomínio de fibras de contração lenta, as FT1 eram maiores comparadas às FT2A e FT2C (STARON et al., 1999).

Ratas em desenvolvimento pós-natal também apresentaram diferença importante entre o diâmetro menor dos diferentes tipos de fibras e confirmam os achados da literatura para animais adultos (NAKATANI et al., 2000; STARON et al., 1999). No músculo sóleo, o maior diâmetro das FT1 foi observado em todas as idades abordadas, com menor diferença somente na idade de 52 dias. Já no músculo plantar, o diâmetro das FT1 e FT2B foram muito similares e maiores em relação às demais fibras, sendo que, na idade de 52 dias, as FT2B atingiram maior diâmetro quando comparadas às FT1 e ao restante das fibras. Observa-se que o músculo sóleo já apresenta características do perfil oxidativo através do maior diâmetro das fibras de contração lenta, nessa fase do desenvolvimento. Entretanto, o músculo plantar apresenta valores muito semelhantes entre as FT2B e FT1, que pode denunciar um processo de amadurecimento do músculo durante essa etapa de vida dos animais. Entretanto, estudo de Schuenke et al. (2008), com animais recém-nascidos (21,9g), já demonstrou maior área de secção transversa de FT2B no músculo plantar, enquanto no sóleo as FT1 foram maiores quando comparadas aos demais tipos.

Segundo Nakatani et al. (2000), músculos de contração rápida apresentam fibras oxidativas (FT1 e FT2A) com menor área que as fibras menos oxidativas (FT2B), devido ao abundante consumo de oxigênio e nutrientes requeridos para suprir o metabolismo energético oxidativo. Os capilares responsáveis pelo suprimento sanguíneo estariam localizados intimamente na membrana basal e, assim, poderiam estar em maior quantidade em fibras de menor diâmetro. A partir disso, a atividade da enzima succinato dehidrogenase (SDH), que indica o perfil oxidativo da fibra, pode ser inversamente relacionada à área de secção transversa da fibra de músculos rápidos. Em animais bebês, a atividade da SDH apresenta aumento importante na idade de 21 dias e continua a aumentar após essa idade. Fibras oxidativas podem alcançar maior atividade enzimática que as fibras glicolíticas no 75º dia de vida, visualizada no músculo gastrocnêmio de ratos em desenvolvimento pós-natal (PUNKT; NAUPERT; ASMOSSEN, 2004). Dessa forma, a similaridade entre o diâmetro menor das FT2B e FT1 no músculo plantar de animais bebês pode ser em decorrência de ajuste na atividade enzimática que se estabilizará em fase adiante, juntamente com a demanda funcional.

Além do diâmetro das fibras, a quantidade de cada uma delas indicará as características e perfil de contração do músculo avaliado. A análise de proporção dos

diferentes tipos de fibras no músculo sóleo já apresentou, caracteristicamente, predomínio de FT1, sendo que entre as idades de 31 e 41 dias houve aumento de FT1 e redução de FT2AD.

O músculo plantar apresentou predomínio de FT2D em todos os grupos. O desenvolvimento dos animais não modificou a proporção de FT1 e FT2C, porém, foi acompanhado pelo aumento do número de FT2D e redução da proporção de FT2B e FT2A. A análise das isoformas de MHC, discutida mais adiante, reafirma os achados para FT2B e FT2D, onde houve aumento evidente da expressão da MHCIIId e redução da MHCIIb com o avançar da idade dos animais.

Punkt, Naupert e Asmossen (2004) observaram predomínio de 70,4% de FT1 no músculo sóleo de ratos Wistar com 21 dias de idade, através da técnica de imunoistoquímica. Os resultados, aqui, indicaram porcentagem média de 49% de FT1 através da reação de mATPase, para animais de mesma idade, conforme apresentado anteriormente. Em músculos de contração rápida, como extensor longo dos dedos (EDL) e gastrocnêmio, a proporção de FT1 foi entre 6 e 10% e as FT2 representaram de 90 a 93% do total de fibras. Os autores não diferenciaram os subtipos de FT2 como realizado no presente estudo, porém, a proporção entre fibras oxidativas e glicolíticas foi similar para o músculo plantar de 21 dias de idade abordado aqui.

Picquet et al. (1998) avaliaram a proporção das fibras presentes no músculo sóleo durante o desenvolvimento pós-natal. O aumento de FT1 foi evidente entre as idades de 17 e 23 dias (55,9 e 63,4%, respectivamente). Por outro lado, o aumento de FT1 também foi observado nesse estudo e ocorreu entre as idades de 31 e 41 dias de idade (48,9 e 58,9%, respectivamente). Yamaguchi et al. (1996) avaliaram o sóleo de animais de 35 dias de idade, e já constatarem predomínio de 85,6% de FT1 nessa fase. Os dois estudos abordados nesse parágrafo realizaram a técnica histoquímica para mATPase, entretanto, não realizaram classificação similar para os diferentes subtipos de FT2, o que impossibilita comparações com este trabalho.

Schuenke et al. (2008) demonstraram a proporção entre os diferentes tipos de fibras do sóleo e plantar em ratos recém-nascidos (21,9g) saudáveis. A classificação das fibras apresentada pelos autores muito se aproximou daquela utilizada neste trabalho. O músculo sóleo demonstrou proporções similares com os achados apresentados aqui. A quantidade

entre as fibras, de forma decrescente, foi demonstrada com predomínio de FT1, seguido por menores quantidades de FT2A, FT2AD, FT2C e, por último, FT2D. O músculo plantar de ratos recém-nascidos apresentou maiores quantidades de FT2B e menores de FT1 quando comparados aos resultados apresentados para animais bebês.

A composição das isoformas de MHC do músculo sóleo de animais em desenvolvimento pós-natal foi formada pelos tipos: IIa, neonatal e I. Enquanto as isoformas presentes no músculo plantar foram: IIa, IIb e I. A presença da MHCIIa no músculo sóleo de animais saudáveis gera divergências entre os achados na literatura. Alguns estudos não observaram a presença da MHCIIa no músculo sóleo (PICQUET et al., 1997; STARON et al., 1999; YAMAGUCHI et al., 2006), enquanto outros estudos constataram que animais de 7, 14, 21 e 90 dias de idade expressavam a MHCIIa nesse músculo (ADAMS et al., 2000; AGBULUT et al., 2003). A identificação da MHCIIa no músculo sóleo e MHCIIa no músculo plantar pode ter sido comprometida pela proximidade existente entre elas e, segundo Picquet et al. (1998), o gel de eletroforese (SDS-PAGE) pode não permitir separação consistente entre esses 2 tipos de MHC. E, ainda, reforça-se a existência da MHCIIa através da identificação de FT2D e FT2AD na análise de proporção (técnica histoquímica para ATPase) do músculo sóleo e, também, por estudos recentes da literatura (SCHUENKE et al., 2008).

O discreto aparecimento da banda MHCneonatal (10%) foi observado somente em animais recém-desmamados de 21 dias ($GC_{(zero)}$), que já apresentavam predomínio de MHCI (50%) e presença de MHCIIa (40%), juntamente com animais de 31 dias de idade - $GC_{(Imob)}$. Picquet et al. (1997) demonstraram que ratos machos de 23 dias de idade apresentavam 58% de MHCI, 30% MHCIIa e 12,4% para MHCneonatal. No ano seguinte, os autores demonstraram que ratos machos de 17 e 23 dias apresentavam mais de 60% de MHCI e quantidades próximas a 20% para MHCIIa e MHCneonatal (PICQUET et al., 1998). Agbulut et al. (2003) acompanharam o desenvolvimento muscular de ratos através da análise da expressão das diferentes isoformas de MHC. Eles observaram que animais de 21 dias de idade apresentavam ainda 6,6% de MHCneonatal, 35,8% de MHCIIa, 31,3% de MHCIIb e 32% de MHCI. Em outro estudo, animais de 7 e 14 dias de idade já apresentavam predomínio de MHCI (78,8%) e desaparecimento dos tipos de MHC neonatal e embrionária no músculo sóleo. A MHCIIa e IIb também estavam expressas

nesses animais (20 e 1,1%, respectivamente) (ADAMS et al., 2000). A expressão da isoforma de MHCI de 80%, MHCIIa de 20% e desaparecimento da MHCneonatal também foram observados por Yamaguchi et al. (2006) em ratos Wistar de 100g.

O GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎ não apresentaram predomínio de MHCI (40%) no músculo sóleo e sim de MHCIIa (60%). Entretanto, ratos jovens (Fischer 344) já apresentavam predomínio de 94% de MHCI e 6% de MHCIIa no músculo sóleo sadio (STARON et al., 1999; SULLIVAN et al., 1995). Esses achados contrariam a alta porcentagem de FT1 apresentada pela análise de proporção de fibras desses grupos, abordada anteriormente. Agbulut et al. (2003) também demonstraram que músculo sóleo de animais de 28 e 49 dias de idade apresentaram predomínio evidente da MHCIIa sobre os tipos de MHCI e IIId. Esses autores não quantificaram em porcentagem as isoformas de MHC para essas idades. A partir do gel de poliacrilamida deste estudo, sugere-se que a proximidade entre as bandas de MHCIIa e MHCIIId pode ter justificado a alta expressão visualizada na MHCIIa, classificada neste trabalho, que pode ter impedido a constatação do predomínio da MHCI.

O predomínio e a intensa expressão dos tipos de MHCIIId e IIb no músculo plantar caracterizam o caráter glicolítico de suas fibras. A MHCI apresentou-se de forma discreta em todos os grupos, variando de 11 a 16,6%. O predomínio da MHCIIb ocorreu somente no GC_(zero) com 55,5%, enquanto os outros grupos apresentaram entre 41,7 e 44,4%. Yamaguchi et al. (2006) observaram predomínio de MHCIIb e IIId e expressão mínima de MHCI no músculo plantar de ratos muito jovens. No estudo de Adams et al. (2000) foi observado mínima expressão de MHCI (2%) e predomínio da MHCIIb (69%) no músculo plantar de animais bebês com 14 dias de vida, e as MHCIIa e IIId também foram expressas em 6,6 e 23%, respectivamente. Agbulut et al. (2003) demonstraram que a MHCIIb é a mais expressa (46,3%) no músculo plantar de animais de 21 dias de idade, que apresentam ainda MHCIIa (20%), MHCIIId (32%) e MHCI (1,7%). Essa proporcionalidade entre as isoformas de MHC se manteve para o músculo plantar de animais com 28 e 49 dias de idade do mesmo estudo.

Di Maso et al. (2000) avaliaram o desenvolvimento pós-natal do rato através do músculo plantar de animais de 5 a 40 dias de vida. Animais de 20 dias de idade apresentaram predomínio de MHCIIb com 44%, MHCIIId com 22%, MHCIIa com 15% e MHCI

com 11% no músculo plantar. Por outro lado, ratos de 40 dias de idade apresentaram queda na porcentagem da MHCIIb (41%) e MHCI (6%) com aumento nas quantidades de MHCIId e IIa (25 e 22%, respectivamente). A quantidade relativa entre as isoformas da MHC apresentadas por esses estudos, para o músculo plantar, são muito semelhantes às aquelas demonstradas neste trabalho, visto que as MHCIId e IIa podem ter sido avaliadas em conjunto pela proximidade da localização de suas bandas. Além disso, a análise de proporção entre os tipos de fibras reforça essa hipótese, pois apresentou predomínio de FT2D em todas as idades e com aumento progressivo, seguido por grandes quantidades de FT2A.

Para acompanhar as novas exigências funcionais próprias da idade, o desenvolvimento muscular normal foi acompanhado pelo aumento progressivo do número de capilares nos músculos sóleo e plantar, avaliado a partir da análise da relação capilar/fibra (rC/F). Ripoll, Sillau e Banchemo (1979) avaliaram a rC/F durante o crescimento de ratos, a partir de animais com 99g. Os autores encontraram correlação linear positiva entre a área de secção transversa e a rC/F. Degens et al. (2006) também demonstraram que o crescimento muscular normal, avaliado a partir do músculo sóleo de animais com 66g, é acompanhado pelo aumento linear da relação capilar/fibra através da angiogênese, de forma a manter a *performance* muscular (DEGENS et al., 2006; KANO et al., 2002).

Quando comparado ao músculo plantar, observa-se que o músculo sóleo apresentou maiores valores da rC/F em todos os grupos deste trabalho. O mesmo foi demonstrado por Ripoll, Sillau e Banchemo (1979) que compararam os valores da rC/F do músculo sóleo com o gastrocnêmio. Sugere-se que a diferença na composição e atividade metabólica das fibras musculares, visto o predomínio de fibras oxidativas do músculo sóleo e fibras glicolíticas no músculo gastrocnêmio, seja responsável pela diferença na quantidade capilar observada entre os músculos (DEGENS et al., 2006; RIPOLL; SILLAU; BANCHEMO, 1979).

Os dados do presente experimento indicaram que as variáveis adotadas para analisar o desenvolvimento e maturação dos músculos sóleo e plantar de ratos acompanharam os achados da literatura científica, para animais machos, em fase de desenvolvimento pós-natal.

5.2 EXPERIMENTO 2 – Alongamento mantido pós-imobilização

5.2.1 Resultados

5.2.1.1 Peso corporal

O peso corporal dos animais com a idade de 21 dias foi chamado peso inicial e, posteriormente, o peso final foi medido no dia da ortotanásia. A Tabela 15 demonstra os valores do peso corporal dos animais que foram somente imobilizados (GI), imobilizados e alongados por diferentes períodos (10 ou 21 dias - GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎), seus respectivos grupos controle (GC_(Imob), GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎) e, ainda, o grupo que foi somente anestesiado (GA).

Tabela 15 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso inicial) e no dia do sacrifício (peso final), referentes ao Experimento 2. Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$)

GRUPOS	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
GC _(Imob)	51,6 ($\pm$ 2,4)	118 ($\pm$ 5,3)
GI	53,7 ($\pm$ 3,1)	77,8 ($\pm$ 5,3)*
GC ₍₁₀₎	57,3 ($\pm$ 3,5)	218,6 ($\pm$ 19,4)
GIAL ₍₁₀₎	52 ($\pm$ 4,2)	163,7 ($\pm$ 14,2) ^o
GC ₍₂₁₎	54,1 ($\pm$ 3,4)	239,6 ($\pm$ 12,3)
GIAL ₍₂₁₎	55,1 ($\pm$ 1,4)	222,2 ($\pm$ 19,9)
GA	55,5 ($\pm$ 2,4)	257,2 ($\pm$ 18,8)

Tukey-Kramer - * $p < 0,01$ comparado com GC_(Imob); ^o $p < 0,01$ comparado com GC₍₁₀₎

A comparação entre os valores médios de peso inicial não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Após o período de imobilização por 10 dias consecutivos, os animais do GI apresentaram peso final médio menor em relação ao

GC_(Imob) com diferença de 34% ($p < 0,01$). Pode-se inferir que o ganho de peso diário desses animais foi de aproximadamente 40% do ganho obtido para os animais do GC_(Imob), o que sugere atraso no crescimento dos animais submetidos à imobilização.

Os animais do grupo GIAL₍₁₀₎ não alcançaram os valores de referência para peso corporal do GC₍₁₀₎ ($p < 0,01$). Por outro lado, o GIAL₍₂₁₎ obteve peso final médio muito próximo aos valores demonstrados pelo GC₍₂₁₎ (diferença não significativa). Os animais do grupo GA que foram somente anestesiados não apresentaram alteração do peso corporal, quando comparados ao GC₍₂₁₎ de mesma idade.

5.2.1.2 Morfologia

A análise morfológica dos músculos de animais que compuseram o Experimento 2 foi realizada da mesma forma como descrita no Experimento 1. As Tabelas 16 e 17 demonstram a quantidade média das alterações histopatológicas encontradas nos músculos sóleo e plantar, respectivamente.

A avaliação detalhada dos animais do GI demonstrou alta reatividade do músculo sóleo, fibras de forma arredondada, núcleo volumoso e maior número de alterações específicas, como núcleo centralizado e necrose, quando comparado ao GC_(Imob) (Figura 9 - B).

O músculo sóleo de animais alongados - GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ apresentou maior número de alterações histopatológicas quando comparado ao GC₍₁₀₎, ao GC₍₂₁₎ e ao GI (Figura 9). Destaca-se a presença de número expressivo de núcleos centralizados em ambos os grupos alongados. Os músculos do GIAL₍₁₀₎ apresentaram fibras bem arredondadas de diferentes tamanhos, núcleo volumoso e presença de fibras fantasma. Já os músculos do GIAL₍₂₁₎ demonstraram fibras menos arredondadas e tecido mais reativo quando comparado ao GIAL₍₁₀₎. No GA, o músculo sóleo apresentou características similares às aquelas apresentadas pelo GC₍₂₁₎, sem achados importantes.

Tabela 16 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo sóleo, em número de fibras, referentes ao Experimento 2

Alterações	Grupos						
	GC _(Imob)	GI	GC ₍₁₀₎	GIAL ₍₁₀₎	GC ₍₂₁₎	GIAL ₍₂₁₎	GA
Centralização nuclear	0,5 (±0,6)	6,5 (±6,7)	0	117,3 (±403,4)	4,3 (±3)	81,7 (±157,8)	4 (±5,2)
Fibras lobuladas	0	0	0	0,7 (±1,63)	1,3 (±2,3)	0	0
Degeneração/Necrose	0	5 (±3)	0	2,2 (±2,4)	0,3 (±0,6)	2,8 (±3,1)	1 (±0)
Regeneração	0	0,5 (±1,2)	0	0,2 (±0,4)	0,3 (±0,6)	0,8 (±0,7)	0
<i>Splitting</i>	0	0	0	0,2 (±0,4)	0,3 (±0,6)	0	0,3 (±0,6)
Lesão tipo <i>Central Core</i>	0	0	0	0	0	0	0
Halo basofílico	0	0	0	0,3 (±0,8)	0	4,3 (±5,7)	0

O músculo plantar de animais do GI apresentou achados pouco expressivos quando comparado ao GC_(Imob), exceto para alterações relacionadas à necrose/degeneração (Tabela 17).

No GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎, o músculo plantar apresentou poucas alterações patológicas, de forma similar aos músculos do GC₍₁₀₎, GC₍₂₁₎ e GI, como mostram a Tabela 17 e a Figura 9.

Sob o ponto de vista da análise morfológica, nota-se que o músculo sóleo comportou-se de forma mais reativa quando comparado ao músculo plantar, principalmente nos animais imobilizados + alongados.

Tabela 17 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo plantar, em número de fibras, referentes ao Experimento 2

Alterações	Grupos						
	GC _(Imob)	GI	GC ₍₁₀₎	GIAL ₍₁₀₎	GC ₍₂₁₎	GIAL ₍₂₁₎	GA
Centralização nuclear	1,7 (±2)	1 (±2)	1 (±1)	2,3 (±2,9)	1,5 (±2,4)	3,7 (±8)	1,3 (±1,1)
Fibras lobuladas	0	0,3 (±0,8)	0	0	0	0	0
Degeneração/Necrose	1,2 (±0,9)	7,8 (±5)	7 (±3)	5,7 (±5)	2 (±1,4)	2,7 (±2)	1,7 (±1,5)
Regeneração	0	0,5 (±0,5)	0	0,5 (±0,5)	1 (±1,1)	0,2 (±0,4)	0,7 (±0,5)
<i>Splitting</i>	0,5 (±1)	0,7 (±0,8)	0	0	0	0	0,7 (±0,5)
Lesão tipo <i>Central Core</i>	0	0	0	0	0	0	0
Halo basofílico	4 (±1,8)	0,7 (±0,8)	9,7 (±3,8)	4,2 (±2,3)	2 (±2)	8,5 (±5,2)	4,7 (±3,5)

Figura 9 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo (A-F) e plantar (G-M) do Experimento 2. A, G – GC_{I(mob)}; B, H – GI; C, I – GC₍₁₀₎; D, J – GIAL₍₁₀₎; E, L – GC₍₂₁₎; F, M – GIAL₍₂₁₎. Observa-se a forma arredondada das fibras do GI que apresentam tamanho muito reduzido comparado ao GC_{I(mob)} (*). Grande quantidade de núcleos centralizados foi observada no músculo sóleo dos grupos alongados (seta). Barra: 60µm

5.2.1.3 Diâmetro menor das fibras

No músculo sóleo, a imobilização foi capaz de reduzir o diâmetro de todos os tipos de fibras (GI vs GC_(Imob) $p < 0,0001$) (Tabela 18).

No GIAL₍₁₀₎ e no GIAL₍₂₁₎ houve aumento do diâmetro de todos os tipos de fibras quando comparados ao GI ($p < 0,0001$). Porém, no GIAL₍₁₀₎ foi observado aumento satisfatório somente nos valores do diâmetro de FT2C e FT2AC, quando comparado ao GC₍₁₀₎. Enquanto no GIAL₍₂₁₎ foi modificado somente o diâmetro de FT2D de forma satisfatória quando comparado ao GC₍₂₁₎ (Tabela 18). No GA, o músculo sóleo apresentou maior diâmetro de FT1, FT2AC e FT2AD, quando comparado ao GC₍₂₁₎ ($p < 0,02$).

Tabela 18 - Valores médios do diâmetro menor (μm) e intervalos de confiança dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo do Experimento 2

Grupos Fibras	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GIAL₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GIAL₍₂₁₎	GA
FT1	29,2 (26,9 – 31,4)	15 [•] (13,4 – 16,6)	36,9 (34,6 – 39,2)	25,1 ^{° *} (23,5 – 26,7)	37,9 (35,6 – 40,2)	30,5 ^{° #} (28,9 – 32,1)	41,6 [#] (39,4 – 43,9)
FT2C	23,7 (20,8 – 26,5)	14,1 [•] (12,3 – 15,8)	25,9 (23 – 28,8)	22,7 [°] (20,9 – 24,4)	32,3 (29,3 – 35,2)	26 ^{° #} (24,1 – 27,9)	29,1 (25,8 – 32,4)
FT2AC	23,8 (20,8 – 26,8)	13 [•] (11 – 15)	24,9 (20,9 – 28,8)	24,8 [°] (22,9 – 26,7)	35,8 (32,3 – 39,3)	26,4 ^{° #} (24,4 – 28,5)	42,5 [#] (39,2 – 45,8)
FT2A	26 (23,7 – 28,3)	15,1 [•] (13,5 – 16,7)	34 (31,7 – 36,3)	26,4 ^{° *} (24,7 – 28)	35,4 (33,1 – 37,8)	29,1 ^{° #} (27,4 – 30,7)	37,7 (35,4 – 40)
FT2AD	25,9 (23,4 – 28,4)	14,6 [•] (12,2 – 17)	33,3 (30,4 – 36,2)	26,6 ^{° *} (24,8 – 28,4)	35,8 (32,9 – 38,6)	30,5 ^{° #} (28,5 – 32,5)	41,4 [#] (38,6 – 44,2)
FT2D	24,8 (21,9 – 27,6)	13,1 [•] (8,1 – 18)	31,2 (27,8 – 34,5)	27 ^{° *} (25 – 28,9)	36,1 (30,2 – 41,9)	32,2 [°] (29,5 – 34,8)	35,7 (28,8 – 42,7)

• $p < 0,0001$ quando comparado com GC_(Imob); ° $p < 0,0001$ quando comparado com GI; * $p < 0,0001$ quando comparado com GC₍₁₀₎; # $p < 0,02$ quando comparado com GC₍₂₁₎

No músculo plantar, a imobilização também reduziu de forma significativa ($p < 0,04$) o diâmetro menor de todos os tipos de fibras (Tabela 19).

Os músculos do GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ aumentaram o diâmetro de todos os tipos de fibras quando comparados ao GI ($p < 0,001$). Ambos os grupos não modificaram satisfatoriamente o diâmetro das FT1, sendo que o restante das fibras, exceto as FT2C do GIAL₍₁₀₎, tiveram aumento do diâmetro menor em relação ao GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎. No GA, o músculo plantar apresentou o diâmetro das FT2C maior que no GC₍₂₁₎ ($p = 0,01$).

Tabela 19 - Valores médios do diâmetro menor (μm) e intervalos de confiança dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar do Experimento 2

Grupos Fibras	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GIAL₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GIAL₍₂₁₎	GA
FT1	27 (24,6 – 29,5)	14,7 [•] (13 – 16,4)	28,1 (25,7 – 30,5)	23,3 ^{° *} (21,6 – 25)	32,4 (30 – 34,8)	28,3 ^{° #} (26,6 – 29,9)	33,6 (31,2 – 36)
FT2C	19,3 (16,6 – 22)	13,5 [•] (10,2 – 16,9)	17,7 (12,7 – 22,8)	19,9 [°] (18 – 21,8)	25,8 (22,6 – 29,1)	24,2 [°] (21,6 – 26,8)	32,8 [#] (28,3 – 37,3)
FT2A	19,5 (17,2 – 21,8)	14 [•] (12,4 – 15,7)	24 (21,7 – 26,3)	21,2 [°] (19,5 – 22,8)	28,8 (26,5 – 31,1)	26,4 [°] (24,8 – 28)	29 (26,7 – 31,4)
FT2D	20,7 (18,4 – 22,9)	15,6 [•] (14 – 17,2)	28,4 (26,1 – 30,7)	23,3 ^{° *} (21,7 – 24,9)	32,2 (30 – 34,5)	30,8 [°] (29,2 – 32,4)	34,3 (32 – 36,6)
FT2B	23,8 (21,4 – 26,1)	20,7 [•] (19,1 – 22,4)	29,8 (27,4 – 32,2)	27 [°] (25,3 – 28,7)	34,8 (32,4 – 37,2)	36,3 [°] (34,6 – 37,9)	35,4 (33,1 – 37,8)

• $p < 0,04$ quando comparado com GC_(Imob); ° $p < 0,001$ quando comparado com GI; * $p < 0,001$ quando comparado com GC₍₁₀₎; # $p < 0,01$ quando comparado com GC₍₂₁₎

5.2.1.4 Análise de proporção

A análise de proporção de fibras dos músculos de animais pertencentes ao Experimento 2 representa as transições entre os diferentes tipos de fibra do músculo sóleo e plantar, em resposta ao desuso e à aplicação da técnica de alongamento mantido.

O músculo sóleo do GI, quando comparado ao GC_(Imob), apresentou redução significativa de FT1 ($p < 0,0001$) e FT2AD ($p = 0,001$), enquanto aumentou a proporção de FT2A ($p < 0,0001$) e FT2C ($p = 0,0007$) (Figura 10).

A aplicação do protocolo de alongamento mantido por 10 dias - GIAL₍₁₀₎ - provocou aumento no número de FT1, quando comparado ao GI ($p < 0,0001$), porém, não atingiu os valores demonstrados pelo GC₍₁₀₎ ($p < 0,0001$). As FT2C, com alta proporção no GI, se mantiveram em grande número no GIAL₍₁₀₎. Por outro lado, a redução de FT2A no GIAL₍₁₀₎ modificou a proporção dessa fibra, que se apresentava aumentada no GI, alcançando os valores de GC₍₁₀₎. Houve também aumento significativo do número de FT2AD no GIAL₍₁₀₎, que reverteu a redução observada no GI (Figura 10).

Por outro lado, o GIAL₍₂₁₎ reverteu satisfatoriamente os valores de FT1, FT2C e FT2A, quando comparado ao GI ($p < 0,0001$; $p = 0,001$; $p < 0,0001$, respectivamente), alcançando os

valores demonstrados pelo GC₍₂₁₎ (Figura 10). O GA não apresentou alterações no músculo sóleo em relação à proporção de fibras.

Os protocolos de alongamento de 10 e 21 dias, portanto, aumentaram progressivamente o número de FT1 (reduzidas pela imobilização) e reduziram as FT2A (aumentadas pela imobilização) no músculo sóleo.

Figura 10 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo nos grupos do Experimento 2

Na Figura 11, pode-se observar o grupo imobilizado do músculo plantar, que apresentou redução significativa de FT2A e aumento importante de FT2D, quando comparado ao GC_(Imob) (p<0,0001). Os demais tipos de fibra não apresentaram mudanças na sua proporção.

O alongamento mantido por 10 dias - GIAL₍₁₀₎ - provocou aumento do número de FT2A (p=0,0001), que atingiu os valores obtidos no GC₍₁₀₎. As FT2B apresentaram redução

significativa quando comparadas às fibras do GI ($p < 0,0001$) e do GC₍₁₀₎ ($p = 0,03$) e as FT2D mantiveram a proporção observada no GI (Figura 11).

No GIAL₍₂₁₎ também houve aumento significativo do número de FT2A ($p = 0,0002$) correspondendo aos valores demonstrados pelo GC₍₂₁₎. Entretanto, as FT2D sofreram grande redução em relação ao GI ($p < 0,0001$), onde sua proporção foi menor do que a apresentada pelo GC₍₂₁₎ ($p = 0,004$). As FT2B tiveram aumento significativo, quando se comparou ao GC₍₂₁₎ ($p < 0,0001$), porém, mantiveram a proporção observada no GI (Figura 11). No GA não houve alteração do músculo plantar em relação à proporção de fibras.

O alongamento por 10 ou 21 dias modificou de forma satisfatória a proporção de FT2A, sendo que os demais tipos comportaram-se diferentemente entre GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎, não atingindo os valores de referência dos respectivos grupos controle.

Figura 11 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar nos grupos do Experimento 2

5.2.1.5 Análise semiquantitativa das isoformas de MHC

A análise semi-quantitativa foi realizada intragrupos, com valores absolutos e em porcentagens relativas (Tabela 20), como descrita para o Experimento 1. Os principais subtipos de MHC, encontrados no músculo sóleo, foram IIa, Neonatal e I (ilustração em ANEXO A). Quando comparados ao GC_(Imob), os animais do GI demonstraram menor expressão da MHC I devido à presença de MHCneonatal. O aparecimento do subtipo de MHCneonatal ocorreu nos grupos GI, GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎, com destaque para maior expressão demonstrada no GI. Por outro lado, a expressão de MHC I foi crescente na comparação entre os grupos GI, GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ (Tabela 20). Os músculos do GA demonstraram expressão das isoformas de MHC similar àquela demonstrada pelos grupos controle.

Tabela 20 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo sóleo – Experimento 2

Grupos MHC	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GIAL₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GIAL₍₂₁₎	GA
Embrionário	-	-	-	-	-	-	-
IIa	4 (44%)	2 (50%)	3 (60%)	4 (50%)	6 (60%)	4 (40%)	4 (44%)
IIId	-	-	-	-	-	-	-
Neonatal	0	1 (25%)	0	1 (12%)	0	1 (10%)	0
IIb	-	-	-	-	-	-	-
I	5 (56%)	1 (25%)	2 (40%)	3 (38%)	4 (40%)	5 (50%)	5 (56%)

Classificação utilizada: 0 – banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

As amostras do músculo plantar, referentes aos grupos do Experimento 2, apresentaram as isoformas de MHC IIId, IIb e I (ilustração em ANEXO A). Observa-se que a MHC I teve expressão discreta em todos os grupos. Os fragmentos do GI apresentaram

aumento da expressão da MHCIIb (57%) e redução da expressão da MHCIIa, quando comparado ao GC_(Imob) (Tabela 21). No GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎, a expressão das isoformas de miosina foram similares àquelas apresentadas pelo GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎, respectivamente. No GA houve expressão das isoformas de MHC similar à demonstrada pelos GC₍₂₁₎.

Tabela 21 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses) correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo plantar – Experimento 2

Grupos MHC	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GIAL₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GIAL₍₂₁₎	GA
Embrionário	-	-	-	-	-	-	-
IIa	-	-	-	-	-	-	-
IIc	2 (43%)	2 (29%)	5 (42%)	4 (45%)	4 (45%)	5 (42%)	5 (45%)
Neonatal	-	-	-	-	-	-	-
IIb	2 (43%)	4 (57%)	5 (42%)	4 (44%)	4 (44%)	5 (42%)	5 (45%)
I	1 (14%)	1 (14%)	2 (16%)	1 (11%)	1 (11%)	2 (16%)	1 (10%)

Classificação utilizada: 0 – banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

5.2.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)

O procedimento de imobilização aplicado aos animais durante 10 dias determinou redução significativa da rC/F no músculo sóleo e no músculo plantar ($p < 0,0001$). Os valores comparativos entre o GI e GC_(Imob) podem ser visualizados na Tabela 22.

A técnica de alongamento mantido, aplicada por 10 ou 21 dias após o período de imobilização, foi capaz de aumentar a rC/F dos músculos sóleo e plantar dos animais, quando comparados ao GI ($p < 0,0001$). Porém, o aumento da rC/F no músculo sóleo desses animais não alcançou os valores de referência demonstrados pelos grupos controle de mesma idade GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎ ($p < 0,0001$). Por outro lado, o músculo plantar de animais do

GIAL₍₂₁₎ apresentou aumento significativo da rC/F, atingindo o valor médio de referência do GC₍₂₁₎. Esse achado não foi observado no músculo plantar de animais do GIAL₍₁₀₎.

Os músculos sóleo e plantar dos animais do GA não apresentaram alterações da rC/F quando, comparados ao GC₍₂₁₎ de mesma idade.

O alongamento, portanto, foi capaz de modificar parcialmente os achados induzidos pela imobilização sobre a rC/F no músculo sóleo. Enquanto para o músculo plantar, o alongamento aplicado por 21 dias modificou totalmente os valores da rC/F nesses animais.

Tabela 22 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) e intervalos de confiança do músculo sóleo e plantar dos grupos abordados no Experimento 2

Grupos Músculos	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GIAL₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GIAL₍₂₁₎	GA
Sóleo	1,62 (1,4 – 1,8)	0,71* (0,6 – 0,8)	2,14 (2 – 2,3)	1,16# • (1 – 1,3)	2,14 (2 – 2,3)	1,5# ° (1,4 – 1,6)	2,04 (1,4 – 1,8)
Plantar	1,0 (0,8 – 1,1)	0,52* (0,4 – 0,6)	1,14 (1 – 1,3)	0,88# • (0,8 – 1)	1,24 (1,1 – 1,4)	1,26# (1,1 – 1,4)	1,45 (1,3 – 1,6)

* p<0,0001 comparado com GC_(Imob); # p<0,0001 comparado com GI; • p<0,005 comparado com GC₍₁₀₎;

° p<0,0001 comparado com GC₍₂₁₎

5.2.2 Discussão

Pode-se constatar que o crescimento dos animais foi afetado pelo procedimento de imobilização em consideração aos resultados observados para peso corporal. A escolha por esse dispositivo de imobilização, descrito com detalhes anteriormente, foi feita baseada nas inúmeras vantagens demonstradas como material de baixo peso, fácil manuseio e ajuste da peça ao crescimento dos animais, baixa limitação à locomoção e alimentação dos animais, permissão para higienização periódica de animais bebês, entre outros. Além disso, estudo piloto realizado no laboratório, deste estudo, foi feito para confrontar a utilização da imobilização gessada e do novo dispositivo de imobilização em animais de tenra idade. O

dispositivo utilizado aqui obteve menor peso quando comparado ao gesso, que apresentou de 55 a 65% da média do peso corporal dos animais de 21 dias de idade, limitando sua locomoção e alimentação no interior da caixa de alojamento. E, ainda, a imobilização gessada demonstrou difícil reaproveitamento e ajuste do material aos animais e dificuldade para correta higienização da genitália de animais bebês. Portanto, apesar do atraso na taxa de crescimento dos animais, esse teria sido acentuado com o uso da imobilização gessada.

Piquet et al. (1998) aplicaram a técnica de imobilização gessada por 6 dias em ratos machos Sprague Dawley, durante dois estágios do desenvolvimento neural do animal (6-12 dias e 17-23 dias). Eles demonstraram que o gesso foi capaz de provocar alterações microscópicas, como atrofia e encurtamento, e que essas alterações foram acompanhadas por ganho de peso normal dos animais durante esse período. Entretanto, os autores supracitados não mencionaram resultados do peso corporal inicial e final (após 6 dias de desuso) dos animais, peso do modelo gessado e comportamento dos animais no período de amamentação, necessários para comprovar o bom crescimento dos animais durante a imobilização. Considerando que em animais adultos o procedimento de imobilização (gessado ou pela utilização desse dispositivo) tem demonstrado afetar o crescimento do animal (BOOTH AND KELSO, 1973; COUTINHO et al., 2004; IANUZZO et al., 1989; KASPER et al., 1993; SAVOLAINEN et al., 1987), era esperado que o impacto da imobilização acarretassem alterações significativas durante o desenvolvimento pós-natal.

O modelo inicial proposto por Coutinho et al. (2002) para ratos adultos, utilizando material similar ao descrito neste estudo, provocou perda de 12% (± 6) do peso corporal dos animais após 21 dias consecutivos de imobilização (COUTINHO et al., 2004; GOMES et al., 2004). Nesse caso, o peso do dispositivo representava somente 4% do peso corpóreo médio desses animais. Já em animais recém-desmamados, o modelo de imobilização representou 35% do peso médio dos animais e provocou perda de 34% do peso corporal dos mesmos, quando comparados ao grupo controle.

Possivelmente as alterações do peso corporal encontradas nos animais bebês imobilizados tenham origem multicausal, recebendo influências do desuso, da atrofia

muscular no membro, do estresse e à provável redução da síntese proteica como resposta à hipoatividade. Ainda assim, o tipo de imobilização apresentado em nosso estudo mostrou ser uma alternativa eficiente capaz de restringir a ADM dos membros de animais pequenos e de baixo peso com sucesso, como também observado em ratos adultos machos (COUTINHO et al., 2000), e apresentou vantagens em relação a outros métodos para induzir o desuso do membro posterior.

Os animais submetidos à técnica de alongamento mantido, ao longo de 21 dias, apresentaram peso corporal equivalente ao GC₍₂₁₎, enquanto os animais tratados durante 10 dias apresentaram peso corporal inferior ao GC₍₁₀₎. Acredita-se que a recuperação do peso corporal dos animais possa estar relacionada mais ao tempo em que eles ficaram sem o aparato de imobilização do que propriamente ao alongamento em si. Grupos de animais, que foram imobilizados por 10 dias com o mesmo dispositivo descrito aqui e ficaram livres na gaiola pelo mesmo período de alongamento (10 ou 21 dias), apresentaram ganho de peso muito similar aos animais alongados (dados não apresentados).

A análise morfológica do Experimento 2 demonstrou que os animais do G1 apresentaram alta reatividade no músculo sóleo e plantar, a partir de fibras arredondadas, núcleos volumosos e poucos achados como núcleo centralizado e necrose. Achados similares foram demonstrados em outros estudos, que apontam desorganização e adaptação do tecido provavelmente devido à perda no número de sarcômeros em série, causada pela imobilização (COUTINHO et al., 2004; GOMES et al., 2007). A imobilização gessada em ratas jovens desencadeou alterações patológicas no músculo sóleo como lesão tipo *central core*, *splitting* e núcleo centralizado e, ainda, essas foram mais expressivas quando comparadas ao músculo gastrocnêmio (SAKAKIMA et al., 2004). Em contrapartida, Kasper (1999) demonstrou que o músculo plantar não apresentou alterações histopatológicas evidentes após 28 dias de desuso através da suspensão caudal em ratas Wistar adultas.

Incremento do volume nuclear foi identificado nos animais imobilizados e aqueles imobilizados e alongados, quando comparados aos animais controle. Wang et al. (2006) observaram aumento de 30% do tamanho mionuclear de fibras do músculo sóleo de animais

submetidos à suspensão caudal por 16 dias. Paralelamente, esses animais também apresentaram redução no número de mionúcleos devido à diminuição da síntese proteica muscular.

Os animais alongados - GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ - apresentaram maior incidência de alterações do tipo histopatológicas, quando comparados aos animais do GI, visualizadas no músculo sóleo com quantidades expressivas de núcleo centralizado. O alongamento mantido por 40 minutos aplicado após o procedimento de imobilização, foi realizado de forma similar por Gomes et al. (2007) em ratos adultos. A frequência de 1 ou 3 vezes por semana de alongamento foi comparada e os autores encontraram alterações morfológicas mais pronunciadas no músculo sóleo do grupo imobilizado e no grupo imobilizado e alongado por 3 vezes na semana, durante 40 minutos. Eles apontam que a reatividade aumentada do músculo pode estar associada a um distúrbio de tumefação celular relacionado a processos de degeneração celular. O músculo sóleo de ratas adultas, submetidas à imobilização e alongamento, apresentou alterações morfológicas moderadas através de fibras em regeneração, núcleo centralizado, necrose hialina, halo basofílico e fibras lobuladas (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006). A alta intensidade da resposta muscular frente a diferentes intervenções no membro posterior do animal indica que o comprimento funcional muscular e a tensão imposta a ele são importantes para manter a massa e arquitetura muscular (GOMES et al., 2007).

Quantidades expressivas de núcleos centralizados foram demonstradas pelo músculo sóleo de animais alongados, em maior intensidade nos animais tratados por 10 dias. Miofibras regeneradas recentemente podem ser identificadas pela presença de núcleos centralizados, derivados de células satélites (OUSTANINA et al., 2004), que são células miogênicas precursoras residentes entre o sarcolema e a lâmina basal da miofibrila (KAWANO et al., 2008). Tem sido mostrado que essas células funcionam como fontes de novos mionúcleos durante o processo de regeneração após a lesão muscular e durante a sobrecarga funcional (WANG et al., 2006). E, ainda, o alongamento passivo das fibras musculares pode ser necessário para manter a ativação e proliferação das células satélites (WANG et al., 2006).

Animais jovens, submetidos ao procedimento de suspensão caudal por 16 dias, demonstraram redução do número médio de células satélites ativadas e quiescentes, e número de mionúcleos, quando comparados aos animais controle (WANG et al., 2006). Por outro lado, o período de 16 dias seguintes de sobrecarga com gravidade de 1G ou 2G foi capaz de reverter esses achados no músculo sóleo. As células satélites foram caracterizadas pela expressão de marcadores de genes característicos como a m-Caderina (fator de adesão de células quiescentes) e o BrdU (células com atividade mitótica) (OUSTANINA et al., 2004) nesse estudo (WANG et al., 2006). Portanto, o aumento no número e/ou função das células satélites, devido ao estímulo de sobrecarga, realiza importante papel na recuperação do número de mionúcleos e, conseqüentemente, restabelecimento do tamanho da fibra muscular (WANG et al., 2006).

O procedimento de imobilização em ratas bebês foi capaz de reduzir o diâmetro de todos os tipos de fibras no músculo sóleo e plantar. Da mesma forma, a imobilização gessada por 6 dias causou redução da área de secção transversa das fibras do músculo sóleo em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal de ratos (PICQUET et al., 1998). A imobilização gessada por 14 dias também foi capaz de reduzir o diâmetro de todas as fibras do músculo sóleo e gastrocnêmio de ratas muito jovens (SAKAKIMA et al., 2004) e adultas (POLIZELLO, 2009). Além disso, o procedimento de suspensão caudal foi capaz de reduzir a área de todas as fibras do músculo sóleo (CORNACHIONE, 2007; ITAI et al., 2004) e plantar, com exceção das FT2B no mesmo (KASPER, 1999). Dispositivo similar de imobilização usado no presente estudo foi utilizado em ratos adultos por 3 semanas e causou atrofia evidente de todos os tipos de fibras do sóleo, quando se comparou ao controle (GOMES et al., 2007). Os autores sugerem que a atrofia muscular esteja mais relacionada ao aumento dos mecanismos da proteólise do que à diminuição na síntese proteica.

Durante o processo de atrofia muscular, a proteólise pode ocorrer através de três sistemas principais: sistema calpaína (via cálcio-dependente), via catepsina e sistema ubiquitina-proteossoma. O sistema calpaína é modulado pela proteína calpastatina que facilita a quebra de moléculas proteicas posteriormente disponibilizadas para a ubiquitinação (proteólise miofibrilar). A via catepsina também é ativada durante a atrofia,

onde ocorre aumento de RNAm das isoformas de catepsina, protease responsável pela proteólise lisossomal com eliminação de proteínas e organelas celulares. O sistema ubiquitina-proteossoma não degrada as miofibrilas intactas e, assim, para exercer a sua função, torna-se dependente dessas outras vias. Esse sistema envolve três enzimas principais: E1 que ativa a ubiquitina, E2 com a função de transportá-la e conjugá-la e E3 que faz a ligação específica da ubiquitina. A atuação das três enzimas é fundamental para que ocorra a proteólise já que o proteossoma só conseguirá fazer a degradação proteica quando as proteínas estiverem poliubiquitinadas (KANDARIAN; JACKMAN, 2006).

O técnica de alongamento aplicado por 10 ou 21 dias pós-imobilização foi capaz de reverter a redução do diâmetro menor, quando comparado ao grupo somente imobilizado, mesmo que de forma parcial, sem alcançar os valores do controle. Achados similares foram observados por Gomes et al. (2007) com o alongamento mantido 3 vezes por semana, durante o período de imobilização no músculo sóleo. Por outro lado, esse mesmo estudo demonstrou que o alongamento realizado 1 vez por semana reduziu ainda mais a área das fibras, quando comparado ao grupo somente imobilizado. Em contrapartida, Mattiello-Sverzut et al. (2006) demonstraram que o alongamento manual por 10 dias consecutivos, sendo 10 séries de 15 segundos cada, não foi capaz de aumentar o diâmetro de nenhuma das fibras do músculo sóleo (FT1, FT2 e fibras tipo híbridas - FTH), quando comparado ao grupo somente imobilizado.

Okita et al. (2001) avaliaram o efeito do alongamento passivo pós-imobilização mantido por 30 minutos, realizado 6 vezes por semana durante 3 semanas, em ratos machos de 56 dias de idade. Observaram aumento do diâmetro das FT1 no músculo sóleo que foi imobilizado e alongado quando comparado ao músculo somente imobilizado. No presente estudo, a técnica de alongamento aplicada por 10 ou 21 dias também foi capaz de aumentar o diâmetro tanto das FT1 quanto das FT2C, FT2AC, FT2A, FTAD e FT2D no músculo sóleo quando comparado ao grupo imobilizado, atingindo os valores demonstrados pelo grupo controle somente para FT2C e FT2AC no GIAL₍₁₀₎ e FT2D no GIAL₍₂₁₎.

Foi observado que o músculo plantar respondeu muito bem ao procedimento de alongamento, onde todas as suas fibras, exceto as FT1, aumentaram satisfatoriamente seu diâmetro, quando comparadas ao grupo imobilizado e aos grupos controle.

Através da análise de proporção dos diferentes tipos de fibras, o músculo sóleo imobilizado apresentou redução significativa de FT1 e FT2AD, enquanto aumentou a proporção de FT2A e FT2C. Já o músculo plantar apresentou redução significativa de FT2A com aumento importante de FT2D, sendo que os demais tipos de fibra não apresentaram mudanças na sua proporção.

Sakakima et al. (2004) também observaram redução significativa de FT1 e aumento de FT2 em músculo sóleo de ratas com 70 dias de idade, imobilizadas com gesso por 14 dias. O mesmo período de imobilização gessada em ratas adultas não provocou alterações significativas na porcentagem entre os diferentes tipos de fibras do músculo sóleo e gastrocnêmio (porção lateral e medial), quando comparados ao grupo controle (CARVALHO, 2009; POLIZELLO, 2009; MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006). A imobilização aplicada com o mesmo dispositivo apresentado neste trabalho em ratos adultos por 21 dias não foi capaz de modificar a proporção entre os diferentes tipos de fibras do músculo sóleo (GOMES et al., 2007). A pouca idade demonstra ser um fator agravante na intensidade da adaptação entre os diferentes tipo de fibras, que pode contribuir para a transição entre elas.

A comparação entre a proporção dos diferentes tipos de fibras e a expressão da cadeia pesada de miosina revela que a imobilização provocou redução da expressão de MHCI e, ainda, induziu o aparecimento da MHCneonatal no músculo sóleo, sem alterar a expressão da MHCIIa. Assim, reforça-se a diminuição da representatividade das FT1 observada na análise de proporção e, também, o aumento da proporção de FT2C, que pode ter sido causado pelo aparecimento da MHCneonatal. A proximidade física entre as bandas que representam as isoformas de MHCIIa e MHCIIId no gel de poliacrilamida, como abordada anteriormente no Experimento 1, pode ter limitado sua avaliação e, conseqüentemente, a relação com a proporção desses tipos de fibras.

A mesma relação (proporção vs isoformas de MHC), quando feita para o músculo plantar imobilizado, apresenta aumento da expressão da MHCIIb e redução da expressão da MHCIId. Entretanto, a análise da proporção indicou redução da proporção de FT2A e aumento de FT2D, sem modificações da proporção dos demais tipos de fibras. O aumento da expressão MHCIIb pode ter sido causado pela manutenção de sua representatividade no músculo imobilizado, visto que seu maior diâmetro em relação às demais fibras pode favorecer maior conteúdo proteico expresso na banda avaliada. Por outro lado, a expressão da MHCIId (que também pode abranger a MHCIIa, como abordado anteriormente) pode ter sido reduzida preferencialmente pela diminuição do diâmetro das FT2D e FT2A, e respectivo conteúdo proteico, após o período de imobilização.

Picquet et al. (1998) observaram o desaparecimento da MHCneonatal e o surgimento da MHCIIb no músculo sóleo de animais bebês, previamente imobilizados por 6 dias, sendo que as expressões da MHCI e MHCIIa não foram afetadas. No presente estudo, não foi observada a presença da MHCIIb nos animais que sofreram imobilização. Supõe-se que os diferentes tempos de imobilização (6 e 10 dias) e/ou protocolos adotados (gesso vs modelo de imobilização) possam interferir nos achados dos estudos.

Adams et al. (2000) avaliaram o músculo sóleo de animais de 14 dias de idade, submetidos a voos espaciais. Eles apontam a redução significativa na expressão da MHCI, aumento importante da MHCIIa e MHCIId e pequena expressão de MHCIIb, quando comparado ao grupo controle. A MHCneonatal não foi expressa nos animais estudados. Situação de microgravidade, através de voos espaciais, não causaram modificações importantes na expressão de MHC no músculo plantar de animais com 14 dias de idade (ADAMS et al., 2000).

O procedimento de alongamento mantido, aplicado por 10 dias no músculo sóleo, modificou a proporção de todos os tipos de fibras, com exceção das FT1, que podem ter sido influenciadas pelo grande número de FT2C ainda presente nesse grupo. Em contrapartida, 21 dias de alongamento foram suficientes para modificar satisfatoriamente os valores de FT1, FT2C e FT2A, quando comparados ao GI. O aparecimento do subtipo de MHCneonatal no músculo sóleo ocorreu em ambos os grupos alongados GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎.

O período de 10 dias e 21 dias de alongamento pós-imobilização foram capazes de aumentar a expressão de MHCI, sendo que o aumento foi proporcional ao tempo de aplicação e confirma o aumento na quantidade de FT1 observado na análise de proporção.

No músculo plantar, o alongamento mantido aplicado por 10 ou 21 dias foi capaz de modificar, totalmente, somente a proporção de FT2A, sendo que os demais tipos comportaram-se de forma divergente entre GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ e não alcançaram os valores de referência do grupo controle. Por outro lado, a expressão das isoformas de miosina indicou que o GIAL₍₁₀₎ e GIAL₍₂₁₎ apresentaram expressões similares àquelas apresentadas pelo GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎, respectivamente. Sugere-se que o alongamento aplicado por 10 ou 21 dias conseguiu modificar o padrão de expressão das isoformas alteradas pelo procedimento de imobilização. Entretanto, o mesmo não ocorreu para a análise de proporção de FT2D e FT2B, que variou entre os grupos e não apresentou correlação com a análise de MHC.

A mesma técnica de alongamento mantido foi utilizada por Gomes et al. (2007) em ratos adultos, durante o período de imobilização. Eles não observaram nenhuma mudança na proporção entre os diferentes tipos de fibras do músculo sóleo. Ausência de alterações na proporção também foi demonstrado por Mattiello-Sverzut et al. (2006) em músculo sóleo de ratas adultas, submetidas ao alongamento intermitente pós-imobilização. Novamente, a idade dos animais pode ser um fator agravante para desencadear respostas intensas em relação à transição entre os tipos de fibras.

A expressão dos genes relacionados à MHC foi estudada por Loughnha et al. (1990) durante a imobilização na posição encurtada e alongada do músculo sóleo. O desuso através da imobilização por 5 dias na posição encurtada demonstrou não afetar a expressão do gene MHCI e IIa, o que contraria os achados para a MHCI neste trabalho. Entretanto, a imobilização em alongamento pelo mesmo período de tempo reduziu muito a expressão desses genes. A expressão do gene para MHCIIb foi fortemente induzida pelo desuso, enquanto o alongamento preveniu o surgimento desse gene no músculo sóleo. No entanto, o gene para MHCneonatal não foi observado em nenhum dos casos no músculo sóleo (LOUGHNHA et al., 1990). Na comparação com esse estudo, este trabalho não

observou o surgimento de MHCIIb durante a imobilização no músculo sóleo e sim da MHCneonatal e, ainda, o alongamento mantido não reduziu a expressão de MHCI e IIa como apresentado pelo estudo.

Baixos níveis de RNAm para MHC lento são observados para o músculo plantar sadio. Quando submetido à imobilização em encurtamento por 5 dias, a expressão dos genes MHCI e IIa foi reduzida a níveis indetectáveis pela metodologia de Loughnha et al. (1990). Em contrapartida, o desaparecimento da expressão desses genes foi prevenida pela imobilização em alongamento por 5 dias. A expressão do gene para MHCIIb no músculo plantar não foi modificada pelo desuso, enquanto o alongamento mantido reduziu-a dramaticamente. No músculo plantar não foi identificada a expressão do gene para MHCneonatal em ambas as situações, e os autores não avaliaram a expressão da MHCIIId. A grande variação na expressão dos genes, relacionados ao MHCI e MHCIIb em condições de desuso e alongamento, não foi similar à pequena variação observada neste trabalho para esses tipos de isoformas no músculo plantar.

Ressalta-se a escassez de estudos que abordam a técnica de alongamento e avaliam as adaptações das fibras musculares em ratos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.

A relação capilar/fibra (rC/F) sofreu redução significativa tanto no músculo sóleo quanto no músculo plantar, após o procedimento de imobilização aplicado aos animais bebês durante 10 dias. Em ratas adultas, o mesmo procedimento e período de imobilização provocou redução importante da rC/F somente no músculo sóleo, sendo que o mesmo não ocorreu para o músculo plantar (dados não publicados). A técnica de suspensão de membros posteriores por 21 dias também foi responsável pela queda na rC/F do músculo sóleo de ratas adultas, porém, não afetou a rC/F no músculo tibial anterior (CORNACHIONE, 2007). Observa-se diferença na resposta angiogênica do músculo plantar de animais em diferentes fases do desenvolvimento (infância vs fase adulta).

Kano et al. (2002) estudaram a capilarização durante o processo de envelhecimento em ratos Wistar. O número médio de capilares em contato com a fibra foi maior no músculo sóleo quando comparado ao plantar. No entanto, durante o envelhecimento, o aumento

do número médio de capilares ao redor da fibra foi maior no plantar quando comparado ao sóleo. Dessa forma, sugere-se que a angiogênese no músculo plantar de ratos mais velhos pode ser menos afetada pelo desuso quando comparados a animais jovens, visto que apresenta boa atividade nesse período de vida dos animais.

A técnica de alongamento mantido foi capaz de modificar parcialmente os prejuízos da imobilização sobre a rC/F no músculo sóleo, enquanto que, para o músculo plantar, o alongamento aplicado por 21 dias reverteu totalmente os valores da rC/F nesses animais. Brown and Hudlicka (2003) observaram que a resposta angiogênica pode ser dependente do tipo de fibra muscular predominante no músculo alvo do estudo. Fibras rápidas do músculo gastrocnêmio demonstraram crescimento capilar precoce em relação às fibras de contração lenta do sóleo de ratos jovens treinados. Portanto, pode-se sugerir que a resposta angiogênica do músculo plantar seja mais rápida do que aquela observada no músculo sóleo e, por isso, o músculo plantar demonstrou melhor adaptação durante o período de alongamento por 21 dias. Estudos que acompanham a angiogênese durante o alongamento muscular pós-desuso são escassos na literatura, principalmente quando se trata de animais de tenra idade.

A partir dos achados destacados no Experimento 2, pode-se constatar que o procedimento de imobilização foi efetivo para gerar modificações histopatológicas nos músculos sóleo e plantar como aumento da reatividade do tecido, mudança na população e no diâmetro das fibras, alteração do conteúdo proteico e perda capilar. O protocolo de alongamento empregado durante 10 e 21 dias incrementou a reatividade e as alterações histopatológicas observadas no músculo sóleo. Ao mesmo tempo, foi capaz de reverter os achados deletérios através do restabelecimento da proporção e diâmetro das fibras e dos valores da rC/F, em ambos os músculos. Maior tempo de aplicação do alongamento gerou adaptações musculares mais satisfatórias, que foram mais eficientes principalmente no músculo de contração rápida como o plantar.

5.3 EXPERIMENTO 3 – Treino excêntrico após desuso por imobilização

5.3.1 Resultados

5.3.1.1 Peso corporal

O peso corporal dos animais foi obtido como anteriormente descrito para os Experimentos 1 e 2. A Tabela 23 apresenta os valores médios do peso corporal inicial e final dos animais que foram somente imobilizados (GI), imobilizados e treinados excêntricamente por diferentes períodos (10 ou 21 dias - GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎) e seus respectivos grupos controle (GC_(Imob), GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎).

Tabela 23 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso inicial) e no dia do sacrifício (peso final), referentes ao Experimento 3. Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$)

GRUPOS	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
GC _(Imob)	51,6 ($\pm$ 2,4)	118 ($\pm$ 5,3)
GI	53,7 ($\pm$ 3,1)	77,8 ($\pm$ 5,3)*
GC ₍₁₀₎	57,3 ($\pm$ 3,5)	218,6 ($\pm$ 19,4)
GITE ₍₁₀₎	54,4 ($\pm$ 3,9)	158,9 ($\pm$ 10,4) ^o
GC ₍₂₁₎	54,1 ($\pm$ 3,4)	239,6 ($\pm$ 12,3)
GITE ₍₂₁₎	55 ($\pm$ 2,8)	241,2 ($\pm$ 11,7)

Tukey-Kramer - * $p < 0,01$ comparado com GC_(Imob); ^o $p < 0,01$ comparado com GC₍₁₀₎

Como demonstrado no Experimento 2, os animais do GI apresentaram atraso de seu crescimento corporal após o procedimento de imobilização por 10 dias, quando comparado aos valores demonstrados pelo grupo controle GC_(Imob) ($p < 0,01$).

No Experimento 3, o peso corporal dos animais do grupo GITE₍₁₀₎ não alcançaram os valores de referência apresentados pelo GC₍₁₀₎ ($p < 0,01$). Por outro lado, os animais do GITE₍₂₁₎ demonstraram valores similares àqueles demonstrados pelo GC₍₂₁₎ ($p > 0,05$).

5.3.1.2 Morfologia

A análise morfológica no Experimento 3 foi realizada da mesma forma como descrita no Experimento 1. As Tabelas abaixo são referentes às alterações histopatológicas encontradas nos músculos sóleo e plantar, respectivamente.

O treinamento excêntrico determinou alterações no músculo sóleo do GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎ expressas através de muitos achados morfológicos importantes e, em maior quantidade, quando comparados ao GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎. Destaca-se a grande quantidade de núcleos centralizados em ambos os grupos e grande número de halo basofílico no GITE₍₂₁₎ (Figura 12 e Tabela 24). O músculo sóleo de animais treinados apresentou-se reativo com fibras bem arredondadas e núcleo volumoso.

Tabela 24 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo sóleo, em número de fibras, referentes ao Experimento 3

Alterações	Grupos					
	GC _(Imob)	GI	GC ₍₁₀₎	GITE ₍₁₀₎	GC ₍₂₁₎	GITE ₍₂₁₎
Centralização nuclear	0,5 (±0,6)	6,5 (±6,7)	0	206,3 (±486,8)	4,3 (±3)	88,2 (±98)
Fibras lobuladas	0	0	0	1 (±2,4)	1,3 (±2,3)	0,3 (±0,8)
Degeneração/Necrose	0	5 (±3)	0	2,8 (±2,8)	0,3 (±0,6)	1,5 (±1,2)
Regeneração	0	0,5 (±1,2)	0	0	0,3 (±0,6)	0
<i>Splitting</i>	0	0	0	2,3 (±3,7)	0,3 (±0,6)	3 (±5,2)
Lesão tipo <i>Central Core</i>	0	0	0	0,7 (±0,8)	0	0
Halo basofílico	0	0	0	0	0	16 (±12,8)

O músculo plantar do GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎ não apresentou alterações adaptativas importantes frente ao treino excêntrico (Tabela 25). Os animais do GITE₍₁₀₎ apresentaram pouca reatividade com fibras arredondadas, de diferentes tamanhos e com núcleos volumosos (Figura 12). Os músculos do GITE₍₂₁₎ apresentaram núcleos de tamanhos normais e fibras levemente arredondadas de tamanhos variados (Figura 12).

Tabela 25 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo plantar, em número de fibras, referentes ao Experimento 3

Alterações	Grupos					
	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
Centralização nuclear	1,7 (±2)	1 (±2)	1 (±1)	1,3 (±1,5)	1,5 (±2,4)	0,7 (±0,8)
Fibras lobuladas	0	0,3 (±0,8)	0	0	0	0
Degeneração/Necrose	1,2 (±0,9)	7,8 (±5)	7 (±3)	4,5 (±1,4)	2 (±1,4)	4,3 (±2,2)
Regeneração	0	0,5 (±0,5)	0	0,2 (±0,4)	1 (±1,1)	0
<i>Splitting</i>	0,5 (±1)	0,7 (±0,8)	0	0	0	0,2 (±0,4)
Lesão tipo <i>Central Core</i>	0	0	0	0	0	0
Halo basofílico	4 (±1,8)	0,7 (±0,8)	9,7 (±3,8)	2,7 (±2,2)	2 (±2)	5,6 (±1,5)

Figura 12 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo (A-F) e plantar (G-M) do Experimento 3. A, G – GC_(Imob); B, H – GI; C, I – GC₍₁₀₎; D, J – GITE₍₁₀₎; E, L – GC₍₂₁₎; F, M – GITE₍₂₁₎. Observa-se a forma arredondada das fibras do GI que apresentam tamanho muito reduzido comparado ao GC_(Imob) (*). Grande quantidade de núcleos centralizados foi observada no músculo sóleo dos grupos treinados por 10 e 21 dias (seta). Barra: 60µm

5.3.1.3 Diâmetro menor das fibras

No GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎ o diâmetro menor de todas as fibras foi aumentado em relação ao GI (<0,0001), como mostra a Tabela 26. No GITE₍₁₀₎, somente o diâmetro das FT2C e FT2AC foram modificados totalmente, quando comparado ao GC₍₁₀₎. Por outro lado, no GITE₍₂₁₎ ocorreu aumento satisfatório do diâmetro de todos os tipos de fibra, exceto das FT1 (GITE₍₂₁₎ vs GC₍₂₁₎, p=0,02).

Tabela 26 - Valores médios do diâmetro menor (μm) e intervalos de confiança dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo do Experimento 3

Grupos Fibras	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
FT1	29,2 (26,9 – 31,4)	15 [•] (13,4 – 16,6)	36,9 (34,6 – 39,2)	24 [°] * (22,4 – 25,6)	37,9 (35,6 – 40,2)	34,7 [°] # (33,1 – 36,3)
FT2C	23,7 (20,8 – 26,5)	14,1 [•] (12,3 – 15,8)	25,9 (23 – 28,8)	23,1 [°] (21,4 – 24,8)	32,3 (29,3 – 35,2)	32,6 [°] (30,7 – 34,5)
FT2AC	23,8 (20,8 – 26,8)	13 [•] (11 – 15)	24,9 (20,9 – 28,8)	23,1 [°] (21,3 – 25)	35,8 (32,3 – 39,3)	34,8 [°] (32,8 – 36,7)
FT2A	26 (23,7 – 28,3)	15,1 [•] (13,5 – 16,7)	34 (31,7 – 36,3)	25,5 [°] * (23,9 – 27,1)	35,4 (33,1 – 37,8)	35,2 [°] (33,6 – 36,9)
FT2AD	25,9 (23,4 – 28,4)	14,6 [•] (12,2 – 17)	33,3 (30,4 – 36,2)	25,1 [°] * (23,3 – 26,9)	35,8 (32,9 – 38,6)	35,1 [°] (32,3 – 37,9)
FT2D	24,8 (21,9 – 27,6)	13,1 [•] (8,1 – 18)	31,2 (27,8 – 34,5)	24,4 [°] * (22,2 – 26,6)	36,1 (30,2 – 41,9)	35,6 [°] (33 – 38,3)

• p< 0,0001 quando comparado com GC_(Imob); ° p<0,0001 quando comparado com GI; * p< 0,0001 quando comparado com GC₍₁₀₎; # p<0,02 quando comparado com GC₍₂₁₎

No músculo plantar, o exercício excêntrico de 10 ou 21 dias aumentou o diâmetro de todas as fibras, quando comparado ao GI (p<0,0001), de acordo com a Tabela 27. Ambos os grupos treinados não modificaram totalmente o diâmetro menor das FT1, quando comparados ao GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎ (p<0,02; p=0,0002, respectivamente). Além disso, o diâmetro das FT2A não foi alterado satisfatoriamente no GITE₍₂₁₎.

Tabela 27 - Valores médios do diâmetro menor (μm) e intervalos de confiança dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar do Experimento 3

Grupos Fibras	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
FT1	27 (24,6 – 29,5)	14,7 [•] (13 – 16,4)	28,1 (25,7 – 30,5)	24,6 [°] * (22,9 – 26,3)	32,4 (30 – 34,8)	26,8 [°] # (25 – 28,6)
FT2C	19,3 (16,6 – 22)	13,5 [•] (10,2 – 16,9)	17,7 (12,7 – 22,8)	22,1 [°] (20,3 – 23,9)	25,8 (22,6 – 29,1)	23,3 [°] (21,3 – 25,3)
FT2A	19,5 (17,2 – 21,8)	14 [•] (12,4 – 15,7)	24 (21,7 – 26,3)	22,6 [°] (21 – 22,2)	28,8 (26,5 – 31,1)	25,4 [°] # (23,8 – 27)
FT2D	20,7 (18,4 – 22,9)	15,6 [•] (14 – 17,2)	28,4 (26,1 – 30,7)	25,9 [°] (24,3 – 27,5)	32,2 (30 – 34,5)	31,7 [°] (30,1 – 33,3)
FT2B	23,8 (21,4 – 26,1)	20,7 [•] (19,1 – 22,4)	29,8 (27,4 – 32,2)	30,3 [°] (28,6 – 32)	34,8 (32,4 – 37,2)	37,3 [°] (35,6 – 38,9)

• $p < 0,04$ quando comparado com GC_(Imob); ° $p < 0,0001$ quando comparado com GI; * $p < 0,02$ quando comparado com GC₍₁₀₎; # $p = 0,0002$ quando comparado com GC₍₂₁₎

5.3.1.4 Análise de proporção

A análise de proporção no Experimento 3 demonstra a variação entre a quantidade dos diferentes tipos de fibra do músculo sóleo e plantar frente à aplicação do exercício excêntrico, após período de desuso.

Como já descrito no Experimento 2, o músculo sóleo do GI teve redução significativa de FT1 ($p < 0,0001$) e FT2AD ($p = 0,001$), acompanhado de aumento na proporção de FT2A ($p < 0,0001$) e FT2C ($p = 0,0007$), quando comparado ao GC_(Imob).

O exercício excêntrico aplicado por 10 dias - GITE₍₁₀₎ – foi capaz de aumentar a quantidade de FT1, quando comparado ao GI ($p < 0,0001$), mas não alcançou os valores do GC₍₁₀₎ ($p < 0,0001$) (Figura 13). O número de FT2C se manteve alto como observado no GI. Por outro lado, proporção de FT2A no GITE₍₁₀₎ foi satisfatoriamente reduzida, alcançando os valores de GC₍₁₀₎. Houve também aumento significativo do número de FT2AD no GITE₍₁₀₎, que reverteu completamente ($p = 0,01$) a redução observada no GI (Figura 13). Similar aos achados apresentados no Experimento 2 para o grupo alongado, o exercício excêntrico aplicado durante 10 dias ainda apresentava grande quantidade de FT2C, como observado no GI.

Os músculos do GITE₍₂₁₎ modificaram satisfatoriamente os valores de FT1, FT2C e FT2A quando comparado aos do GI ($p<0,0001$; $p=0,03$; $p<0,0001$, respectivamente), alcançando os valores demonstrados no GC₍₂₁₎ (Figura 13). O número de FT2AD do GITE₍₂₁₎ continuou baixo como observado no GI.

Figura 13 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo nos grupos do Experimento 3

No músculo plantar (Figura 14), o número de FT2A no GITE₍₁₀₎ alcançou os valores de GC₍₁₀₎. Enquanto no GITE₍₂₁₎, a quantidade de FT2A foi parcialmente alterada, pois não atingiu os valores de GC₍₂₁₎.

A porcentagem de FT2D no GITE₍₁₀₎ foi reduzida em relação ao GI ($p=0,001$), porém, não alcançou a quantidade obtida no GC₍₁₀₎. Por outro lado, o GITE₍₂₁₎ modificou totalmente a porcentagem de FT2D.

A quantidade de FT2C sofreu aumento significativo com o treino de 10 e 21 dias quando comparada ao GI ($p<0,0001$; $p=0,008$, respectivamente), sendo que o aumento de FT2C observado no GITE₍₁₀₎ chegou a ultrapassar a quantidade do GC₍₁₀₎ ($p=0,0007$).

No GITE₍₁₀₎ houve redução expressiva do número de FT2B, tanto em relação ao GI ($p<0,0001$) quanto GC₍₁₀₎ ($p=0,003$). Mas, no GITE₍₂₁₎, o número de FT2B aumentou dramaticamente em relação ao GC₍₂₁₎ ($p<0,0001$) e GI ($p=0,008$). E, ainda, o GITE₍₂₁₎ apresentou diminuição importante da proporção de FT1, quando comparada ao GI ($p=0,008$) e ao GC₍₂₁₎ ($p=0,02$).

Figura 14 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar nos grupos do Experimento 3

5.3.1.5 Análise Semiquantitativa das isoformas de MHC

A análise e demonstração dos resultados referentes às isoformas de MHC foram realizadas como descrito para o Experimento 1. A análise semiquantitativa mostrou que os principais subtipos de MHC encontrados no músculo sóleo foram IIa, Neonatal e I (ilustração em ANEXO A). O GI apresentou redução da expressão da MHCI devido ao aparecimento da MHCneonatal, que também esteve presente no GITE₍₁₀₎ (Tabela 28). O treino excêntrico

aplicado por 10 ou 21 dias foi capaz de reduzir a expressão da MHC neonatal e aumentar a quantidade de MHCI no músculo sóleo, alcançando 55,5% no GITE₍₂₁₎.

Tabela 28 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses), correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo sóleo – Experimento 3

MHC \ Grupos	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
Embrionário	-	-	-	-	-	-
IIa	4 (44%)	2 (50%)	3 (60%)	4 (57%)	6 (60%)	4 (44%)
IIId	-	-	-	-	-	-
Neonatal	0	1 (25%)	0	1 (14%)	0	0
IIb	-	-	-	-	-	-
I	5 (56%)	1 (25%)	2 (40%)	2 (29%)	4 (40%)	5 (56%)

Classificação utilizada: 0 – banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

As isoformas de MHC IIId, IIb e I foram identificadas no músculo plantar dos grupos do Experimento 3, sendo que a MHCI teve expressão discreta em todos os grupos e o subtipo Neonatal não pôde ser identificado (ilustração em ANEXO A). O treino excêntrico por 10 e 21 dias apresentou redução discreta da expressão da MHCI no músculo plantar enquanto mostrou aumento da expressão da MHCIIId, quando comparado ao GI. A MHCIIb apresentou pequena redução nos animais treinados, quando comparados ao GI (Tabela 29).

Tabela 29 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses), correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo plantar – Experimento 3

Grupos MHC	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
Embrionário	-	-	-	-	-	-
Ila	-	-	-	-	-	-
IId	2 (43%)	2 (29%)	5 (42%)	4 (45%)	4 (45%)	5 (45%)
Neonatal	-	-	-	-	-	-
IIb	2 (43%)	4 (57%)	5 (42%)	4 (44%)	4 (44%)	5 (45%)
I	1 (14%)	1 (14%)	2 (16%)	1 (11%)	1 (11%)	1 (10%)

Classificação utilizada: 0 – banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

5.3.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)

Como já abordado no Experimento 2, os animais do GI apresentaram redução significativa da rC/F, quando comparados ao GC_(Imob) de mesma idade ($p < 0,0001$).

Pode-se observar através da Tabela 30, que o treinamento excêntrico durante 10 ou 21 dias foi capaz de aumentar a rC/F dos músculos sóleo e plantar de animais, quando comparados ao GI ($p < 0,0001$). Porém, o aumento da rC/F no músculo sóleo de animais treinados não alcançou os valores médios de referência demonstrados pelos grupos controle de mesma idade GC₍₁₀₎ e GC₍₂₁₎ ($p < 0,0002$). Em contrapartida, o músculo plantar de animais do GITE₍₂₁₎ apresentou aumento significativo da rC/F, ultrapassando o valor médio obtido pelo GC₍₂₁₎ ($p < 0,003$). O mesmo não foi observado para os animais do GITE₍₁₀₎ no músculo plantar.

O treinamento excêntrico aplicado por 10 ou 21 dias, portanto, modificou parcialmente os efeitos da imobilização sobre a rC/F no músculo sóleo. Enquanto que, para o músculo plantar, o treinamento aplicado por 21 dias incrementou de maneira satisfatória os valores da rC/F nesses animais.

Tabela 30 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) e intervalos de confiança do músculo sóleo e plantar dos grupos abordados no Experimento 3

Grupos Músculos						
	GC_(Imob)	GI	GC₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GC₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
Sóleo	1,62 (1,4 – 1,8)	0,71* (0,6 – 0,8)	2,14 (2 – 2,3)	1,27# • (1,1 – 1,4)	2,14 (2 – 2,3)	1,74# ° (1,6 – 1,9)
Plantar	1,0 (0,8 – 1,1)	0,52* (0,4 – 0,6)	1,14 (1 – 1,3)	0,94# • (0,8 – 1)	1,24 (1,1 – 1,4)	1,52# ° (1,4 – 1,6)

*p<0,0001 comparado com GC_(Imob); #p<0,0001 comparado com GI; • p<0,05 comparado com GC₍₁₀₎; °p<0,004 comparado com GC₍₂₁₎

5.3.2 Discussão

As alterações visualizadas no peso corporal dos animais submetidos ao protocolo de exercício excêntrico foram similares às aquelas observadas nos animais alongados. O peso corporal dos animais foi parcialmente modificado durante o período de 10 dias de reabilitação. Entretanto, animais submetidos a 21 dias de treino excêntrico apresentaram peso corporal equivalente àqueles observados no grupo controle.

O treinamento excêntrico foi capaz de provocar reorganização do músculo sóleo do GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎ que apresentaram achados morfológicos importantes, como grande quantidade de núcleos centralizados em ambos os grupos e grande número de halo basofílico no GITE₍₂₁₎. Destaca-se que o músculo sóleo de animais treinados ainda apresentava características de imaturidade do tecido muscular como fibras bem arredondadas e núcleo volumoso. Por outro lado, o músculo plantar não apresentou alterações adaptativas importantes ao treino excêntrico, sendo que GITE₍₂₁₎ já demonstrava núcleos de tamanhos normais e fibras levemente arredondadas de tamanhos variados. Dessa forma, pode-se observar que o músculo sóleo respondeu mais intensamente que o plantar ao protocolo de treino excêntrico, aplicado em animais recém-desmamados previamente imobilizados. Sakakima et al. (2004) aplicaram treino em esteira pós-imobilização gessada por diferentes frequências semanais em ratas jovens. Também foi

observado que o músculo sóleo de animais treinados apresentou maior quantidade de achados patológicos, quando comparado ao gastrocnêmio em todas as frequências de treino.

A partir na análise do diâmetro menor, a secção transversa de todas as fibras dos músculos sóleo e plantar foi aumentada em relação ao GI, tanto no GITE₍₁₀₎ quanto no GITE₍₂₁₎.

No músculo sóleo, o período de 10 dias modificou totalmente (comparado ao controle) o diâmetro das FT2C e FT2AC. Enquanto 21 dias de treinamento conseguiu restabelecer o diâmetro menor de todos os tipos de fibras, exceto das FT1.

No músculo plantar, ambos os grupos treinados foram capazes de alterar completamente, comparando-se com valores do controle, o diâmetro menor de todas as fibras, com exceção das FT1 em ambos e FT2A no GITE₍₂₁₎.

O mesmo protocolo de treino de corrida concêntrico e excêntrico por 21 dias foi realizado em ratas adultas, após período de suspensão caudal. O músculo sóleo desses animais restabeleceu totalmente o diâmetro menor das FT1, FT2A e FTHíbrida (CORNACHIONE, 2007). Sakakima et al. (2004) realizaram treino de corrida de baixa, média ou alta frequência por 6 semanas em ratas fêmeas jovens, após período de imobilização gessada. Todos os treinos foram capazes de aumentar a área das FT1 e FT2, porém, somente o treino de média e alta frequência alcançaram os valores obtidos no membro contralateral, tanto para o músculo sóleo quanto para o gastrocnêmio. Diferença entre a idade dos animais pode ser um importante fator que limitou as adaptações das FT1 no presente trabalho. Músculos jovens ou em desenvolvimento apresentam adaptações mais intensas em resposta à diminuição da atividade muscular quando comparadas aos adultos (GOLDSPINK, 1992) e, assim, podem precisar de maior tempo ou intensidade nos protocolos de reabilitação.

Treino de corrida foi aplicado em ratas adultas por 7, 14 ou 28 dias, que foram previamente suspensas pela cauda durante 28 dias. O músculo plantar apresentou aumento satisfatório da área de secção transversa das FT1, FT2A, FT2B e FT2C nos diferentes períodos de treino (KASPER, 1999).

A estimulação elétrica neuromuscular (EENM) foi aplicada no músculo sóleo, sendo 10 minutos por dia durante 10 dias, com o objetivo de reverter a atrofia pela imobilização de

ratas adultas (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2006). O diâmetro das fibras do músculo sóleo foi aumentado quando comparado ao grupo imobilizado, com exceção das FT1. Nesse caso, os autores sugerem que as FT2 sejam inicialmente recrutadas durante a EENM em músculos compostos por diferentes fibras e, assim, as FT2 possam responder melhor a essa técnica. Por outro lado, a EENM aplicada uma vez ao dia conseguiu restabelecer totalmente a área de secção das FT1 e FT2D da porção medial do gastrocnêmio, previamente imobilizado. Porém, quando esta mesma técnica foi realizada duas vezes ao dia, a área de secção não foi restabelecida para as FT1, FT2AD e FT2D (CARVALHO, 2009).

A análise de proporção demonstrou que no músculo sóleo e plantar, submetidos ao treino excêntrico, foram encontradas grandes quantidades de FT2C. A imobilização desencadeou esse aumento no músculo sóleo que não foi revertido pelo treino de 10 dias. No plantar, a imobilização não alterou a proporção de FT2C, enquanto a mesma foi aumentada após o treino por 10 ou 21 dias. Treino de corrida aplicado por 7 dias em ratas submetidas à suspensão caudal aumentou a proporção de FT2C e reduziu a proporção de FT1, no músculo plantar, em relação ao grupo suspenso (KASPER, 1999).

O músculo sóleo do GITE₍₁₀₎ não modificou completamente a proporção de FT1, que pode ter ocorrido devido à elevada quantidade de FT2C observada nesse grupo. Reforçando esses achados de proporção, a análise da isoforma de MHC indicou que a MHCneonatal ainda estava presente no GITE₍₁₀₎, juntamente com expressão pequena da MHCI como observado no GI.

Por outro lado, o período de 21 dias de reabilitação foi capaz de restabelecer satisfatoriamente a proporção de FT1 e FT2C no músculo sóleo que, de forma correspondente, apresentou importante expressão da MHCI e não mais expressava a MHCneonatal. Protocolo de treino excêntrico similar a esse estudo foi aplicado por 21 dias após período de suspensão caudal em ratas adultas (CORNACHIONE, 2007). A análise de proporção do músculo sóleo também mostrou restabelecimento da quantidade de FT1 e FT2C em relação ao grupo controle.

No presente trabalho, a proporção de FT2B e FT1 no músculo plantar não foram afetadas pela imobilização, sendo que, no treino de 10 dias, as FT2B sofreram redução

importante e no treino de 21 dias elas foram aumentadas dramaticamente. A análise das isoformas de MHC apontou que a expressão da MHCIIb alterou de forma pequena entre os grupos treinados, com aumento discreto somente no GI, o que não correspondeu à análise de proporção. Entretanto, as FT1 sofreram redução importante somente no GITE₍₂₁₎ e, de forma similar, esse apresentou a menor expressão da MHCI quando comparada aos demais grupos. A diferença entre as análises para quantificar a fibra tipo 2B pode ter ocorrido devido à variação na sua quantidade entre as diferentes regiões do músculo plantar. A análise de proporção foi obtida a partir da região profunda do fragmento muscular, caracterizada pelo perfil oxidativo-glicolítico. Por outro lado, na análise de isoformas de MHC, uma porção de todo o fragmento foi avaliado, incluindo a região superficial com perfil predominantemente glicolítico.

Kasper (1999) demonstrou que o procedimento de suspensão não afetou a proporção de FT2B e que a mesma não foi alterada posteriormente pelos períodos diferentes de treino (7, 14 ou 28 dias). Em relação às FT1, sua proporção foi levemente afetada pela suspensão e apresentou redução nos animais treinados.

Através da análise das diferentes isoformas de MHC, observou-se que o treino excêntrico aplicado por 10 ou 21 dias foi capaz de reduzir a expressão da MHCneonatal e aumentar a quantidade de MHCI no músculo sóleo, como abordado anteriormente junto com a análise de proporção. Sullivan et al. (1995) aplicaram treino de corrida 5 vezes por semana durante 8 semanas em ratas adultas. O músculo sóleo desses animais não apresentaram alterações na expressão de MHC, quando comparados a animais sedentários.

O aumento da expressão da MHCIIId e a redução da MHCIIb nos animais treinados excentricamente por 10 ou 21 dias também foram demonstrados por Sullivan et al. (1995) no músculo plantar de ratas adultas. A expressão da MHCI, que apresentou redução no GITE₍₁₀₎ e GITE₍₂₁₎, não foi alterada em animais adultos.

A escassez de estudos que avaliam o exercício em animais de pouca idade, através da expressão de isoformas de MHC, limitam a discussão dos dados apresentados aqui.

Tem sido documentado que vários fatores podem alterar a quantidade capilar no músculo esquelético, incluindo a fase de desenvolvimento do animal, o envelhecimento e

alterações no nível de atividade muscular como exercício físico ou desuso (KANO et al., 2002). A angiogênese no músculo esquelético em resposta ao exercício tem sido atribuída a estímulos metabólicos e/ou à presença de variedade de fatores de crescimento. Porém, não está identificado qual deles inicia ou mantém o crescimento capilar. Muitas situações no músculo esquelético, que exibem angiogênese, envolvem aumento do fluxo sanguíneo e muitas evidências apontam que o aumento do fluxo sanguíneo sozinho é suficiente para induzir o crescimento capilar (BROWN; HUDLICKA, 2003).

No presente estudo foi demonstrado que o treinamento excêntrico foi capaz de estimular a angiogênese nos músculos sóleo e plantar, após período de imobilização, sendo que o período de 10 dias não foi suficiente para restabelecer totalmente as alterações induzidas pela imobilização. A reabilitação realizada por 21 dias foi mais efetiva no aumento da capilarização, principalmente no músculo plantar que ultrapassou os valores de referência.

Gute et al. (1996) aplicaram treino de corrida em esteira com alta intensidade por 5 dias da semana, durante 14 semanas, em ratos adultos saudáveis. Eles observaram melhor resposta capilar do músculo gastrocnêmio ao treino de alta intensidade que demonstrou aumento significativo da rC/F em todas as suas porções. Por outro lado, o músculo sóleo treinado não apresentou diferença da rC/F em relação a animais sedentários.

O tempo necessário para ocorrer a angiogênese em resposta ao exercício pode variar de acordo com o predomínio do tipo de fibra no músculo alvo. Foi observado crescimento capilar precoce em fibras rápidas do gastrocnêmio quando comparado às fibras lentas do músculo sóleo de ratos jovens treinados (BROWN; HUDLICKA, 2003). O aumento da área de secção transversa da fibra em resposta ao exercício também pode induzir a angiogênese para evitar queda no desempenho muscular aeróbico (DEGENS et al., 2006). Dessa forma, a variação entre a resposta angiogênica dos músculos sóleo e plantar também pode ser explicada pela diferença de predomínio e tamanho entre os tipos de fibras, que indicará o perfil de contração muscular.

O estímulo angiogênico no músculo esquelético, ocorrido durante o exercício físico, pode ter origem na atividade de moléculas catalisadoras como as metaloproteinases

(MMPs). Essas enzimas estão localizadas na matriz extracelular e são reguladas por forças extravasculares, como estresse por sobrecarga e estimulação elétrica muscular. As MMPs também participam da liberação de fatores de crescimento como fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) e da migração de células endoteliais induzidas pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é um potente fator angiogênico com o único papel na indução da proliferação celular endotelial, migração e promoção do brotamento capilar. Também tem mostrado ser essencial para a proliferação capilar em condições de hipoxia e parece estar muito envolvido na angiogênese do músculo esquelético em resposta ao exercício (BROWN; HUDLICKA, 2003).

A partir das variáveis e grupos abordados no Experimento 3, observa-se que maior período de treino é necessário para alcançar respostas adaptativas mais satisfatórias, na busca para reverter as alterações desencadeadas pelo desuso. Intensa resposta regenerativa foi demonstrada pelo músculo sóleo após o treino excêntrico por 10 e 21 dias. E, ainda, corroborando com os achados da literatura científica, animais bebês devem precisar de maior tempo ou grau de estímulo, quando comparados a animais adultos e, principalmente, se tratando de músculos de contração lenta, para restabelecerem a função muscular acometida.

5.4 Análise comparativa dos protocolos: Alongamento mantido x treinamento excêntrico

5.4.1 Resultados

Nessa etapa foi realizada a análise estatística comparando-se as variáveis obtidas dos animais submetidos aos protocolos de reabilitação - alongamento X exercício excêntrico, já apresentadas separadamente nos experimentos anteriores.

5.4.1.1 Peso corporal

A Tabela 31 apresenta os valores médios do peso corporal inicial e final dos grupos de animais já apresentados nos Experimentos anteriores. A comparação dos achados de peso corporal entre os grupos submetidos ao alongamento mantido vs grupos submetidos ao treinamento excêntrico, que não apresentaram diferença significativa entre si.

Tabela 31 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) do peso corporal dos animais no início da criação (peso inicial) e no dia do sacrifício (peso final). Peso corporal final - ANOVA ($p < 0,05$)

GRUPOS	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
GIAL₍₁₀₎	52 ($\pm 4,2$)	163,7 ($\pm 14,2$)
GITE₍₁₀₎	54,4 ($\pm 3,9$)	158,9 ($\pm 10,4$)
GIAL₍₂₁₎	55,1 ($\pm 1,4$)	222,2 ($\pm 19,9$)
GITE₍₂₁₎	55 ($\pm 2,8$)	241,2 ($\pm 11,7$)

Observa-se que, no período de 10 dias de reabilitação, tanto para o alongamento quanto para o treino excêntrico, os animais ainda apresentavam atraso do crescimento, visualizado através do peso corporal reduzido. Entretanto, o período de 21 dias demonstrou que o peso dos animais havia normalizado de acordo com os dados obtidos no grupo controle, e se apresentou de maneira idêntica entre os grupos GITE₍₂₁₎ e GIAL₍₂₁₎.

5.4.1.2 Morfologia

A análise morfológica foi realizada da mesma forma como descrita no Experimento 1. As Tabelas 32 e 33 demonstram achados morfológicos dos músculo sóleo e plantar, respectivamente, para os grupos alongados e treinados excentricamente.

A partir da comparação entre os grupos tratados por 10 dias - GIAL₍₁₀₎ e GITE₍₁₀₎, observa-se grande número de núcleos centralizados no músculo sóleo, onde o grupo treinado apresentou quase o dobro do valor médio quando comparado ao grupo alongado (Figura 15). O músculo sóleo dos animais do GIAL₍₂₁₎ e GITE₍₂₁₎ apresentou valores aproximados de núcleos centralizados, sendo que maiores quantidades de halo basofílico foram observadas no GITE₍₂₁₎. Houve queda no número de núcleos centralizados entre o período de 10 e 21 dias, em ambos os grupos, alongados e treinados (Figura 15).

Tabela 32 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo sóleo, em número de fibras

Alterações	Grupos			
	GIAL ₍₁₀₎	GITE ₍₁₀₎	GIAL ₍₂₁₎	GITE ₍₂₁₎
Centralização nuclear	117,3 (±403,4)	206,3 (±486,8)	81,7 (±157,8)	88,2 (±98)
Fibras lobuladas	0,7 (±1,63)	1 (±2,4)	0	0,3 (±0,8)
Degeneração/Necrose	2,2 (±2,4)	2,8 (±2,8)	2,8 (±3,1)	1,5 (±1,2)
Regeneração	0,2 (±0,4)	0	0,8 (±0,7)	0
<i>Splitting</i>	0,2 (±0,4)	2,3 (±3,7)	0	3 (±5,2)
Lesão tipo <i>Central Core</i>	0	0	0	0
Halo basofílico	0,3 (±0,8)	0	4,3 (±5,7)	16 (±12,8)

As alterações identificadas para o músculo plantar não foram expressivas, seja de animais alongados ou treinados excentricamente, como mostram a Figura 15 e a Tabela 33.

Tabela 33 - Quantidade média e desvio padrão das alterações patológicas do músculo plantar, em número de fibras

Alterações	GIAL (10)	GITE (10)	GIAL (21)	GITE (21)
Centralização nuclear	2,3 ($\pm 2,9$)	1,3 ($\pm 1,5$)	3,7 ($\pm 0,8$)	0,7 ($\pm 0,8$)
Fibras lobuladas	0	0	0	0
Degeneração/Necrose	5,7 (± 5)	4,5 ($\pm 1,4$)	2,7 (± 2)	4,3 ($\pm 2,2$)
Regeneração	0,5 ($\pm 0,5$)	0,2 ($\pm 0,4$)	0,2 ($\pm 0,4$)	0
<i>Splitting</i>	0	0	0	0,2 ($\pm 0,4$)
Lesão tipo <i>Central Core</i>	0	0	0	0
Halo basofílico	4,2 ($\pm 2,3$)	2,7 ($\pm 2,2$)	8,5 ($\pm 5,2$)	5,6 ($\pm 1,5$)

Figura 15 - Reação de coloração Hematoxilina-Eosina para cortes transversais de fragmentos dos músculos sóleo (A-D) e plantar (E-H). A, E – GIAL₍₁₀₎; B, F – GITE₍₁₀₎; C, G – GIAL₍₂₁₎; D, H – GITE₍₂₁₎. Observa-se a forma arredondada das fibras dos grupos tratados por 10 dias (*) e grande quantidade de núcleo centralizado no músculo sóleo de todos os grupos (seta). Ressalta-se a maior reatividade do músculo sóleo quando comparado ao músculo plantar, principalmente nos animais tratados por 10 dias (A, E, B, F)) Barra: 60µm

5.4.1.3 Diâmetro menor

Ambas as técnicas de reabilitação, alongamento e exercício excêntrico, seja por 10 ou 21 dias, reverteram, ainda que parcialmente, a atrofia das fibras observada após o período de imobilização nos músculos sóleo (Tabela 18, página 86) e plantar (Tabela 19, página 87).

A comparação do diâmetro menor do músculo sóleo dos animais do GIAL₍₁₀₎ e GITE₍₁₀₎ não apresentou diferença estatística (Tabela 34).

No período de 21 dias de reabilitação, no entanto, os animais do GITE₍₂₁₎ apresentaram maiores valores do diâmetro menor de todos os tipos de fibras, exceto para a FT2D, quando comparado ao GIAL₍₂₁₎ (Tabela 34).

Tabela 34 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo

Fibras	Grupos			
	GIAL (10)	GITE (10)	GIAL (21)	GITE ₍₂₁₎
FT1	25,1 (23,5 – 26,7)	24 (22,4 – 25,6)	30,5 (28,9 – 32,1)	34,7° (33,1 – 36,3)
FT2C	22,7 (20,9 – 24,4)	23,1 (21,4 – 24,8)	26 (24,1 – 27,9)	32,6° (30,7 – 34,5)
FT2AC	24,8 (22,9 – 26,7)	23,1 (21,3 – 25)	26,4 (24,4 – 28,5)	34,8° (32,8 – 36,7)
FT2A	26,4 (24,7 – 28)	25,5 (23,9 – 27,1)	29,1 (27,4 – 30,7)	35,2° (33,6 – 36,9)
FT2AD	26,6 (24,8 – 28,4)	25,1 (23,3 – 26,9)	30,5 (28,5 – 32,5)	35,1° (32,3 – 37,9)
FT2D	27 (25 – 28,9)	24,4 (22,2 – 26,6)	32,2 (29,5 – 34,8)	35,6 (33 – 38,3)

° $p < 0,01$ quando comparado com GIAL₍₂₁₎

No músculo plantar, os animais do GITE₍₁₀₎ apresentaram maiores valores do diâmetro menor para as FT2D e FT2B, quando comparados aos animais do GIAL₍₁₀₎ ($p < 0,02$). Por outro lado, a comparação entre o diâmetro menor das fibras do músculo plantar do GITE₍₂₁₎ e GIAL₍₂₁₎ não apresentou diferença estatística.

Tabela 35 - Valores médios do diâmetro menor (μm) dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar

Grupos Fibras	GIAL (10)	GITE (10)	GIAL (21)	GITE(21)
FT1	23,3 (21,6 - 25)	24,6 (22,9 - 26,3)	28,3 (26,6 - 29,9)	26,8 (25 - 28,6)
FT2C	19,9 (18 - 21,8)	22,1 (20,3 - 23,9)	24,2 (21,6 - 26,8)	23,3 (21,3 - 25,3)
FT2A	21,2 (19,5 - 22,8)	22,6 (21 - 22,2)	26,4 (24,8 - 28)	25,4 (23,8 - 27)
FT2D	23,3 (21,7 - 24,9)	25,9* (24,3 - 27,5)	30,8 (29,2 - 32,4)	31,7 (30,1 - 33,3)
FT2B	27 (25,3 - 28,7)	30,3* (28,6 - 32)	36,3 (34,6 - 37,9)	37,3 (35,6 - 38,9)

* $p < 0,02$ quando comparado com GIAL₍₁₀₎

5.4.1.4 Análise de proporção

Nesse item, a comparação entre os protocolos de reabilitação adotados pós-imobilização foi avaliada através da proporção entre os diferentes tipos de fibras do músculo sóleo e plantar.

A análise da proporção do músculo sóleo de animais tratados por 10 dias, seja pelo alongamento ou exercício excêntrico, não apresentou diferença estatística dentre os tipos de fibra. Da mesma forma, a comparação entre os grupo tratados por 21 dias demonstrou proporções idênticas de todos os tipos de fibras do músculo sóleo (Figura 16).

Figura 16 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo

No músculo plantar, o período de 10 dias de reabilitação apresentou diferença somente na proporção das FT2D, em maior quantidade no GIAL₍₁₀₎ e, FT2C, em maior quantidade no GITE₍₁₀₎ (Figura 17).

A comparação entre as técnicas aplicadas por 21 dias - GIAL₍₂₁₎ e GITE₍₂₁₎ - demonstrou maior quantidade de FT1 no GIAL₍₂₁₎ e maior quantidade de FT2D no GITE₍₂₁₎ (Figura 17).

Figura 17 - Porcentagens médias dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar

5.4.1.5 Análise semiquantitativa das isoformas de MHC

Os resultados são apresentados a seguir, conforme descrição já abordada para o Experimento 1. A comparação entre GIAL₍₁₀₎ e GITE₍₁₀₎ demonstra que a expressão da MHCIIa, MHCneonatal e MHCI no músculo sóleo foram similares entre os grupos. A reabilitação aplicada por 21 dias no GIAL₍₂₁₎ e GITE₍₂₁₎ intensificou as modificações observadas no GIAL₍₁₀₎ e GITE₍₁₀₎, levando ao predomínio da MHCI, redução da expressão da MHCIIa e ausência da MHCneonatal no GITE₍₂₁₎ (Tabela 36).

Tabela 36 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses), correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo sóleo

Grupos MHC	GIAL₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GIAL₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
Embrionário	-	-	-	-
Ila	4 (50%)	4 (57%)	4 (40%)	4 (44%)
Ild	-	-	-	-
Neonatal	1 (12%)	1 (14%)	1 (10%)	0
IIb	-	-	-	-
I	3 (38%)	2 (29%)	5 (50%)	5 (56%)

Classificação utilizada: 0 – banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

Para o músculo plantar, a comparação entre GIAL₍₁₀₎ e GITE₍₁₀₎ também demonstrou características idênticas para a expressão das 3 isoformas encontradas. Além disso, a reabilitação por 21 dias - GIAL₍₂₁₎ e GITE₍₂₁₎ - apresentou expressões equivalentes para a MHCIIa e MHCIIb, porém, o GITE₍₂₁₎ demonstrou menor expressão da MHCI (Tabela 37).

Tabela 37 - Análise semiquantitativa das MHCs em número absoluto e valores percentuais (entre parênteses), correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo do músculo plantar

Grupos MHC	GIAL₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GIAL₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
Embrionário	-	-	-	-
Ila	-	-	-	-
Ild	4 (45%)	4 (45%)	5 (42%)	5 (45%)
Neonatal	-	-	-	-
IIb	4 (44%)	4 (44%)	5 (42%)	5 (45%)
I	1 (11%)	1 (11%)	2 (16%)	1 (10%)

Classificação utilizada: 0 – banda não identificada macroscopicamente; 1 – banda muito estreita; 2 – banda estreita; 3 – banda moderada; 4 – banda espessa; 5 – banda muito espessa

5.4.1.6 Relação capilar/fibra (rC/F)

As respostas adaptativas da rC/F demonstraram que o período de 10 dias de reabilitação desencadeou estímulo angiogênico levemente maior nos animais treinados excentricamente, porém sem diferença estatística em relação aos animais alongados. Entretanto, 21 dias de treino excêntrico foi capaz de produzir maior resposta angiogênica nos músculos sóleo e plantar ($p < 0,004$ e $p < 0,0008$, respectivamente) quando comparado à aplicação do alongamento pelo mesmo período.

Tabela 38 - Valores médios da relação capilar/fibra (rC/F) e intervalos de confiança do músculo sóleo e plantar

Grupos Músculos	GIAL₍₁₀₎	GITE₍₁₀₎	GIAL₍₂₁₎	GITE₍₂₁₎
Sóleo	1,16 (1 – 1,3)	1,27 (1,1 – 1,4)	1,5 (1,4 – 1,6)	1,74 [#] (1,6 – 1,9)
Plantar	0,88 (0,8 – 1)	0,94 (0,8 – 1)	1,26 (1,1 – 1,4)	1,52 [#] (1,4 – 1,6)

[#] $p < 0,004$ quando comparado com GIAL₍₂₁₎

5.4.2 Discussão

A comparação entre as diferentes técnicas de reabilitação, através dos achados de peso corporal, demonstra que, em ambas as técnicas, o período de 10 dias de reabilitação não foi suficiente para que os animais atingissem o peso corporal obtido nos animais do GC₍₁₀₎. Entretanto, ao final do protocolo de 21 dias o peso dos animais já se apresentava equivalente aos valores obtidos no GC₍₂₁₎. Portanto, o atraso no crescimento dos animais, ocorrido no período de imobilização, pode necessitar de tempo maior que 10 dias para alcançar níveis normais, e que o tipo de protocolo de reabilitação adotado não interfere nessa variável.

O período de 10 dias de reabilitação desencadeou intensa resposta regenerativa no músculo sóleo, através da presença de grande quantidade de núcleo centralizado e alta

reatividade do tecido. O treino excêntrico foi responsável por intensificar esses achados, onde o GITE₍₁₀₎ apresentou maiores valores de núcleo centralizado quando comparado ao GIAL₍₁₀₎. A grande quantidade de núcleos centralizados pode caracterizar um estágio de adaptação muscular nesse período de tempo em resposta à reabilitação. E, ainda, o resgate da função, característica típica do exercício físico, pode favorecer a presença de maiores alterações durante a fase inicial da resposta do tecido muscular, quando comparado ao alongamento, recurso de aplicação passiva.

O músculo sóleo dos animais do GIAL₍₂₁₎ e GITE₍₂₁₎ também apresentaram grande quantidade de núcleos centralizados, porém, em menor quantidade, quando comparados aos grupos de 10 dias. Supõe-se que maior tempo de treinamento possa permitir a adaptação frente ao estímulo do exercício excêntrico, através da finalização do processo de reparação muscular (SAKAKIMA et al., 2004).

No músculo plantar não foram identificadas alterações importantes, seja de animais alongados ou treinados excentricamente.

Os animais submetidos às técnicas de reabilitação alongamento e exercício excêntrico, aplicadas por 10 dias, apresentaram valores similares de diâmetro menor nos músculos sóleo e plantar. Ressalta-se, no entanto, que o treino excêntrico por 21 dias provocou intenso estímulo hipertrófico no músculo sóleo, já que as fibras do GITE₍₂₁₎ foram significativamente maiores quando comparadas ao GIAL₍₂₁₎. Acredita-se que a atividade neuromuscular funcional presente no exercício excêntrico seja o diferencial para maior hipertrofia observada no músculo sóleo (ARMSTRONG, OGILVIE, SCHWANE, 1983; TAKEKURA et al., 2001). Já no músculo plantar, o diâmetro menor dos diferentes tipos de fibras foram muito similares entre os animais submetidos ao alongamento e ao treino excêntrico, quando aplicados 21 dias.

Diferenças na característica contrátil e na proporção das fibras encontradas no músculo alvo podem interferir no perfil muscular e, conseqüentemente, na sua resposta frente ao desuso e ao tipo/intensidade dos protocolos de reabilitação. Escassos estudos confrontam esses métodos de reabilitação em músculos com a mesma função e características contráteis distintas.

O músculo plantar restabeleceu sua secção transversa de forma satisfatória após treino em esteira de 7, 14 ou 28 dias após a suspensão caudal (KASPER, 1999). Por outro lado, para restabelecer a área de secção transversa das fibras do músculo sóleo imobilizado foram necessários treinos de média e alta frequência, quando comparados à livre movimentação e baixa frequência (SAKAKIMA et al., 2004). Sugere-se que maior tempo e intensidade de estímulo sejam dados aos músculos com predomínio de fibras de contração lenta, que parecem ter maior dificuldade para restabelecer as alterações provocadas pelo desuso.

A proporção de cada tipo de fibra e expressão de MHC nos grupos tratados por 10 dias (GIAL₍₁₀₎ e GITE₍₁₀₎) apresentaram valores muito similares. Nos grupos de 21 dias de reabilitação - GIAL₍₂₁₎ e GITE₍₂₁₎ - também houve similaridade entre os dados de proporção das fibras e entre os achados das isoformas de MHC. Sob o ponto de vista da análise de proporção e isoformas de MHC, o alongamento e o exercício excêntrico desencadearam respostas muito similares entre si no músculo sóleo, de acordo com o período de aplicação de 10 ou 21 dias.

No músculo plantar, o período de 10 dias de reabilitação atuou de maneira muito similar entre os tipos de fibra nos grupos alongado e treinado, exceto para as FT2D e FT2C. Nesse caso, sugere-se que o treino excêntrico de 10 dias pode ter possibilitado a transição de FT2D em direção às FT2C, visto sua grande quantidade. A análise das isoformas de MHC também demonstra grande semelhança entre a expressão dos diferentes tipos de MHC, visualizada entre as técnicas aplicadas por 10 dias .

A reabilitação no músculo plantar aplicada no período de 21 dias demonstrou respostas parecidas entre o alongamento e exercício excêntrico, exceto para as FT2D e FT1. O treino excêntrico de 21 dias pode ter induzido a transição de FT1 em direção à FT2D, que apresentou maior proporção. Novamente, a expressão das isoformas de MHC confirmam esses achados, visto que o GITE₍₂₁₎ apresentou menor expressão de MHCI e maior de MHCIIa em relação ao GIAL₍₂₁₎. Não foram encontrados estudos que comparam períodos e técnicas diferentes de reabilitação através das diferentes isoformas de MHC.

A capilarização dos músculos sóleo e plantar ocorre de forma diferente, onde maior quantidade capilar é observada no músculo sóleo, porém a resposta angiogênica aos protocolos de reabilitação parece ser mais eficiente no músculo plantar.

Diferença encontrada na atividade metabólica, e consequente consumo de O₂, entre os diferentes tipos de fibras, pode ser responsável pela diferença na quantidade capilar observada entre elas. Durante o desenvolvimento muscular foi observado que o remodelamento do potencial angiogênico provocou crescimento capilar preferencialmente ao redor de fibras glicolíticas (DEGENS et al., 2006). Kano et al. (2002) demonstraram a capilarização durante o processo de envelhecimento em ratos Wistar. O número médio de capilares em contato com a fibra foi maior no músculo sóleo, quando comparado ao plantar. No entanto, durante o envelhecimento o aumento do número médio de capilares ao redor da fibra foi maior no plantar quando comparado ao sóleo. Sugere-se que, para o mesmo período de tempo e estímulo aplicado nos músculos sóleo e plantar, haja maior resposta angiogênica do plantar para corresponder à sua demanda funcional com perfil glicolítico.

A comparação entre as técnicas de reabilitação demonstrou que o exercício excêntrico aplicado por 21 dias foi responsável por maiores valores da rC/F quando comparado ao grupo alongado por 21 dias nos músculos sóleo e plantar. O aumento do número de capilares está intimamente relacionado à manutenção de adequada oxigenação do tecido para permitir a *performance* muscular ideal (DEGENS et al., 2006; KANO et al., 2002; RIPELL; SILLAU BANCHERO, 1979). A pressão de oxigênio local (PO₂) local regula a resposta angiogênica do tecido local. Deveci et al. (2001) demonstraram que animais colocados em situação de hipóxia apresentaram aumento da rC/F dos músculos sóleo e diafragma. Acredita-se que o exercício excêntrico, através do treino de corrida em declive, possa requerer maior aporte sanguíneo devido ao consumo aumentado de oxigênio das fibras musculares. Assim, a exigência metabólica dada pelo exercício pode ser maior do que aquela observada no alongamento mantido e seria a responsável pelo maior estímulo angiogênico no tecido muscular.

Portanto, a análise comparativa dos protocolos de alongamento e exercício excêntrico foi realizada de acordo com o tempo em que foram aplicados. O exercício excêntrico parece induzir respostas hipertróficas e angiogênicas mais intensas que o protocolo de alongamento, principalmente quando realizado por períodos mais longos de tempo. Músculos de contração lenta, como o sóleo, respondem com maior resposta regenerativa quando comparado ao músculo plantar.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento muscular normal de animais em fase pós-natal e de desmame foi acompanhado por adaptações que correspondem ao aumento da demanda funcional própria dessa fase do desenvolvimento. As características morfológicas do tecido indicaram imaturidade muscular que foi sendo minimizada com o avançar da idade. O ganho de peso progressivo dos animais foi acompanhado pelo aumento no diâmetro das fibras e no número de capilares dos músculos sóleo e plantar. O músculo sóleo já apresentava características encontradas na fase adulta, enquanto o plantar demonstrou estar em fase de adaptação para definir seu perfil glicolítico, visualizada através da análise de proporção e das isoformas de MHC.

O procedimento de imobilização foi eficaz para promover o desuso do membro posterior de animais bebês e consequente encurtamento dos músculos sóleo e plantar. O baixo peso dos animais foi acompanhado pela alta reatividade dos músculos que apresentaram atrofia de todos os tipos de fibra e redução do número de capilares. Alterações na proporção de fibras e isoformas de MHC, com destaque para o aparecimento da MHCneonatal, ocorreram caracteristicamente nessa fase do desenvolvimento pós-natal.

Alterações histopatológicas, mudança na proporção e diâmetro das fibras e incremento da resposta angiogênica foram observados nos músculos sóleo e plantar, submetidos às técnicas de reabilitação. O exercício excêntrico foi capaz de intensificar as respostas hipertrófica e angiogênica, principalmente após a reabilitação por 21 dias, quando comparado ao alongamento.

O músculo plantar demonstrou resposta adaptativa mais rápida, frente aos protocolos adotados, em relação ao sóleo. No entanto, o músculo sóleo parece responder em maior grau e intensidade para o processo de regeneração muscular, visto os achados morfológicos do tecido. E, ainda, maior tempo de aplicação das técnicas de reabilitação foi o diferencial para a resposta adaptativa muscular ser mais efetiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. R.; HADDAD, F.; MCCUE, S. A.; BODELL, P. W.; ZENG, M.; QIN, L.; QIN, A. X.; BALDWIN, K. M. Effects of spaceflight and thyroid deficiency on rat hindlimb development. II. Expression of MHC isoforms. **Journal of applied physiology**, Washington, v. 88, n. 3, p. 904-16, 2000.

AGBULUT, O.; NOIREZ, P.; BEAUMONT, F.; BUTLER-BROWNE, G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. **Biology of the Cell**, Colchester, v. 95, n. 6, p. 399-406, 2003.

ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **Journal applied of physiology**, Washington, v. 54, n. 1, p. 80-93, 1983.

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L. & SANTOS, A.S. BioEstat 4.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 4.ed. Belém-PA, 2005.

BÄR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 235, n. 1-2, p. 153-5, 1988.

BENEDINI-ELIAS, P. C.; MORGAN, M. C.; GOMES, A. R.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Changes in postnatal skeletal muscle development induced by alternative immobilization model in female rat. **Anatomical Science International**, Carlton, v. 84, n. 3, p. 218-25, 2009.

BOOTH, F. W.; KELSO, J. R. Production of rat muscle atrophy by cast fixation. **Journal applied of physiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 404-406, 1973.

BROWN, M. D. & HUDLICKA, O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. **Angiogenesis**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2003.

CAPETANAKI, Y.; BLOCH, R. J.; KOULOUMENTA, A.; MAVROIDIS, M.; PSARRAS, S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. **Experimental Cell Research**. New York, v. 313, n. 10, p. 2063-76, 2007.

CARVALHO, L. C. **Alongamento passivo manual associado à estimulação elétrica neuromuscular no músculo gastrocnêmio Pós-Imobilização. Estudo biomecânico e histomorfométrico em ratas**. 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

CLARK, K. A.; MCELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. C.; GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual review of cell and developmental biology**. Palo Alto, v. 18, p. 637-706, 2002.

CORNACHIONE, A. **Efeitos morfológicos da remobilização muscular avaliados sob diferentes protocolos de treinamento em esteira após suspensão dos membros posteriores de ratas.** 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

CORNACHIONE, A.; CAÇÃO-BENEDINI, L. O.; SHIMANO, M.; VOLPON, J. B.; MARTINEZ, E. Z.; NEDER, L.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in female rats after hindlimb suspension. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, Copenhagen, v.18, n. 4, p. 453-61, 2008.

COUTINHO, E. L.; DELUCA, C.; SALVINI, T. F. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. **Connective Tissue Research**, London, v. 47, n. 5, p. 278-86, 2006.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n. 12, p. 1853-61, 2004.

COUTINHO, E. L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. A new model for the immobilization of the rat hindlimb. **Brazilian journal of medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 1329-32, 2002.

D'ALBIS, A.; CHANOINE, C.; JANMOT, C.; MIRA, J. C.; COUTEAUX, R. Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. **European journal of biochemistry**, Oxford, v. 193, n. 1, p. 155-61, 1990.

DEGENS, H.; DEVECI, D.; BOTTO-VAN BEMDEN, A.; HOOFD, L. J. C.; EGGINTON S. Maintenance of heterogeneity of capillary spacing is essential for adequate oxygenation in the soleus muscle of the growing rat. **Microcirculation**, London, v.13, n. 6, p. 467-76, 2006.

DEVECI, D.; MARSHALL, J. M.; EGGINTON, S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, Bethesda, v. 281, n. 1, p. 241-52, 2001.

DI MASO, N. A.; CAIOZZO, V. J.; BALDWIN, K. M. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, Bethesda, v. 278, n. 4, p.1099-106, 2000.

EHMSEN, J.; POON, E.; DAVIES K. The dystrophin-associated protein complex. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 115, p. 2801-2803, 2002.

FITZSIMONS, D.; DIFFE, G.; HERRICK, R.; BALDWIN, K. Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast and slow-twitch skeletal muscle. **Journal applied of physiology**, Bethesda, v. 68, n. 5, p. 1950-55, 1990.

FRATACCI, M. D.; LEVAME, M.; RAUSS, A.; ATLAN, G. Rat diaphragm during postnatal development . II. Resistance to low- and high-frequency fatigue. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 8, n. 3, p. 399-407, 1996.

GOLDSPINK, G.; SCUTT, A.; LOUGHNHA, P. T.; WELLS, D. J.; JAENICKE, T.; GERLACH, G. F. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. **The American journal of physiology**, Washington, v. 262, p. 356-63, 1992.

GOLDSPINK, G. Cellular and molecular aspects of muscle growth, adaptation and ageing. **Gerodontology**, Oxford, v. 15, n. 1, p.35-43, 1998.

GOMES, A. R. S.; CORNACHIONE, A.; SALVINI, T. F.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **Journal of Anatomy**, Oxford, v. 210, n. 3, p. 328-35, 2007.

GOMES, A. R. S.; COUTINHO, E. L.; FRANÇA, C. N.; SALVINI, T. F. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n. 10, p. 1473-80, 2004.

GUTE, D.; FRAGA, C.; LAUGHLIN, M. H.; AMANN, J. F. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. **Journal applied of physiology**, Bethesda, v. 81, n. 2, p. 619-26, 1996.

HAYWARD, R.; FERRINGTON, D. A.; KOCHANOWSKI, L. A.; MILLER, L. M.; JAWORSKY, G. M.; SCHNEIDER, C. M. Effects of dietary protein on enzyme activity following exercise-induced muscle injury. **Medicine science of sports exercise**, Madison, v. 31, n. 3, p. 414-20, 1999.

IANUZZO, C. D.; BLANK, S.; CRASSWELLER, A.; SPALDING, J.; HAMILTON, N.; DABROWSKI, B.; ROOKS, N. Effect of hindlimb immobilization and recovery on compensatory hypertrophied rat plantaris muscle. **Molecular and cellular biochemistry**, The Hague, v. 90, n. 1, p. 57-68, 1989.

ISHIHARA, A.; TAGUCHI, S. Histochemical differentiation of fibers in the rat slow and fast twitch muscles. **Japanese Journal of Physiology**, Tokyo, v. 41, n. 2, p. 251-58, 1991.

ITAI, Y.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Morphological changes in rat hindlimb muscle fibres during recovery from disuse atrophy. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 181, n. 2, p. 217-24, 2004.

IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. **Science**, Washington, v. 231, n. 45, p. 597-600, 1986.

JANSEN J.K., FLADBY T. The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. **Progress in neurobiology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 39-90, 1990.

KANDARIAN, S. C.; JACKMAN, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle & Nerve**, New York, v. 33, n. 2, p. 155-65, 2006.

KANO, Y.; SHIMEGI, S.; FURUKAWA, H.; MATSUDO, H.; MIZUTA, T. Effects of aging on capillary number and luminal size in rat soleus and plantaris muscles. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, Washington, v. 57, n. 12, p.422-7, 2002.

KANNUS, P.; JOZSA, L. M.; KVIST, M.; VIENO, T.; JARVINEN, T. L.; NATRI, A.; JARVINEN, M. Free mobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **Journal of applied physiology**, Washington, v. 84, n. 4, p.1418-1424, 1998.

KASPER, C. E. Recovery of plantaris muscle from impaired physical mobility. **Biological research for nursing**, Thousand Oaks, v. 1, n. 1, p. 4-11, 1999.

KASPER, C. E.; MCNULTY, A. L.; OTTO, A. J.; THOMAS D. P. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: an empirical model. **Research in nursing & health**, New York, v. 16, n. 4, p. 265-73, 1993.

KAWANO, F.; TAKENO, Y.; NAKAI, N.; HIGO, Y.; TERADA, M.; OHIRA, T.; NONAKA, I.; OHIRA, Y. Essential role of satellite cells in the growth of rat soleus muscle fibers. **American journal of physiology. Cell physiology**, Bethesda, v. 295, n. 2, p. 458-67, 2008.

KJÆR, M.; KROGSGAARD, M.; MAGNUSSON, P.; ENGBRETSSEN, L.; ROOS, H.; TAKALA, T.; WOO, S. L-Y. Textbook of sports medicine. Basic science and clinical aspects of sports injury and physical activity. 1.ed. Oxford: Blackwell Science LTD, 2003.

KOMULAINEN, J.; TAKALA, T. E.; KUIPERS, H.; HESSELINK, M. K. The disruption of myofibre structures in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions. **Pflügers Archiv: European journal of physiology**, Berlin, v. 436, n. 5, p.735-41, 1998.

LEVITSKY, D. I. Actomyosin systems of biological motility. **Biochemistry**, Washington, v. 69, n. 11, p.1177-1189, 2004.

LLOYD, J. S.; BROZANSKI, B. S.; DAOOD, M.; WATCHKO, J. F. Developmental transitions in the myosin heavy chain phenotype of human respiratory muscle. **Biology of the neonate**, New York, v. 69, n. 2, p. 67-75, 1996.

LOITZ, B. J.; ZERNICKE, R. F.; VAILAS, A. C.; KODY, M. H.; MEALS, R. A. Effects of short-term immobilization versus continuous passive motion on the biomechanical and biochemical properties of the rabbit tendon. **Clinical orthopaedics and related research**, New York, v. 244, n. 6, p. 265-71, 1989.

LOUGHNHA, P. T.; IZUMO, S.; GOLDSPIK, G.; NADAL-GINARD, B. Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adult contractile protein genes in skeletal muscle. **Development**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 217-23, 1990.

LYNN, R.; MORGAN, D. L. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. **Journal applied of physiology**, Washington, v. 77, n. 3, p. 1439-44, 1994.

MATTIELLO-SVERZUT, A.C.; CARVALHO, L. C.; CORNACHIONE, A.; NAGASHIMA, M.; NEDER, L.; SHIMANO, A. C. Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 21, n. 9, p. 957-64, 2006.

MAYHEW, T. P.; ROTHSTEIN, J. M.; FINUCANE, S. D.; LAMB, R. B. Muscular adaptation to concentric and eccentric exercise at equal power levels. **Medicine Science of Sports Exercise**, Madison, v. 27, n. 6, p. 868-73, 1995.

McCLUNG, J. M.; THOMPSON, R. W.; LOWE, L. L.; CARSON, J. A. RhoA expression during recovery from skeletal muscle disuse. **Journal applied of physiology**, Washington, v.96, n. 4, p.1341-48, 2004.

MELICHNA, J.; MACKOVA, E. V.; SEMIGINOVSKY, B.; TOLAR, M.; STICHOVA, J.; SLAVICEK, A. et al. Effect of exercise on muscle fibre composition and enzyme activities of skeletal muscles in young rats. **Physiologia Bohemoslovaca**, Praha, v. 36, n. 4, p. 321-28, 1987.

NAKATANI, T.; NAKASHIMA, T.; KITA, T.; HIROFUJI, C.; ITOH K.; ITOH, M.; ISHIHARA, A. Cell size and oxidative enzyme activity of different types of fibers in different regions of the rat plantaris and tibialis anterior muscles. **The Japanese journal of physiology**, Tokyo, v. 50, n. 4, p. 413-8, 2000.

NORMAN, T. L.; BRADLEY-POPOVICH, G.; CLOVIS, N.; CUTLIP, R. G.; BRYNER, R. W. Aerobic exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. **Aviation, space, and environmental medicine**, Washington, v. 71, n. 6, p. 593-8, 2000.

OKITA, M.; YOSHIMURA, T.; NAKANO, J.; MOTOMURA, M.; EGUCHI, K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat soleus muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 159-66, 2004.

OKITA, M.; YOSHIMURA, T.; NAKANO, J.; SAEKI, A.; UEHARA, A.; MINESHITA, A.; EGUCHI, K. Effects of short duration stretching on disuse muscle atrophy in immobilized rat soleus muscle. **Journal of the American Physical Therapy Association**, New York, v. 4, p. 1-5, 2001.

ORLIAGUET, G.; RIOU, B.; LEGUEN, M. Maturation postnatale du diaphragme: des modifications ultrastructurales aux modifications fonctionnelles. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, Paris, v. 23, n. 5, p. 482-94, 2003.

OUSTANINA, S.; HAUSE, G.; BRAUN, T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. **The EMBO journal**, Oxford, v. 23, n. 16, p. 3430-9, 2004.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoform, muscle fiber types and transition. **Microscopy research and technique**, New York, v. 50, n. 6, p. 500-509, 2000.

PICQUET, F.; STEVENS, L.; BUTLER-BROWNE, G. S.; MOUNIER, Y. Contractile properties and myosin heavy chain composition of newborn rat soleus muscles at different stages of postnatal development. **Journal of muscle research and cell motility**, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 71-9, 1997.

PICQUET, F.; STEVENS, L.; BUTLER-BROWNE, G. S.; MOUNIER, Y. Differential effects of a six-day immobilization on newborn rat soleus muscles at two developmental stages. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, Dordrecht, v. 19, n. 7, p. 743-55, 1998.

POLIZELLO, J. C. **Efeitos morfológicos da reabilitação com alongamento do músculo sóleo após imobilização em encurtamento e da liberação do músculo EDL após imobilização em alongamento**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

PRAKASH, Y.S.; MANTILLA, C. B.; ZHAN, W. Z.; SMITHSON, K. G.; SIECK, G. C. Phrenic motoneuron morphology during rapid diaphragm muscle growth. **Journal applied of physiology**, Washington, v. 89, n. 2, p. 563-73, 2000.

PUNKT, K.; NAUPERT, A.; ASMOSSEN, G. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. **Acta Histochemica**, Jena Gustav Fischer Verlag, v. 106, n. 2, p. 145-54, 2004.

RIPOLL, E.; SILLAU, A. H.; BANCHERO, N. Changes in the capillarity of skeletal muscle in the growing rat. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, Berlin, v. 380, n. 2, p. 153-8, 1979.

SAKAKIMA, H.; YOSHIDA, Y.; SAKAE, K.; MORIMOTO, N. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 186-92, 2004.

SAVOLAINEN, J.; VÄÄNÄNEN, K.; VIHKO, V.; PURANEN, J.; TAKALA, T. E. Effect of immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscles. **The American journal of physiology**, Bethesda, v. 252, p. 883-8, 1987.

SCHUENKE, M. D.; KOPCHICK, J. J.; HIKIDA, R. S.; KRAEMER, W.J.; STARON, R. S. Effects of growth hormone overexpression vs. growth hormone receptor gene disruption on mouse hindlimb muscle fiber type composition. **Growth Hormone & IGF Research**, Biddeford, v. 18, n. 6, p. 479-86, 2008.

SHAH, S.B.; DAVIS, J.; WEISLEDER, N.; KOSTAVASSILI, I.; MCCULLOCH, A.D.; RAISTON, E.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R.L. Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. **Biophysical Journal**, Bethesda, v.86, n. 5, p.2993-3008, 2004.

SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O.; CANCELLIERO, K. M.; DURIGAN, J. L. Q. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. **Brazilian journal of medical and biological research**, Piracicaba, v. 39, n. 7, p. 979-85, 2006.

SLATER, C. R. Postnatal maturation of nerve-muscle junctions in hind limb muscles of the mouse. **Developmental biology**, San Diego, v. 94, n. 1, p. 11-22, 1982.

SMITH, L. K.; WEISS, E. L.; DON LEHMKUHL, L. Cinesiologia Clínica de Brunnstrom. 5ª ed. São Paulo: Manole, 1997.

STARON, R. S.; KRAEMER, W. J.; HIKIDA, R. S.; FRY A. C.; MURRAY, J. D.; CAMPOS, J. E. R. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fischer 344 rats. **Histochemistry and cell biology**, Berlin, v. 111, n. 2, p. 117-23, 1999.

SULLIVAN, V. K.; POWERS, S. K.; CRISWELL, D. S.; TUMER, N.; LAROCHELLE, J. S.; LOWENTHAL, D. Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. **Journal applied of physiology**, Washington, v. 78, n. 6, p. 2115-20, 1995.

SUNADA, Y.; BERNIER, S. M.; KOZAK, C. A.; YAMADA, Y.; CAMPBELL, K. P. Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 19, p. 13729-32, 1994.

TAKEKURA, H.; FUJINAMI, N.; NISHIZAWA, T.; OGASAWARA, H.; KASUGA, N. Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. **Journal of Physiology**, London, v. 533, n. 2, p. 571-83, 2001.

TALMADGE, R. J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. **Muscle & Nerve**. New York, v. 23, n. 5, p. 661-679, 2000.

TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S. Absolute and relative growth of rat skeletal muscle. **Physiology & Behavior**, New York, v. 57, n. 5, p. 913-19, 1995.

VOGLER, C.; BOVE, K. E. Morphology of skeletal muscle in children. An assessment of normal growth and differentiation. **Archives of pathology & laboratory medicine**, Northfield, v. 109, n. 3, p. 238-42, 1985.

WANG, X. D.; KAWANO, F.; MATSUOKA, Y.; FUKUNAGA, K.; TERADA, M.; SUDOH, M.; ISHIHARA, A.; OHIRA, Y. Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. **American journal of physiology. Cell physiology**, Bethesda, v. 290, n. 4, p. 981-9, 2006.

WATCHKO, J. F.; DAOD, M. J.; SIECK, G. C. Myosin heavy chain transitions during development. Functional implications for the respiratory musculature. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 119, n. 3, p. 459-70, 1998.

WHITE, P.; BURTON, K. A.; FOWDEN, A. L.; DAUNCEY, M. J. Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoform reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscle. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 15, n. 8, p. 1367-76, 2001.

WILLIAMS, P. E. Effect of intermittent stretch on immobilised muscle. **Annals of the rheumatic diseases**, London, v. 47, n. 12, p. 1014-16, 1988.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilised muscle. **Journal of anatomy**, London, v. 138, n. 2, p. 343-50, 1983.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. **Journal of anatomy**, London, v. 116, p. 45-55, 1973.

YAMAGUCHI, A.; FUJIKAWA, T.; TATEOKA, M.; SOYA, H.; SAKUMA, K.; SUGIURA, T.; MORITA, I.; IKEDA, Y.; HIRAI, T. The expression of IGF-I and myostatin mRNAs in skeletal muscle of hypophysectomized and underfed rats during postnatal growth. **Acta physiologica**, Oxford, v. 186, n. 4, p. 291-300, 2006.

YAMAGUCHI, A.; SAKUMA, K.; MORITA, I.; SOYA, H.; TAKEDA, H.; KATSUTA, S. Changes in fibre types in rat soleus and plantaris muscles following hypophysectomy and compensatory overload. **Acta physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 89-95, 1996.

YU, F.; GOTHE, S.; WIKSTROM, L.; FORREST, D.; VENNSTROM, B.; LARSSON, L. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscle. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, Bethesda, v. 278, n. 6, p. 1545-54, 2000.

ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO A – Ilustração do gel de poliacrilamida com os diferentes tipos de isorformas de MHCs encontrados nos músculos sóleo e plantar, correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo.

ANEXO B – Cópia do certificado de apresentação do trabalho *“Alterações do músculo esquelético após o uso de modelo de imobilização adaptado para ratas em desenvolvimento pós-natal”*, em forma de pôster no 16º SIICUSP, 2008.

ANEXO C – Artigo científico: BENEDINI-ELIAS, P. C.; MORGAN, M. C.; GOMES, A. R.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Changes in postnatal skeletal muscle development induced by alternative immobilization model in female rat. **Anatomical Science International**, Carlton, v. 84, n. 3, p. 218-25, 2009.

ANEXO D – Cópia da publicação do resumo *“Twenty-one days of eccentric exercise increment further capillarization of soleus muscle in adult rats than in baby rats after immobilization”*, referente ao trabalho apresentado em forma de pôster no 45th International Congress on Anatomy na República Checa, 2009.

ANEXO E - Cópia do certificado de apresentação em forma de pôster do trabalho *“Resposta angiogênica do alongamento em músculos de ratas bebês pós-imobilização”*, apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia – COBRAAF no Rio de Janeiro, 2009.

ANEXO F - Cópia do certificado de apresentação em forma de pôster do trabalho *“Adaptações angiogênicas do músculo esquelético em ratas em desenvolvimento pós-natal”*, apresentado no 17º SIICUSP, 2009.

ANEXO G – Cópia do protocolo de aceitação deste trabalho pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

ANEXO A – Ilustração do gel de poliacrilamida demonstrando os diferentes tipos de isorformas de MHCs encontrados nos músculos sóleo e plantar, correspondentes à expressão total de proteína dentro de cada grupo de estudo.

ANEXO B – Certificado de apresentação do trabalho *“Alterações do músculo esquelético após o uso de modelo de imobilização adaptado para ratas em desenvolvimento pós-natal”*, em forma de pôster no 16º SIICUSP 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP

Certificado

CERTIFICAMOS que o trabalho intitulado **ALTERAÇÕES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO APÓS O USO DE MODELO DE IMOBILIZAÇÃO ADAPTADO PARA RATAS EM DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**, de autoria de **MARIANA CALVENTE MORGAN, PRISCILA CACÃO BENEDINI DE OLIVEIRA e ANA CLÁUDIA MATTIELLO-SVERZUT**, foi apresentado no 16º SIICUSP – Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – Área Biológicas, realizado nos dias 04 e 05 de novembro de 2008, no Centro de Convenções de Ribeirão Preto - CCRP.

Ribeirão Preto, 05 de novembro de 2008.

Prof. Dr. Mayana Zatz
PRO-REITORA DE PESQUISA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Prof. Dr. Maria Angélica Miglino
PRESIDENTE DA COMISSÃO COORDENADORA DO
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP

ANEXO C - Artigo científico: BENEDINI-ELIAS, P. C.; MORGAN, M. C.; GOMES, A. R.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Changes in postnatal skeletal muscle development induced by alternative immobilization model in female rat. **Anatomical Science International**, Carlton, v. 84, n. 3, p. 218-25, 2009.

Anat Sci Int
DOI 10.1007/s12565-009-0016-3

ORIGINAL ARTICLE

Changes in postnatal skeletal muscle development induced by alternative immobilization model in female rat

Priscila Cação Benedini-Elias · Mariana Calvente Morgan ·
Anna Raquel Silveira Gomes · Ana Cláudia Mattiello-Sverzut

Received: 7 September 2008 / Accepted: 1 December 2008
© Japanese Association of Anatomists 2009

Abstract The objective of this study was to adapt a model of hind limb immobilization to newly weaned female rats and to determine the morphology of shortened soleus and plantaris muscles. Female Wistar rats were divided into three groups: control zero ($n = 3$) and control and free ($n = 8$), animals aged 21 and 31 days, respectively, submitted to no intervention, and immobilized ($n = 25$), animals aged 21 days submitted to immobilization for 10 days and sacrificed at 31 days of age. The device used for immobilization had advantages such as easy connection, good fit, and low cost. The immobilized rats showed a reduction in muscle fiber area and in connective tissue. The adaptation of this immobilization model originally used for adult rats was an excellent alternative for newly weaned rats and was also efficient in inducing significant hind limb disuse.

Keywords Hind limb immobilization · Plantaris muscle · Postnatal development · Rat · Soleus muscle

Introduction

The infancy of rats is marked by countless transformations in the musculoskeletal system because of

increased functional demand after the animals leave the nest and at the end of the weaning phase. This phase corresponds to the period between the second and third weeks of life (Punkt et al. 2004), which involves important tissue adaptations characterized by the transition from polyneural to mononeural innervation, maturation of the neuromuscular junction, and transition of muscle fiber phenotype (Agbulut et al. 2003; Ishihara and Taguchi 1991; Punkt et al. 2004; Sullivan et al. 1995).

Experimental models involving animals in the postnatal period may enable inference of possible functional correlations with the muscle tissue of human infants at the beginning of development (Fratacci et al. 1996; Orliaguet et al. 2003; Picquet et al. 1997; Prakash et al. 2000; Punkt et al. 2004; Watchko et al. 1998). It is possible to mimic clinical situations of disuse in children by means of immobilization models in rats. Knowledge of the response of infant muscle tissue, which is in constant transition and responds intensely to adverse conditions (Goldspink et al. 1992), is highly relevant for elaboration of therapeutic procedures in the most diverse areas of health, based on the premise of the high incidence of musculoskeletal affections during this phase.

The immobilization technique most widely used to induce disuse of a segment is a plaster cast. However, this resource involves a series of complicating factors, for example difficulty in observing the skin of the animals and the formation of ulcers, the development of edema in the distal extremity of the immobilized segment, a marked loss of body weight, difficulty in the animal's locomotion, urine accumulation, and the heavy weight of the device (Booth and Kelso 1973; Coutinho et al. 2002; Ianuzzo et al. 1989; Kasper et al. 1993; Savolainen et al. 1987). In addition to the complicating factors described above, there are

P. C. Benedini-Elias · M. C. Morgan ·
A. C. Mattiello-Sverzut (✉)
Department of Biomechanics,
Medicine and Rehabilitation of the Locomotor Apparatus,
Faculty of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo, Av. Bandeirantes,
3900, Ribeirão Preto-SP CEP 14049-900, Brazil
e-mail: acms@fmrp.usp.br

A. R. S. Gomes
Physiotherapy Course, Littoral Sector,
Federal University of Paraná, Matinhos, PR, Brazil

ANEXO D - Publicação do resumo *"Twenty-one days of eccentric exercise increment further capillarization of soleus muscle in adult rats than in baby rats after immobilization"*, referente ao trabalho apresentado em forma de pôster no 45th International Congress on Anatomy na República Checa, 2009.

MORPHOLOGY 2009

Proceedings of the
45th International Congress on Anatomy
and
46th Lojda Symposium on Histochemistry

Pilsen, September 7 - 9, 2009

Twenty-one days of eccentric exercise increment further capillarization of soleus muscle in adult rats than in baby rats after immobilization

Cornachione A.S., Caçao-Benedini L.O., Benedini-Elias P.O.C., Mattiello-Sverzut A.C.

Department of Biomechanics, Medicine and Rehabilitation of the Locomotor Apparatus, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Brazil

Introduction: The postural soleus muscle is rich in capillaries and fibers. Lack of use by immobilization is known to cause major morphological alterations in the muscle microvasculature. Soleus muscle, a vigorous walk decelerator in the ground phase, is potentially activated in eccentric training, the most physiological one in the post immobilization phase. However, studies addressing morphofunctional adaptive responses of skeletal muscles in adults and children are scarce.

Aims: To evaluate through analysis of the capillar/fiber ratio, if post immobilization eccentric training applied during different periods during rehabilitation produces similar results when used in baby or adult rats.

Methods: Fifty four female Wistar rats were divided in two groups, baby and adult. Each of these groups were further divided in six subgroups, named as follows according to treatment: Control(immob); Control(10); Control(21); Immobilized.; ImmobT10 (trained on a declining treadmill for 10 days); ImmobT21 (trained on a declining treadmill for 21 days). After sacrifice fragments of the soleus muscle were frozen and processed for immunohistochemistry (CD31 antibody) to determine the capillar/fiber ratio by counting transverse capillars and fibers.

Results: The immobilization procedure significantly reduced the capillar/fiber ratio in soleus muscles both in baby and adult rats. Ten days of eccentric training in a declining treadmill stimulated a poor angiogenesis in both age groups. Training in these conditions for 21 days, however, stimulated capillary synthesis but in a higher degree only in adult rats.

Conclusion: After 21 days of eccentric training there was an increase in the number of muscle capillaries but only in adult animals, thus increasing the capillar/fiber ratio. Although this type of training induced a reduction in oxygen tension, factors stimulating angiogenesis must have been expressed in a higher degree only in adult rats.

This study was supported financially by FAPESP (Projects no. 07/52606-4; no. 07/51715-9; no. 07/51717-1.)

ANEXO E – Certificado de apresentação do trabalho “Resposta angiogênica do alongamento em músculos de ratas bebês pós-imobilização”, apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia – COBRAf no Rio de Janeiro, 2009.

ANEXO F – Certificado de apresentação do trabalho *“Adaptações angiogênicas no desenvolvimento muscular pós-natal de ratas recém-desmamadas”*, apresentado no 17º SIICUSP, 2009.

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

A PRÓ-REITORA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
CERTIFICA QUE

MARIANA CALVENTE MORGAN

PARTICIPOU DO

**17º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

COM O TRABALHO

***ADAPTAÇÕES ANGIOGÊNICAS NO DESENVOLVIMENTO MUSCULAR
PÓS-NATAL DE RATAS RECÉM-DESMAMADAS* - CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFA. DRA. ANA CLÁUDIA MATTIELO-SVERZUT
REALIZADO NOS DIAS 10 E 11 DE NOVEMBRO DE 2009.

RIBEIRÃO PRETO, 11 DE NOVEMBRO DE 2009.

PRÓ-REITORA DE PESQUISA
MAYANA ZATZ

PRESIDENTE DA COMISSÃO
COORDENADORA DO PROGRAMA DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA
MARIA INES ROCHA MIRITELLO
SANTORO

ANEXO G - Protocolo de aceitação deste trabalho pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 042/2007, sobre o projeto intitulado “*Análise das respostas musculares adaptativas frente a protocolos de alongamento e exercício excêntrico aplicados após desuso do membro inferior de ratas em desenvolvimento pós-natal*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Ana Cláudia Mattiello-Sverzut**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **28 de maio de 2007**.

(We certify that the protocol nº 042/2007, about “*Adaptive muscle responses over protocols of stretching and eccentric exercise applied after hindlimb disuse in younger rats*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 05/28/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2007.

Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal