MARCELO SEMIATZH

**HETEROGENEIDADE METABÓLICA MUSCULAR ASSOCIADA À ASSIMETRIA
FUNCIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2018

MARCELO SEMIATZH

**HETEROGENEIDADE METABÓLICA MUSCULAR ASSOCIADA À ASSIMETRIA
FUNCIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e tecidual

Orientadora: Professora Doutora Marília Cerqueira Leite Seelaender

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2018

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo

© reprodução total

Semiatzh, Marcelo

Heterogeneidade Metabólica Muscular Associada à Assimetria Funcional /
Marcelo Semiatzh.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

São Paulo, 2018

91p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Metabolismo muscular associado à dominância motora.

Versão do título para o inglês: Muscle Metabolic Heterogeneity Associated to Functional Assymetry

1. Metabolismo muscular 2. Heterogeneidade 3. Assimetria 4. Exercícios membros inferiores I. Seelaender Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual. III. Título.

ICB/SBIBI

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcelo Semiatzh

Título da Tese: Heterogeneidade metabólica muscular associada à assimetria funcional

Orientador: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado,
em sessão pública realizada em/...../....., considerou

☐ Aprovado(a) ☐ Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente (a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

PARECER 1075/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data **APROVOU** o projeto intitulado: "*Heterogeneidade metabólica muscular associada à assimetria funcional*" dos autores Profa. Dra. **MARILIA C.L. SEELEANDER** e o aluno **MARCELO SEMIATZH**.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **10.10.2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

São Paulo, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS 196/96) e suas complementares, analisou o **Protocolo de Pesquisa** intitulado "*Heterogeneidade metabólica associada à assimetria funcional*" - **Pesquisador(a) responsável:** Profª. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender – **Equipe de Pesquisa:** Marcelo Semiatzh, Paulo Sergio Martins Alcântara, José Pinhata Otoch, Rodrigo Montenegro Lourenção - **Registro CEP-HU/USP:** 1242/12 – **CAAE:** 04929012.6.0000.5467, considerando-o como **APROVADO "AD REFERENDUM"**.

Portanto, a Pesquisa poderá ser iniciada a partir desta data, devendo o Protocolo ser apresentado na próxima reunião do Comitê marcada para o dia 01 de fevereiro de 2013, para homologação desta aprovação.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

“De fato, a física moderna nos ensina que assimetrias e imperfeições são as responsáveis pela geração de estruturas complexas no cosmo, dos átomos às células. Um Universo simétrico e perfeito seria vazio, sem matéria ou vida.”

MARCELO GLEISER

AGRADECIMENTOS

A minha querida esposa e meus adoráveis filhos Jonas, Laura e Alexandre que tiveram mais do que a paciência de conviver e me apoiar durante esse período.

Ao meu amigo e parceiro Alexandre Blass, o meu muito obrigado especial, a todos que trabalham comigo pela ajuda e tolerância necessária para convivermos. Aos meus amigos Rodolfo Reckziegel de Lucena e Maria Emilia Mendonça por estarem nas horas necessárias

À Emilia Ribeiro minha gratidão, pela presença, pelo carinho e por todo o suporte.

A todos os colegas que fiz no laboratório e em especial Reinaldo Bassit, Rodolfo Gonzales Camargo, Henrique Ribeiro, prof. José César Rosa Neto, Fernando de Oliveira Rosa, Michele Joana Alves, Rodrigo Xavier, Lucas Enjiu, Emídio Matos, Daniela Caetano, Silvio Gomes, Henrique Andrade, Ariene Murari Soares de Pinho, Rodolfo Marinho, Joana Carolla, Katrin Radloff, Gabriela Salim de Castro, Joyce Rosa Lima, Raquel Galvão Figueiredo, Daniela Ricardi, Ana Flavia Marçal Pessoa, Ivanir Pires

À Paula Leme que me ensinou como paulinizar uma apresentação com qualidade.

Ao Bruno Mezêncio pela colaboração e apoio no laboratório de biomecânica.

À Maria Isabel Veras Orselli pela ajuda e disposição de tempo em momento importante.

Ao prof. Julio Cerca Serrão, o departamento de biodinâmica da EEFE-USP pelo apoio e dedicação de tempo.

À profa. Thais Mauad, professora Associado do Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo, pela generosidade e disponibilidade.

À técnica do departamento de Patologia da Universidade de São Paulo, Angela Santos pelo suporte e carinho.

À Rosana Duarte Prisco, responsável pela eficiência dos resultados desse trabalho.

Ao Dr. Paulo Sérgio Martins de Alcântara pelo suporte, bom humor e horas de dedicação e por garantir minha vida até o fim da tese junto com a Dra. Linda F. Maximiano e o Dr. Flávio Tokeshi.

Ao Dr. Jose Pinhata Ottoch pelo suporte.

A todos os voluntários que colaboraram com este estudo.

A todos os funcionários do ICB-USP que tornam mais agradável nosso ambiente de pesquisa.

A minha orientadora profa. Marilia Seelaender pela amizade quando precisei de uma amiga, pelo carinho quando precisei de apoio, pela firmeza quando precisei de um rumo e pela experiência que me ajudou a tornar esse trabalho possível

Resumo

Semiatazh, Marcelo. Heterogeneidade metabólica muscular associada à assimetria funcional [tese (Doutorado em biologia celular e tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

No contexto da atividade física, é aceito que a maioria das pessoas apresenta membros inferiores (MI) assimétricos, um deles atuando como lado dominante (DM), enquanto o outro é considerado não dominante (ND). Existe heterogeneidade da resposta dos MI de acordo com a função (DM / ND) em face de estímulos, como caminhada, manutenção da postura e exercício. O objetivo deste estudo foi avaliar a heterogeneidade metabólica e biomecânica entre os MI, comparando biópsias de ambos os músculos gastrocnêmios mediais em indivíduos ativos (AT) e muito ativos (MA). A expressão gênica da proteína de ligação aos ácidos graxos (FABP) no músculo gastrocnêmio medial (GM) mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no membro ND, com maior expressão no AT, enquanto a citrato sintase (CS) mostrou diferenças ($p < 0,05$) no membro DM, com maior expressão em MA. Para os indivíduos MA, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os MI para FABP e CS que foram mais expressas no membro DM. Em relação aos impulsos horizontal de frenagem da marcha, a lateralidade causou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os indivíduos no grupo AT, com maior frenagem em ND. Quanto ao esforço, a diferença significativa para o impulso horizontal de frenagem da marcha ($p < 0,05$) ocorreu somente no membro ND, sendo maior frenagem no grupo AT. Na propulsão, a diferença ($p < 0,05$) ocorreu para o impulso de propulsão horizontal da marcha com interferência lateral no esforço somente no membro DM, sendo o maior no grupo MA. Para o impulso vertical de propulsão da marcha, independente do esforço, DM apresenta menor impulso. Nossos dados apontaram para a existência de diferenças metabólicas e biomecânicas entre os hemisférios opostos que podem ser exacerbados pelo exercício contínuo e especializado. Os resultados do fator lateralidade nos membros de DM e ND mostram diferentes adaptações entre os grupos, que podem ser consideradas na pesquisa e na clínica.

Palavras-chave: Metabolismo, heterogeneidade, assimetria, exercício físico, membros inferiores.

Abstract

Semiatzh M. Muscle metabolic heterogeneity associated with functional asymmetry [Ph. D. thesis (Cellular and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

In the context of physical activity, most people present asymmetric lower limbs (LL), one of them acting as the dominant (DM) side, while the other is considered non-dominant (ND). There is heterogeneity of LL response according to function (DM/ND) in the face of stimuli such as walking, posture maintenance and exercise. The aim of this study was to evaluate metabolic and biomechanical heterogeneity between the LL, comparing muscle biopsies of active (AC) and very active (VA) individuals. Gene expression of fatty acid binding protein (FABP) in the gastrocnemius medial muscle showed a significant difference ($p < 0.05$) only for ND, with higher expression in the AC, while citrate synthase (CS) expression was different ($p < 0.05$) in DM limb, with higher expression in VA. For VA, there was significant difference ($p < 0.05$) between the limbs, as FABP and CS expression was higher in DM. There was significant difference ($p < 0.05$) regarding impulses in braking, considering laterality in the AC group, with higher braking capacity in ND. In concern to effort, a significant difference ($p < 0.05$) was found for ND, as the parameters were higher in AC. In the case of propulsion, the difference ($p < 0.05$) occurred with laterality interfering in the effort degree in the DM, with horizontal impulse propulsion being superior in VA. For the vertical impulse of gait propulsion, regardless of the effort, DM presents less impulse. Our data point out to the existence of metabolic and biomechanical differences between the opposite body hemispheres that may be exacerbated by continued exercise and specialization. The laterality factor results in the DM and ND limbs showing different adaptations between groups and are of relevance for exercise prescription and study.

Keywords: metabolic, heterogeneity, asymmetry, exercise, lower limbs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Comparação das fases dos ciclos de marcha e da corrida.....	19
Figura 2- Modelo proposto de Homer-NFAT.....	23
Figura 3- Sequência de fotos da biopsia realizada.....	30
Figura 4- Imagem da avaliação biomecânica.....	31
Figura 5- Fotomicrografia com cortes seriados transversos de miócitos do músculo GM.....	37
Figura 6- Distribuição dos sujeitos da pesquisa em relação ao nível de esforço.....	39
Figura 7- Comprimento dos MMII.....	40
Figura 8- EMG do músculo GM.....	41
Figura 9- Componente vertical da FRS durante a fase de frenagem na marcha.....	42
Figura 10- Componente horizontal da FRS durante a fase de frenagem da marcha.....	43
Figura 11- Componente vertical da FRS durante a fase de propulsão da marcha.....	43
Figura 12- Componente horizontal da FRS durante a fase de propulsão na marcha.....	44
Figura 13- Eletromiografia do músculo GM durante a corrida.....	45
Figura 14- Componente vertical e horizontal da FRS da corrida dos indivíduos MA durante as fases de frenagem e propulsão.....	46
Figura 15- Valores da expressão gênica em unidades arbitrárias de CPT1, HSL e FATP.....	48
Figura 16- Valores da expressão gênica em unidades arbitrárias de CS, LDH, FABP, HOMER 2 e LPL.....	50
Figura 17- Valores da expressão gênica em unidades arbitrárias de CPT2.....	51
Figura 18- Área das fibras do músculo GM.....	52
Figura 19- Área das fibras do músculo GM.....	53
Figura 20- Correlações da área das fibras do músculo GM entre membros DM e ND.....	54
Figura 21- Correlações da área das fibras do músculo GM entre os membros DM e ND.....	55
Figura 22- Porcentagem das fibras por amostra do músculo GM.....	56

Figura 23- Porcentagem de fibras tipo I, IIA e IIX do músculo GM.....	57
Figura 24- Correlações entre as expressões gênicas do grupo AT.....	59
Figura 25- Correlações entre os valores de $\Delta\Delta Ct$ a partir do número de ciclos da expressão gênica das proteínas do musculo GM para o grupo MA membro DM.....	61
Figura 26- Correlações entre os valores de $\Delta\Delta Ct$, a partir do número de ciclos da expressão gênica das proteínas do musculo GM, impulsos e EMG para o grupo MA membro ND.....	62
Figura 27- Correlações entre os valores de EMG de frenagem e total da corrida nos membros DM e ND do grupo MA.....	63
Figura 28- Correlações entre os valores de EMG nos membros DM e ND do grupo MA.....	64
Figura 29- Correlações entre os valores de EMG nos membros DM e ND do grupo MA.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de <i>Primers</i> utilizados.....	35
Tabela 2- Características dos sujeitos da pesquisa.....	40
Tabela 3- Resultados da expressão gênica das proteínas do músculo GM.....	47
Tabela 4- Resumo dos resultados obtidos.....	67

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

AACC - Ácidos graxos de cadeia curta

AG - Ácidos graxos

AT- Indivíduos ativos

Ca²⁺ - Íons de cálcio

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CEP- Comitê de ética e pesquisa

CIVM- Contração isométrica voluntária máxima

CPT - Carnitina palmitoil-tranferase

CPT 1- Carnitina palmitoil-tranferase 1

CPT 2 - Carnitina palmitoil-tranferase 2

CS - Citrato sintase

Ct - limiares dos ciclos

DEPC - dietil pirocarbonato

DM - Dominante

DP - Desvio padrão

EVA - Espuma vinílica acetinada

FABP – Proteína ligadora de ácidos graxos

FAT/CD36 - Proteína transportadora de ácido graxo CD36

FATP – Proteína transportadora de ácido graxo

GAP-DH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HU – Hospital Universitário

Hz - Hertz

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IMC - Índice de massa corpórea

IMTAG - Intra miocelular triacilglicerol

IPAQ - Questionário internacional de atividade física

Kg- Kilograma

LHS - Lipase hormônio sensível

LPL - Lipase lipoprotéica

MA – Indivíduos muito ativos

MET's – Estimativa do equivalente metabólico

MHC I – Miosina de cadeia longa Tipo I

MHC IIA - Miosina de cadeia longa Tipo IIA

MHC IIX – Miosina de cadeia longa Tipo IIX

MI - Membro inferior

Min - Minutos

MI – Membro inferior

MMII - Membros inferiores

MS - Membro superior

ND - Não dominante

NFAT - Fator nuclear de células T ativadas

nm -Namômetro

PC's- Porcentagem do ciclo

RMS - Média da raiz quadrada

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m- Ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR - Reação da transcriptase reversa em cadeia de polimerase

SENIAM- Eletromiografia superficial para a avaliação não invasiva de músculos

TAG - Triacilglicerol

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

USP - Universidade de São Paulo

µg - Micrograma

µL - Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Assimetria corporal em vertebrados	17
1.2 Origem da assimetria em humanos.....	17
1.3 Efeitos funcionais da assimetria	18
1.4 Marcha	19
1.5 Assimetria na marcha	20
1.6 Diferentes níveis de esforço	20
1.7 Tipos de fibras musculares, plasticidade e assimetria	21
1.8 Controle da densidade pós-sináptica das fibras tipo I	22
1.9 Metabolismo oxidativo	24
2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVO	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	28
4.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa	28
4.2 Antropometria.....	29
4.3 Obtenção de biópsias	29
4.4 Análise biomecânica.....	30
4.4.1 Força de reação de solo.....	32
4.4.2 Eletromiografia.....	33
4.5 Análise da expressão gênica	34
4.5.1 Extração do RNA total	34
4.5.2 Síntese de cDNA	34
4.5.3 Amplificação PCR-RT	34
4.6 Análise imunoistológica	35

5 RESULTADOS	39
5.1 Nível de esforço.....	39
5.2 Lateralidade dos membros inferiores	39
5.3 Característica da amostra.....	39
5.4 Dados biomecânicos da marcha	41
5.4.1 EMG	41
5.4.2 Medidas de impulso.....	42
5.5 Dados da biomecânicos da corrida	44
5.5.1 EMG	44
5.5.2 Medidas de impulso.....	45
5.6 Resultados da expressão gênica das proteínas do músculo GM.....	47
5.7 Resultados da imuno-histoquímica.....	51
5.7.1 Área das fibras	51
5.7.2. Distribuição das fibras	56
5.8 Resultados para o grupo AT	58
5.9 Resultados para o grupo MA	59
5.11 Resumo dos resultados obtidos.....	66
6 DISCUSSÃO	68
6.1 A marcha do MA difere mecanicamente da marcha do AT	69
6.2 Relação entre assimetria funcional e metabólica.....	69
6.3 Relevância científica.....	72
6.4 Relevância para o treinamento físico e tratamento de lesões	73
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	83
ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	83
ANEXO B – Questionário Internacional de Atividade Física (IPAC) versão Português	86
ANEXO C - Questionário de Waterloo – Versão Português	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Assimetria corporal em vertebrados

Das mais de 1 milhão de espécies de animais existentes, apenas 3% são vertebrados, que pertencem ao Filo Chordata, sendo consideradas espécies com simetria bilateral. Estudos indicam, porém, que especificamente a espécie humana é assimétrica (COREN; PORAC, 1977; ANNETT, 2008; MCMANUS, 2002). A lateralidade e a assimetria foram previamente aceitas como condições inerentes aos seres humanos (CROW, 2004). Estudos mais recentes mostram que as ações motoras lateralizadas apoiadas por regiões neurais contralaterais estão presentes em outros vertebrados (VALLORTIGARA et al., 2011), como chimpanzés (MEGUERDITCHIAN et al., 2012) e cangurus (GILJOV et al., 2015).

A assimetria motora humana associa-se à organização assimétrica do cérebro, de modo que a inervação da musculatura se estende contra lateralmente. Como resultado dessa organização, a lateralidade cerebral traduz-se em ações físicas contralaterais (SACKEIN ET al, 1983).

1.2 Origem da assimetria em humanos

Para a grande maioria da população, processos cerebrais que controlam a função da linguagem e lateralidade motora estão localizados no hemisfério esquerdo (SANTROCK, 2008). Esses processos cerebrais têm sido relacionados evolutivamente a gestos, expressões, uso de ferramentas, ações manuais coordenadas, postura e bipedismo (FORRESTER et al., 2013)

Existem diversas teorias sobre o surgimento da assimetria em humanos, associando-a com experiências sensório-motoras (CORYELL; MICHEL, 1978; NUDO et al., 1996; PROVINS, 1997; CORBETTA; THELEN, 2002), com fatores ambientais (HARKINS; MICHEL, 1988; HARKINS; UZGIRIS, 1991; PROVINS, 1997) ou com fatores genéticos (LEVY; NAGYLAKI, 1972; ANNETT, 2008; MCMANUS, 2002; CORBALLIS et al., 2012).

1.3 Efeitos funcionais da assimetria

Em 90% dos seres humanos, a porção direita do corpo mostra lateralidade motora dominante (MC. MANUS, 2002). Em relatos sobre assimetria de membros superiores (MS) e inferiores (MI), ao se comparar o comprimento dos membros inferiores, observou-se que sujeitos destros de 14 a 20 anos apresentavam a perna esquerda mais longa (INGELMARK, 1974). Observou-se também que a massa do tecido muscular no hemisfério corporal esquerdo é significativamente maior que aquela do direito; e especificamente, a massa do membro inferior esquerdo é superior à do direito (CHHIBBER; SINGH, 1970).

Em conjunto, os dados indicaram que tal assimetria promove domínio unilateral de membros superiores e inferiores, tornando um dos lados dominante (DM) e o outro não dominante (ND). Especificamente, a assimetria de MI tem sido considerada suficiente para causar alterações ortopédicas como dor lombar, fratura por estresse e osteoartrite nas articulações dos MI (CHIBBER, 1972). Em crianças, a assimetria dos MI pode influenciar a qualidade da marcha (KAUFMAN et al., 1996).

Embora as adaptações metabólicas ao treinamento de resistência sejam conhecidas, não há em nosso conhecimento estudos que relatem as diferenças que refletem os distintos papéis dos membros contralaterais na execução da atividade. Esse aspecto torna-se preocupante quando se sabe que estudos comparam o efeito da atividade física em aspectos fisiológicos e patológicos, utilizando um membro como controle experimental (HELGE et al, 2011), ou estudando um único membro sem considerar tais aspectos (TALANIAN et al, 2010). Há na literatura, em estudos que demonstram as adaptações da fibra muscular à atividade física, e que recorrentemente adota-se a comparação de um membro (executor do esforço) com o contralateral (controle) em repouso ou sob outro tipo de estímulo (MITCHELL et al, 2012; MACINNIS et al, 2017). Isso acontece porque os pesquisadores assumem que os membros são homogêneos e respondem de forma similar a estímulos.

Assim, apesar de aceito que a presença de assimetrias entre os lados corporais na marcha em indivíduos saudáveis é importante ferramenta de trabalho para tratamentos e treinamento físico (SADEGHI et al., 2000), desconsidera-se amplamente esse aspecto.

1.4 Marcha

A sequência de funções executada por um membro inferior durante uma passada é chamada de ciclo da marcha e se divide em duas fases descritas pelo trajeto do pé direito (MURRAY et al., 1964):

1. Fase de apoio caracterizada pelo momento em que o pé está no solo;
2. Fase de oscilação ou balanço da perna no ar, caracterizada pelo momento em que o pé direito é elevado do solo até o seu avanço para o próximo choque do calcanhar.

Figura 1- Comparação das fases dos ciclos de marcha e da corrida: contato inicial (IC), apoio médio (MST), apoio terminal (TST), pré-balanço (PSw), balanço inicial (ISw), balanço médio (MSw) e balanço do terminal (TSw) (LOHMAN, 2011).

O objetivo da locomoção é propulsionar o corpo à frente enquanto sustenta seu peso contra a força de gravidade. Durante o ciclo da marcha, os lados do corpo vão se alternando na tarefa de apoiar e propulsionar o corpo para a frente (WINTER, 1991). A diferença da marcha

para a corrida dá-se pelo aumento de velocidade e pela presença da fase aérea; mesmo que sob a mesma velocidade, a marcha apresenta duplo apoio, enquanto a corrida apresenta tal fase aérea (DUGAN; BHAT, 2005).

1.5 Assimetria na marcha

A presença de assimetrias cerebrais e funcionais, com dominância do lado esquerdo do cérebro para funções de linguagem e manuais, pode ter desempenhado um papel especial na evolução humana (CORBALLIS, 2012).

Segundo SADEGHI et al. (2000), a dominância nos membros inferiores refere-se à perna que é empregada para mobilidade, enquanto o membro ND contribui para o apoio. Ao comparar diversos autores que defendem a ideia de simetria ou assimetria na marcha, concluem que a presença de assimetrias na marcha entre os lados corporais em indivíduos saudáveis é importante ferramenta de trabalho para tratamentos e para o treinamento físico.

Estudo realizado por Potdevin et al. (2008), verificando o impulso anteroposterior pela análise da força de reação ao solo na marcha, mostrou diferenças entre os lados corporais para frear e propulsionar o corpo em relação à duração da fase da marcha. Os controles básicos de propulsão e frenagem parecem estar relacionados com a intensidade das diferentes forças aplicadas nessas ações e com a divisão do tempo gasto com cada uma delas. Isso sugere que há uma estratégia de controle temporal e cinético na ação dos membros inferiores, e que a assimetria na marcha pode ser causada por diferenças antropométricas e de força entre os dois lados.

Bosch e Rosenbaum (2010) mostraram que a assimetria é encontrada em crianças a partir dos primeiros 15 meses de marcha independente (média 2,8 anos de idade). Estudo realizado por Kubota et al. (2011) com testes de forças aplicadas entre os lados do corpo mostrou que a assimetria aumenta à medida se envelhece. Para Lee et al. (2010), variações em treinos de atividade física interferem nas assimetrias, que tendem a se exacerbar com o aumento da fadiga muscular e com as mudanças na intensidade do treinamento.

Com base nas reconhecidas características específicas das fibras musculares e no efeito do treinamento de *endurance* sobre a fibra muscular, este estudo se propôs a investigar os aspectos morfológicos e metabólicos relacionados à assimetria em diferentes níveis de esforço.

1.6 Diferentes níveis de esforço

Segundo Nahas (2001), o indivíduo ativo (AT) é definido como aquele que desempenha: a) atividade física vigorosa: ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 minutos/sessão; b) moderada ou caminhada: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 minutos/sessão; c) qualquer atividade somada: ≥ 5 dias/semana e ≥ 150 min/ semana.

O muito ativo (MA) é definido como aquele que desempenha: a) vigorosa: ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão; b) vigorosa: ≥ 3 dias/ semana e ≥ 20 min/sessão mais moderada e ou caminhada ≥ 5 dias/ semana e ≥ 30 min/sessão. Atividades moderadas são atividades que resultam em gasto de 3,5 a 6 MET's, (1 MET: 3,5 ml/kg/min), enquanto atividades vigorosas são atividades com gasto superior a 6 MET's.

1.7 Tipos de fibras musculares, plasticidade e assimetria

O músculo esquelético dos mamíferos é composto por diferentes tipos de fibras, cuja identidade pode ser estabelecida durante o desenvolvimento embrionário por mecanismos de controle miogênicos intrínsecos (SCHIAFINO et al, 2011 apud NEEDHAM, 1926¹; PETER et al, 1972²). Após o nascimento, as propriedades estruturais e funcionais das fibras, que são geralmente referidas como fenótipo de fibras, podem mudar em resposta a influências hormonais e neurais, alterando o perfil do tipo de fibra. Essa propriedade é definida como plasticidade muscular, e as proporções entre os tipos de fibra na musculatura podem ser modificadas pela atividade neuromuscular, pela força mecânica, por fatores hormonais e pela idade (PETTE; STARON, 2000).

Com isso, a proporção relativa dos diferentes tipos de fibra varia entre as espécies. Nos seres humanos, encontramos uma significativa variação entre os indivíduos (SCOTT et al., 2001). As fibras musculares são compostas de unidades funcionais chamadas sarcômeros. Em cada sarcômero, dentre as várias proteínas presentes, estão as proteínas miofibrilares miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino). A interação dessas duas proteínas miofibrilares permite que os músculos se contraiam (SCOTT et al., 2001).

Apesar de o genoma humano conter pelo menos 10 genes de miosina de cadeia pesada (MHC), em músculos de adultos apenas 3 genes são expressos: MHC I, MHC IIA e MHC IIX (SCHIAFFINO et al, 1989; TERMIN et al 1989; GORZA, 1990). As fibras lentas do tipo I contêm uma alta densidade de mitocôndrias e seu metabolismo baseia-se preferencialmente nos

¹ Needham DM. Red and white muscles. *Physiol Rev* 6: 1–27, 1926.

² Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pig and rabbit. *Biochemistry* 11: 2627– 2633, 1972.

processos oxidativos. Tais células demonstram maior conteúdo de mioglobina, menor conteúdo de glicogênio e inclusões lipídicas mais frequentes do que as fibras de contração rápida (tipo II). Esses recursos permitem às fibras lentas executar contrações por longos períodos, essenciais para a manutenção da postura corporal e atividades de resistência (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

A heterogeneidade das fibras musculares em cada músculo é a base da flexibilidade, que permite que o mesmo seja utilizado para várias funções, como a atividade de baixa intensidade contínua (postura), contrações submáximas repetidas lentas (locomoção), contrações submáximas repetidas rápida (corrida de resistência) e fortes contrações máximas (saltar, chutar) (BOOTH; THOMASON, 1991).

1.8 Controle da densidade pós-sináptica das fibras tipo I

O tecido muscular esquelético tem capacidade adaptativa de responder à demanda física demonstrando rearranjo da organização da fibra a profundas adaptações metabólicas. Contudo tais modificações incidem heterogeneamente sobre populações diferentes de fibras musculares (BOOTH; THOMASON, 1991). Os músculos esqueléticos são compostos por diferentes tipos de fibras com propriedades biológicas e funções específicas. As fibras lentas do tipo I contêm uma alta densidade de mitocôndrias e seu metabolismo baseia-se preferencialmente nos processos oxidativos. Tais células demonstram maior conteúdo de mioglobina, menor conteúdo de glicogênio e inclusões lipídicas mais frequentes do que as fibras de contração rápida (tipo II). Esses recursos permitem às fibras lentas executar contrações por longos períodos, essenciais para a manutenção da postura corporal (BOOTH; THOMASON, 1991) e atividades de *endurance* até 50 a 60% do consumo máximo de O_2 ($VO_{2máx}$), quando se atinge o índice máximo de oxidação de lipídios ($FAT_{máx}$) (ACHTEN ET AL. 2002, NORDBY ET AL. 2006).

Pette e Staron (2000) afirmam que as proporções entre os tipos de fibra na musculatura podem ser modificadas pela atividade neuromuscular, pela força mecânica, por fatores hormonais e pela idade.

O treinamento de *endurance* no nível submáximo de intensidade aumenta a capacidade de oxidação de lipídios e gera adaptações celulares (TURCOTTE ET AL. 1992, KIENS ET AL. 1999).

Segundo Salanova et al, (2011), no músculo, a proteína Homer 2 está presente na densidade pós-sináptica somente da fibra oxidativa. O tamanho da fibra muscular está relacionado ao equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas. A via de sinalização da

calcineurina, uma fosfatase de serina/treonina, é uma das principais mediadoras de sinalização de Ca^{2+} .

Quando ativada por Ca^{2+} , a calcineurina afeta a expressão gênica muscular através da desfosforilação de substratos específicos, incluindo o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), uma família de fatores de transcrição fundamental para a resposta do sistema imunológico, mas que também tem funções de regulação na maioria dos órgãos, incluindo cérebro, músculo esquelético e coração (LEE; PARK, 2006).

O aumento de estímulos neurológicos apropriados resulta em aumento local da proteína Homer 2, que recruta NFAT na densidade pós-sináptica, e a subsequente desfosforilação do NFAT pela calcineurina, culminando em sua translocação nuclear, modulando, assim, a atividade transcricional de fibras musculares de contração lenta (figura 2). Na falta de estímulos, após repouso prolongado, a expressão de Homer 2 diminui de forma significativa (LEE; PARK, 2006). Portanto a expressão de Homer2 é peça molecular importante na tradução de entrada sináptica neuromuscular para a cascata de sinalização da calcineurina-NFAT em fibras musculares esqueléticas (SALANOVA, 2011).

Figura 2. Modelo proposto de Homer-NFAT. O papel interativo no músculo esquelético, na junção neuromuscular, microdomínio subsináptico induzido pela atividade do nervo motor (SALANOVA, 2011)

1.9 Metabolismo oxidativo

Durante o exercício, a contribuição de várias vias metabólicas para a provisão de energia é determinada pela intensidade relativa e pela saída de potência absoluta do exercício. A potência absoluta determina a taxa de demanda ATP e o gasto energético, enquanto a intensidade do exercício relativo influencia as contribuições relativas de carboidratos e fontes lipídicas da circulação (extramusculares) e fontes de combustível intramusculares para o fornecimento de energia. Dependendo dos estoques e da intensidade, aminoácidos podem também ser usados como fonte de energia (EGAN; ZIERATH, 2013).

O treinamento de *endurance* no nível submáximo de intensidade aumenta a capacidade de oxidação de lipídios e gera adaptações celulares (SAHLEM; HARRIS, 2008, TURCOTTE et al., 1992, KIENS et al., 1999).

Segundo Van Loon (2004), os ácidos graxos são importantes fontes de energia para essas células e são captados pelo músculo a partir do plasma ou obtidos a partir da hidrólise do triacilglicerol (TAG) intramuscular. Neste último compartimento, o TAG está armazenado sob a forma de gotículas de gordura intramiocelulares (IMTAG). O músculo apresenta duas regiões distintas de acúmulo de TAG: a extramiocelular ou perimisial, na qual o TAG é armazenado em adipócitos no tecido conjuntivo envolvente dos fascículos de fibras musculares para armazenamento de longo prazo; e os *pools* intramiocelulares, compostos de gotículas de gordura localizadas adjacentes às mitocôndrias. (GUO; JENSEN, 1998).

Indivíduos sedentários priorizam o uso de ácidos graxos provenientes da lipólise do tecido adiposo, pois não possuem estoques de ácidos graxos intramusculares suficientes para as necessidades energéticas do esforço. Em contrapartida, sujeitos treinados possuem estoques de ácidos graxos (AG) intramusculares facilmente mobilizáveis. No entanto, quando a origem do AG é plasmática, há duas fontes disponíveis, os AG livres circulantes e os TAGs associados às lipoproteínas (VAN LOON, 2004).

O TAG circulante tem que ser hidrolisado em glicerol e ácidos graxos para que o transporte transendotelial aconteça, processo intermediado pela ação catalítica da enzima lipase lipoprotéica (LPL), encontrada na superfície luminal da célula endotelial. É sabido que o perfil das lipoproteínas é fortemente alterado pelo exercício e é observado o aumento da atividade de LPL após treinamento de *endurance*. Essa fonte de AG é utilizada preferencialmente na reposição do substrato oxidado durante a atividade (VAN LOON, 2004).

Segundo Tarnopolsky (2007), exercícios de *endurance* aumentam a densidade e a área das gotículas de gordura intramusculares e também o número e a área de contato das mitocôndrias com as inclusões lipídicas.

Segundo Alsted et al (2009), a lipase hormônio sensível (HSL) é a primeira lipase responsável pela hidrólise do IMTAG, tanto em humanos quanto em roedores. Ele demonstrou que o conteúdo proteico de HSL não se altera com um programa de exercícios em humanos por oito semanas, mas que sua fosforilação e sua expressão gênica são exacerbadas.

O transporte de ácidos graxos na membrana e no citoplasma das fibras musculares é realizado pelas proteínas transportadoras FATP (*Fatty Acid Transport Protein*) e FABPpm (*Fatty Acid Binding Protein*) e FAT/CD36 (*Fatty Acid Transporter*), cuja expressão aumenta após exercício aeróbio (BRADLEY et al., 2011).

A FABPpm atua no transporte do AGCL do citoplasma para dentro da mitocôndria, aumentando a oxidação dos ácidos graxos, enquanto a expressão aumentada de FATP incrementa o transporte de ácidos graxos para as gotículas de gordura do sarcolema (Bonen et al., 2012).

Independentemente de sua origem, o AG deve ser obrigatoriamente transportado para a matriz mitocondrial, garantindo sua oxidação. Tal transporte é realizado pelo sistema enzimático carnitina palmitoil transferase (CPT), composto pelas enzimas carnitina palmitoil-transferase 1 (CPT 1) e carnitina palmitoil-transferase 2 (CPT 2). Jong-Yeon (2002) e Sahlin e Harris (2008) mostraram que, em indivíduos treinados, houve aumento significativo tanto na expressão como na atividade de CPT 1. Houve também aumento significativo da citrato sintase (CS), enzima chave que controla o primeiro passo do ciclo de Krebs, que é rotineiramente adotada como marcador de atividade aeróbia (LEEK et al., 2001) e também está relacionada com o aumento do conteúdo mitocondrial (JONG-YEON et al., 2002).

Apesar de estar amplamente registrado na literatura que o exercício aeróbio aumenta a expressão gênica das proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário, em nosso conhecimento não há trabalhos que examinem eventuais diferenças desse efeito entre os membros inferiores, associando-as a valores biomecânicos em função da assimetria funcional.

2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Considerando que é possível postular que a adaptação heterogênea dos membros inferiores contralaterais pode ocorrer devido à especialização em diferentes tarefas durante a atividade física, propõe-se que, uma vez que um dos hemisférios é responsável por impulso predominante, poderia haver adaptação metabólica heterogênea.

Estudos na literatura, tratamentos e treinamentos físicos consideram homogeneidade dos hemisférios quando há evidências da presença de assimetria funcional e metabólica.

Assim, propusemo-nos a examinar se, em decorrência da lateralidade e do volume da atividade física do indivíduo, há heterogeneidade metabólica e biomecânica entre os membros inferiores

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar se o metabolismo dos MMII dominante/não dominante em repouso, em indivíduos ativos (AT) e muito ativos (MA) apresenta adaptação metabólica distinta; avaliar os sinais biomecânicos e compará-los com parâmetros do metabolismo energético, para determinar se a especialização em diferentes tarefas dos membros inferiores pode levar à adaptação morfológica e metabólica heterogênea.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar e comparar a morfologia e marcadores metabólicos das fibras musculares nos membros inferiores.
- Avaliar se a eventual assimetria incidente sobre os membros inferiores está presente em indivíduos que desempenhem atividade física em diferentes graus de esforço, a AT e MA.

4 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

4.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa

Todos os indivíduos aderiram de forma voluntária ao estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo A) e foram devidamente orientados quanto aos riscos do estudo.

Foram selecionados 16 indivíduos, oito do sexo masculino e oito do feminino, sendo quinze destros e um canhoto, com idade entre 18 e 50 anos ($33,8 \pm 9,3$; peso $71,4 \pm 15,0$ kg, altura $1,70 \pm 0,13$ m), saudáveis, sem histórico de fraturas ou doenças crônicas. Para compor o grupo ativo, foram selecionados indivíduos com vida ativa que não participaram de nenhum programa de treinamento por pelo menos um ano. Para compor o grupo muito ativo, foram escolhidos indivíduos praticantes amadores de corrida de resistência que treinavam regularmente há mais de um ano.

O nível de esforço foi determinado pelo Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ), versão longa, adaptado e validado para a população brasileira (MATSUDO; ARAÚJO, et al., 2001) (Anexo B). As perguntas do questionário estão relacionadas às atividades realizadas na semana anterior à aplicação do mesmo. Com relação ao nível de esforço, os sujeitos da pesquisa foram classificados como ativos (AT) e muito ativos (MT).

Para avaliar a lateralidade dos MMII, aplicou-se o questionário internacional de Waterloo (OBRZUT et al., 1992), versão traduzida e validada para o português (CARPES et al., 2010), incluso como anexo C. Com relação à lateralidade, os MMII foram classificados como membro dominante (DM) ou membro não dominante (ND).

Medidas antropométricas de peso, altura, comprimento de membros inferiores e circunferência da perna foram realizadas.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) em 10/10/2012, número do parecer 1075/CEP, e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário da mesma instituição, sob registro CEP-HU/USP:1242/12 -CAAE:04929012.6.0000.5467.

4.2 Antropometria

Foram realizadas aferições antropométricas: massa corporal, com resultado expresso em quilogramas (Kg); altura, circunferências das coxas e das pernas além comprimento dos membros inferiores com resultados expresso em centímetros (cm). Além disso, foi realizada a determinação do índice de massa corpórea (IMC), com resultado expresso em quilograma por metro à potência quadrada (Kg/m^2).

4.3 Obtenção de biópsias

Para as biópsias, escolhemos o músculo gastrocnêmio vasto medial (GM), por sua dupla função na marcha no momento da frenagem e da propulsão (LIU et al. 2008).

As biópsias foram realizadas no músculo GM de ambos MMII de cada sujeito da pesquisa, coletadas por médico cirurgião em sequência, em repouso, sempre no período da manhã, antes de qualquer sessão de treino, em ambiente hospitalar. A amostra foi retirada na maior circunferência muscular de cada lado do MI, utilizando-se como referência anatômica uma linha reta a partir do côndilo medial da tíbia, na região posterior do joelho (figura 3).

Inicialmente foi realizada a tricotomia com aparelho de barbear descartável e assepsia local com álcool degermante em gaze estéril. Com uma seringa descartável de 5cc, foram aspirados 2ml de solução de Xilocaína 1% sem vasoconstritor. Foi infiltrada uma agulha hipodérmica na área a ser biopsiada.

Com lâmina de bisturi nº7, foi realizada incisão de aproximadamente um centímetro na pele, para alcançar e posteriormente divulsionar o tecido celular subcutâneo até a fáscia externa do músculo, sendo coletado um fragmento de aproximadamente 0,7x0,5cm de tecido muscular. Uma parte do material coletado foi congelado em nitrogênio líquido e logo em seguida armazenado em freezer -80°C para análise da expressão gênica. Outra parte do tecido muscular foi armazenada em microtubos para centrifuga, com paraformaldeído a 4% para análises morfológicas.

O fechamento da fáscia foi feito aproximando-a com sutura contínua para fechar tanto a fáscia quanto a pele, com fio reabsorvível, não necessitando o voluntário retornar para retirada. Medicação sintomática foi prescrita para uso se necessário. As normas internacionais para prevenção de infecção bem como o manuseio de materiais contaminantes e sangue foram rigidamente controlados.

Figura 3- Sequência de fotos da biópsia realizada: a- marcação exata no local da biópsia bilateral; b- aplicação do anestésico; c- corte de 1cm é feito, afasta-se tecido adiposo, corta-se a fáscia e expõe-se o músculo a ser cortado; d- imagem do fragmento cortado; e- sutura-se a fáscia e a pele; f- curativo cirúrgico é aplicado no local.

4.4 Análise biomecânica

A análise da marcha foi realizada no laboratório de biomecânica da EEFÉ-USP, sob a supervisão do Prof. Júlio Cerca Serrão, em uma passarela de 10 metros de comprimento com duas plataformas de força montadas no meio com 5mm de espaçamento uma da outra (figura 4). O protocolo seguiu o método *midgate* (HARRISON; FOLLAND, 1997).

Três câmaras (612 Vicon sistema, Oxford Métricas, Inglaterra) foram posicionadas em cada lado das plataformas de força a uma distância de 3 metros no início, meio e final do piso. As plataformas de força e o sistema de vídeo foram sincronizados, e os dados coletados em 120Hz. Durante a caminhada, a análise cinemática foi realizada utilizando o sistema Vicon de análise de movimento.

Os sujeitos da pesquisa usaram marcadores reflexivos, cada um tendo um diâmetro de 2,5cm. Os sujeitos foram instruídos a caminhar naturalmente, a uma velocidade constante, até o final da passarela.

Figura 4- Imagem da avaliação biomecânica com o sujeito caminhando sobre as plataformas de força, usando marcadores reflexivos. Suas imagens foram captadas pelas câmeras fotográficas integradas ao sistema Vicon. Presentes também sensores de eletromiografia conectados à superfície do músculo e ao transmissor preso na cintura.

A determinação das fases de frenagem e propulsão no ciclo da passada se faz pela análise do impulso horizontal, classificando como fase de frenagem momento em que o corpo inicialmente toca o solo e se desacelera até o momento em que para de desacelerar, e como fase de propulsão quando o corpo passa a acelerar até o momento em que novamente irá tocar o solo e iniciar novo ciclo da passada.

4.4.1 Força de reação de solo

Os parâmetros biomecânicos relacionados à cinética foram mensurados por uma plataforma de força AMTI BP600900-2000 com frequência de amostragem de 1000Hz (*Advanced Mechanical Technology Inc*), que apresenta valores de histerese e não linearidade na ordem de 0,2% da escala total para cada componente de força e que foi fixada no solo no Laboratório de Biomecânica da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo. O modelo da plataforma de força utilizada (AMTI BP600900-2000) é composta por transdutores de força do tipo *strain-gauge* localizados nos cantos da superfície de medição (0,6 x 0,9 m). Os sinais obtidos pelos transdutores foram enviados por intermédio de cabos e interruptores a um amplificador de sinais do modelo MAS-6 MiniAmp (*ADVANCED MECHANICAL TECHNOLOGY INC*). Após amplificação de 1000x, os sinais foram direcionados ao conversor A/D ADC *card* de resolução de entrada $\pm 10V$ e saída 16 BITS (*VICON*). A plataforma foi conectada ao sistema Vicon através do módulo Vicon *Ultranet HD* e os valores de força registrados no software Vicon Nexus 1.8.5. Os dados de força foram normalizados pelo peso corporal e filtrados com um filtro *low pass* do tipo *Butterworth* de 4ª ordem com frequência de corte de 90Hz.

As variáveis analisadas foram os valores de impulso das componentes vertical e anteroposterior da força de reação de solo nas fases de frenagem e propulsão.

Para calibração, foi utilizada a técnica de calibração estática do sistema anatômico proposta por Capozzo et al. (1995). Após o posicionamento dos marcadores, os sujeitos da pesquisa foram orientados a permanecer em posição ortostática, com um pé sobre cada plataforma. O tronco, as coxas e as pernas permaneceram posicionados em linha reta e o pé alinhado a 90° com a perna. O registro foi então realizado pelas câmeras opticoeletrônicas e pelas plataformas de força.

Durante a avaliação do andar e do correr, os sujeitos da pesquisa foram instruídos a utilizar sua velocidade habitual. Para se adaptarem ao procedimento, os sujeitos realizavam no mínimo cinco passagens, inicialmente andando e posteriormente correndo no percurso no qual as duas plataformas de força estavam fixadas ao solo. Logo após, foram iniciadas as coletas de dados. Para tal, foram realizados oito registros de cada MI na fase de apoio da marcha e da corrida.

4.4.2 Eletromiografia

Os dados EMG foram obtidos com o eletromiógrafo Noraxon *Desk Receiver* com frequência de amostragem de 3000Hz.

O equipamento foi conectado ao sistema Vicon através do módulo Vicon *Ultranet HD* e os valores de EMG registrados no software Vicon Nexus 1.8.5.

O músculo analisado foi o gastrocnêmio vasto medial (GM), e o posicionamento dos eletrodos e a preparação da pele foram executados de acordo com os procedimentos da SENIAM (Eletromiografia superficial para a avaliação não invasiva de músculos) que é um acordo europeu no Programa Biomédico de Saúde e Pesquisa da União Europeia.

Cada sessão de coleta de dados iniciou com a preparação dos sujeitos da pesquisa, com a identificação dos locais a serem colocados os eletrodos nos músculos, realização da tricotomia, escarificação da pele com o uso de uma lixa suave (lixa d'água) e aplicação de álcool 96°Gl. Tais procedimentos foram necessários para remover a camada sebácea e o excesso de células mortas da pele e, conseqüentemente, diminuir a impedância da interface eletrodo-pele, a fim de diminuir o nível de ruído nos sinais eletromiográficos. Em seguida, os eletrodos de superfície foram colocados sobre a pele dos sujeitos e fixados por meio de uma fita adesiva usada externamente a estes para evitar o movimento do mesmo na pele. Para garantir a adesão na pele, foi realizada uma segunda fixação, com fita adesiva do tipo esparadrapo.

Com base em protocolos já testados na literatura (MCLEAN et al., 2003; BURDEN, 2010), para o músculo testado, o sujeito da pesquisa realizou quatro tentativas de execução do movimento: duas tentativas submáximas, mantendo-se o esforço por 10s, seguidas de duas tentativas máximas, mantidas por um período de 5s. e 10s., respectivamente. Todas as tentativas foram executadas com motivação verbal. Para a normalização do sinal obtido na corrida, foi utilizado o trecho do 4° ao 8° segundo do sinal eletromiográfico do músculo na última tentativa do teste máximo (MCLEAN et al., 2003; BURDEN, 2010).

As variáveis analisadas foram a média da raiz quadrada (RMS) do sinal durante toda fase de apoio e durante as fases de frenagem e propulsão. Os valores são apresentados em percentual da Contração Isométrica Voluntária Máxima (CIVM).

Os dados de caminhada e corrida foram normalizados e separados por passadas, baseado nos valores determinados pela FRS. Os dados do envoltório foram normalizados pelo tempo

total de cada apoio, como os dados da FRS. Os dados foram normalizados pela CIVM e filtrados com um filtro *band pass* do tipo *Butterworth* de 4ª ordem com frequência de corte entre 20Hz e 450Hz e filtro notch para frequência de 60Hz e suas harmônicas. Nos dados de eletromiografia das CVIMs, foram descartados os quatro segundos iniciais e os dois segundos finais de cada contração, e para os quatro segundos restantes foi calculada a RMS por janelamento móvel, com janelas de 200ms e com 50% de sobreposição. Para normalização, foi utilizado o maior valor de RMS.

4.5 Análise da expressão gênica

4.5.1 Extração do RNA total

Cerca de 100µg do tecido muscular coletados na biópsia de cada MI dos sujeitos da pesquisa foram armazenados com Trizol[®] (Invitrogen), homogeneizados, e o RNA total foi extraído conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA nas amostras foi determinada pela leitura de absorbância em 260nm e 280nm, (espectrofotômetro *NanoDrop* ND-1000), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260/280. O RNA isolado foi armazenado a -80°C para posterior análise por qRT-PCR.

4.5.2 Síntese de cDNA

A análise prosseguiu com a síntese de cDNA, realizada por transcrição reversa, com o uso do *High Capacity cDNA Reverse Transcription kits (Life Technology)*, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para tal, o RNA foi diluído em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) na concentração de 2µg/20µL.

4.5.3 Amplificação PCR-RT

Após extração de RNA e síntese de cDNA, iniciou-se a reação de RT-PCR em tempo real, com o equipamento *AB 7300 sequence detector system (Applied Bio Systems)*. A concentração de RNAm foi avaliada em triplicata, por detecção química dos produtos da PCR, com uso de *Syber Green I (Molecular Probe)*. Os *primers* utilizados para as reações de PCR estão relacionados na tabela 1. No final de cada análise, a curva de “*melting*” foi analisada para avaliar a especificidade da reação. Os parâmetros da reação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 42 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C

por 50 segundos. Para finalizar, um estágio de dissociação com 1 ciclo de 95 °C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A fluorescência foi quantificada e análises das amplificações foram realizadas em aparelho ABI Prism 7300 Sequence *Detector System* (*Applied Biosystems*), conforme descrito por Bustin (2000). A concentração de RNAm foi determinada pelo método de comparação dos limiares dos ciclos (Ct). Para cada amostra, um valor de ΔCt foi obtido a partir da subtração do valor do Ct dos genes 18S e GAP-DH (usado como controle interno) pelo valor do Ct dos genes de interesse. A média dos valores dos ΔCt do grupo controle foi subtraída dos valores de cada amostra, tendo sido obtidos valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada amostra. Todos foram sintetizados a partir da sequência descrita no *Genebank* ³.

Tabela 1- Lista de *Primers* utilizados

Gene	espécie	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'	Acc. No.
FABP3	Homo Sapiens	FW: AGTCAGTCGGTGTGGGTTTT	Rev: TTGACCTTCCTGTCATCTGC	NM_004102.3
FATP1	Homo Sapiens	FW: TCTTCGGTCTCTCTGTGCTG	Rev: AGAGGTGGCTACCGCATT	NM_198580.1
CS	Homo Sapiens	FW: GCTTCCTCCACGAATTGAA	Rev: CCAATCCCTTCATGCCTCT	NM_004077.2
LDH	Homo Sapiens	FW: ATTCCCATTCTTTTGGIT	Rev: CACCAACCCCAACAACGTGA	NM_001165415.1
LPL	Homo Sapiens	FW: GGGCATGTTGACATTTACCC	Rev: TGGAACTGCACCTGTAGGC	NM_000237.2
HOMER2	Homo Sapiens	FW: CAGCTATCGGATCATCAGTGTG	Rev: CACTGTGTTGGCTCTGCTGT	NM_004839.3
HSL	Homo Sapiens	FW: CATTGGGCTGGTGTCTT	Rev: TAGCACTTCCATCTCGGTA	NM_005357.2
CTP1	Homo Sapiens	FW: GAGGCTCAATGACCAGAATG	Rev: GTGGAATCGGTACAGGAA	NM_001031847
CTP2	Homo Sapiens	FW: GATGGCCAGTTCAGGAAAC	Rev: AGGGTCCCGAAATGTAGCTT	NM_000098

4.6 Análise imunohistológica

As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 18 horas, colocadas em etanol por 24 horas. Posteriormente, foram submetidas a banhos de etanol 96% e 100%, xilol, paraplast e armazenadas em estufa a 60°C por 5 horas.

Após a montagem dos blocos de parafina, o material foi cortado em cortes não seriados para montagem das lâminas e realizada coloração por hematoxilina e eosina para definição correta do posicionamento do corte sentido transversal. Cortes de 4-5µm de espessura foram

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

colocados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano-Sigma *Chemical Co.*; St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado.

O processo de desparafinização foi realizado ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60°C, durante 5 minutos e passadas rapidamente em três banhos de xilol em temperatura ambiente. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool etílico absoluto, um banho de etanol 95° e um banho de etanol 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4.

O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos, realizada por digestão enzimática (*Fast* na tripsina, 0,25% Sigma T 7409) e *Slow* na pepsina (0,01 N-ph 2,2 Sigma P7000), ambos 30' em estufa 37°C.

O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10v (3%). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários *Slow* (NOQ7.5.4D, 1:150, concentrado, Sigma-Aldrich St. Louis, MO cat # M8421) *intermediate* (A4.74 DSHB, sobrenadante, 1:10), *Fast* (My32, 1:150, concentrado, Sigma-Aldrich St. Louis, MO cat # M4828) diluídos em 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 24 horas a 4°C e posteriormente incubados com o anticorpo secundário *EASYLINK ONE* Polímero HRP (*EASYPATH*- SP-BRASIL) e utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Posteriormente ocorreu a contra coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha), para todos os casos.

Para a produção das imagens, foi utilizado o equipamento ZEISS Axio Scan Z.1e o software Zen 2 do fabricante (figura 5). Para análise da área e contagem das fibras das amostras musculares, foi utilizado *software Image Proplus* 6.0. Para cada sujeito da pesquisa, três cortes transversais foram contados, sendo analisadas no mínimo 200 células de cada sujeito para obtermos valor médio da área e da porcentagem das fibras musculares. Para a definição da fibra IIX, ao se sobrepor as imagens b e c da figura 5, as fibras IIX são aquelas que marcam na imagem c, mas não marcam na imagem b.

Figura 5- Fotomicrografia de cortes seriados transversos de fibrass do músculo GM do lado DM de sujeitos AT, com aumento de 20x. Técnica de marcação por imunohistoquímica. a) marcação primária para fibra tipo I- lenta (NOQ7.5.4D, 1:150, concentrado, Sigma-Aldrich St. Louis, MO cat # M8421). b) marcação primária para fibra tipo IIA- intermediária (A4.74 DSHB, sobrenadante, 1:10); c) marcação primária para fibra II- rápida (My32, 1:150, concentrado, Sigma-Aldrich St. Louis, MO cat # M4828). Escala de barra: 100 µm.

4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Para os parâmetros de caracterização da amostra: idade (anos), peso (kg), altura (cm), IMC (kg/m^2) e esforço (mets x minutos por semana), empregou-se teste t de Student para comparar os grupos MA e AT. Para os parâmetros de EMG (%) e impulso da corrida (N.s/kg), empregou-se teste t de Student pareado para avaliar o efeito da lateralidade.

Para os parâmetros de comprimento dos MMII (cm), EMG (%), impulso da marcha (N.s/kg), expressão gênica das proteínas; CS, FATP, HSL, FABP, HOMER2, LPL e LDH (mRNA/18S), cpt1 e cpt2 (mRNA/GAPDH), área das fibras tipo I, IIA e IIX (μm^2) e porcentagem de fibras tipo I, IIA e IIX, empregou-se ANOVA dois fatores (esforço e lateralidade), com medidas repetidas para lateralidade. A comparação da área das fibras (μm^2) entre os tipos I, IIA e IIX foi realizada empregando-se ANOVA três fatores (tipo de fibra, esforço e lateralidade) com medidas repetidas para lateralidade. As análises prosseguiram quando necessárias, com comparações múltiplas pelo método de Bonferroni.

O coeficiente de correlação de Spearman foi obtido para avaliar a relação entre as variáveis de interesse e a relação entre os membros.

A homogeneidade de variâncias foi verificada, e quando necessário, utilizou-se transformação logarítmica para os dados de expressão gênica e arco seno da raiz quadrada da proporção para os dados de EMG e porcentagem de fibras.

O nível de significância adotado foi 5%.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com a assistência do setor de estatística do ICB-USP, sob a supervisão da Sra. Rosana Duarte Prisco.

5 RESULTADOS

5.1 Nível de esforço

Em relação ao esforço dos dezesseis sujeitos da pesquisa, o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) revelou oito AT e oito MA, sendo significativa a diferença de nível de esforço ($p = 0,010$) entre MA e AT (Figura 6).

Figura 6. Distribuição dos sujeitos da pesquisa em relação ao nível de esforço nos grupos AT e MA de acordo com o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) ($n=16$). Esforço medido em METs x minutos por semana. AT = 1618,6 (DP=1000,9), $n=8$; MA= 5750,9 (DP=3388,5), $n=8$. *Teste t de Student, MA $\neq$ AT, $p = 0,010$.

5.2 Lateralidade dos membros inferiores

O uso do questionário de Waterloo (Anexo C) para determinar a lateralidade DM ou ND dos MMII revelou 15 sujeitos DM no MI direito e um sujeito MA com lateralidade DM no MI esquerdo.

5.3 Característica da amostra

As características dos sujeitos da pesquisa, como idade (anos), peso (kg), IMC (kg/m^2) e altura (cm) estão descritas na tabela 2. Com relação a essas características, não foram detectadas diferenças entre MA e AT.

	AT	MA	p
Idade (anos)	30±8,5	37,1±9,4	0,159
Peso (Kg)	69,2±18.5	73,7±11,4	0,563
IMC (Kg/m²)	24,5±3,9	24,7±1.2	0,896
Altura (cm)	166,9±13,2	172,4±13,2	0,418

Tabela 2- Características dos sujeitos da pesquisa, AT (n=8) e MA (n=8). Não foram detectadas diferenças significantes de idade, peso, altura e composição corporal. Valores expressos como média e desvio padrão. p: nível descritivo do teste t-Student.

Para o comprimento dos MMII, não foi detectado efeito de interação significativa entre esforço e lateralidade com $p=0,537$ tampouco diferença significativa para o esforço ($p=0,434$). Para lateralidade, foi detectada diferença significativa de comprimento dos MMII entre os membros DM e ND, independentemente do esforço $p=0,040$ (Figura 7).

Figura 7- Comprimento dos MMII DM e ND, em centímetros, para os grupos AT (n=8) e MA (n=8). Valores expressos como média e desvio padrão. *Anova: DM≠ND, independente do esforço, $p=0,040$.

5.4 Dados biomecânicos da marcha

5.4.1 EMG

Para a eletromiografia (EMG) da marcha, não foi detectado nenhum efeito significativo (ANOVA), como observado na figura 8.

Com relação à EMG total (figura 8a), não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,768$; não foi detectada diferença significativa de lateralidade, $p=0,687$, tampouco de esforço, $p=0,260$.

Quanto à EMG de frenagem, (figura 8b), não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,917$; não foi detectada diferença significativa de lateralidade, $p=0,340$, nem de esforço, $p=0,998$.

Para a EMG de propulsão (figura 8c), não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,416$; não foi detectada diferença significativa de lateralidade, $p=0,732$, nem de esforço, $p=0,766$.

Figura 8- EMG do músculo GM nos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=8). Valores em porcentagem em relação à contração máxima do músculo (CIVM) expressos como média e desvio padrão.

5.4.2 Medidas de impulso

A análise do impulso vertical de frenagem da marcha não detectou nenhuma diferença significativa (Figura 9). Por ANOVA, não foi detectado efeito de interação entre lateralidade e esforço, $p=0,228$; nem efeito de lateralidade, $p=0,587$ e esforço, $p=0,983$.

Figura 9- Componente vertical da força de reação ao solo durante a fase de frenagem na marcha dos membros DM e ND para os grupos AT ($n=8$) e MA ($n=8$). Os valores de impulso são apresentados em Newton (N) x segundos (s) divididos pelo peso corporal em quilogramas (Kg) e expressos como média e desvio padrão.

A análise do impulso horizontal de frenagem na marcha detectou efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p < 0,007$ (Figura 10). Em relação à lateralidade, houve diferença significativa somente em sujeitos AT que apresentaram valores mais baixos para o membro ND ($p < 0,05$). Esse resultado indica que existe uma predominância de frenagem horizontal no membro ND em comparação com o membro DM em AT. Para o esforço, sujeitos MA apresentaram valores maiores que sujeitos AT somente no membro ND ($p < 0,05$). O treinamento aeróbico de resistência diminuiu a frenagem do membro ND em MA em comparação com o membro ND em AT. Assim, podemos afirmar que os membros ND e DM se comportam de forma distinta, quando se adaptam ao treinamento de resistência.

Figura 10- Componente horizontal da força de reação ao solo durante a fase de frenagem da marcha dos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=8). Os valores de impulso são apresentados em Newton (N) x segundos (s) divididos pelo peso corporal em quilogramas (Kg) e expressos como média e desvio padrão. *Bonferroni, $p < 0,05$

Para o impulso vertical de propulsão da marcha, independentemente do esforço, o membro DM apresentou menor capacidade de impulso do que o membro ND (figura 11).

Figura 11- Componente vertical da força de reação ao solo durante a fase de propulsão da marcha dos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=8). Os valores de impulso são apresentados em Newton (N) x segundos (s) dividido pelo peso corporal em quilogramas (Kg) e expressos como média e desvio padrão. *ANOVA, $DM \neq ND$, independente do Esforço, $p = 0,010$.

Para o impulso horizontal de propulsão da marcha, foi detectado efeito de interação significativa entre esforço e lateralidade, $p = 0,017$. Em relação à lateralidade, não foi detectada diferença significativa entre os membros DM e ND (Figura 12). Em relação ao esforço, MA apresentou maior valor de impulso do que AT somente no membro DM, $p < 0,05$. Como no membro ND não foi detectada diferença significativa entre MA e AT, esse resultado nos mostra,

mais uma vez, que há heterogeneidade na resposta ao treinamento de corrida de resistência dos membros (figura 12).

Figura 12- Componente horizontal da força de reação ao solo durante a fase de propulsão na marcha dos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=8). Os valores de impulso são apresentados em Newton (N) x segundos (s) dividido pelo peso corporal em quilogramas (Kg) e expressos como média e desvio padrão. *Bonferroni, $p < 0,05$.

5.5 Dados da biomecânicos da corrida

5.5.1 EMG

Na figura 13 podemos observar os resultados da EMG dos membros DM e ND dos sujeitos MA.

Empregando-se teste t de Student pareado, para a EMG total da corrida (figura 13 a), não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, $p=0.559$. Para a EMG de frenagem da corrida (figura 13 b), não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, $p=0,714$. Para a EMG de propulsão da corrida (figura 13 c), não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, $p=0,675$.

Figura 13- EMG do músculo GM dos membros DM e ND, durante a corrida, para os grupos AT (n=8) e MA (n=8). a- EMG total; b- EMG durante a fase de frenagem; c- EMG durante a fase de propulsão. Valores em porcentagem em relação à contração máxima do músculo (CIVM), expressos como média e desvio padrão.

5.5.2 Medidas de impulso

Na figura 14 podemos observar os resultados dos impulsos das componentes vertical e horizontal da força de reação ao solo da corrida durante as fases de frenagem e propulsão do grupo MA em relação aos membros DM e ND.

Empregando-se o teste t de Student pareado, para o impulso vertical de frenagem da

corrida (figura 14 a), não foi detectada diferença significativa entre os membros DM e ND, $p=0,456$. No impulso vertical de propulsão da corrida (figura 14 b), não foi detectada diferença significativa entre os membros DM e ND, $p=0,208$.

No impulso horizontal de frenagem da corrida (figura 14 c), não foi detectada diferença significativa entre os membros DM e ND, $p=0,535$. Para o impulso horizontal de propulsão da corrida (figura 14 d), não foi detectada diferença significativa entre os membros DM e ND, $p=0,261$.

Figura 14- Componente vertical e horizontal da força de reação ao solo da corrida durante as fases de frenagem e propulsão dos membros DM e ND para os grupos AT ($n=8$) e MA ($n=8$). a- Impulso vertical de frenagem; b- impulso vertical de propulsão; c- impulso horizontal de frenagem; d- impulso horizontal de propulsão. Os valores de impulso são apresentados em Newton (N) x segundos (s) dividido pelo peso corporal em quilogramas (Kg) e expressos como média e desvio padrão.

5.6 Resultados da expressão gênica das proteínas do músculo GM.

		AT		MA	
		DM	ND	DM	ND
CS mRNA/18S	Média	1,150	1,930	2,968	1,299
	DP	0,579	1,254	1,080	0,432
FABP mRNA/18S	Média	1,335	1,628	1,676	0,377
	DP	0,937	1,199	1,154	0,381
FATP mRNA/18S	Média	7,143	6,411	10,796	6,828
	DP	11,758	12,133	13,749	13,968
HSL mRNA/18S	Média	7,081	3,722	7,860	7,481
	DP	11,804	10,932	10,768	6,923
Homer2 mRNA/18S	Média	1,619	1,793	3,058	1,570
	DP	1,618	1,194	2,552	1,448
LPL mRNA/18S	Média	1,904	3,859	3,969	1,591
	DP	1,734	3,410	3,486	1,082
LDH mRNA/18S	Média	1,736	2,377	3,703	2,080
	DP	1,356	1,780	1,184	1,122
CPT1 mRNA/GAPDH	Média	1,274	1,463	1,389	0,890
	DP	0,821	1,129	1,371	0,664
CPT2 mRNA/GAPDH	Média	1,204	1,249	0,752	0,429
	DP	0,895	1,812	0,688	0,747

Tabela 3- Valores da expressão gênica, em unidades arbitrárias, nos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=7), de citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH), proteína ligadora de ácidos graxos e proteína transportadora de ácidos graxos (FABP e FATP), lipase hormônio sensível (HSL), lipase lipoprotéica (LPL), homer 2, carnitina palmitoil transferase (CPT1), carnitina palmitoil transferase (CPT2). A concentração de RNAm foi determinada pelo método de comparação dos limiares dos ciclos (Ct) para se obter valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada amostra. Valores expressos como média e desvio padrão. CS, FABP, FATP, HSL, Homer2, LPL e LDH em mRNA/18S; CPT1 e CPT2 em mRNA/GAPDH.

Na figura 15 podemos observar os resultados da expressão gênica de CPT1, HSL e FATP, expressos em média e desvio padrão. Empregou-se ANOVA para avaliar o efeito da lateralidade e do esforço.

Para a expressão gênica de CPT1, não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,361$; não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, $p=0,568$, nem entre MA e AT, $p=0,676$.

Para HSL (figura 15 a), não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,656$; não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, $p=0,577$, nem entre MA e AT, $p=0,659$.

Para CPT1 (figura 15 b), não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,361$; não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, $p=0,676$, nem entre MA e AT, $p=0,568$.

Para FATP (figura 15 c), não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,589$; não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, $p=0,436$, nem entre MA e AT, $p=0,739$.

Figura 15- Valores da expressão gênica, em unidades arbitrárias, nos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=7). a-Lipase hormônio sensível (HSL); b-carnitina palmitoil transferase (CPT1); c-proteína transportadora de ácidos graxos (FATP). A concentração de RNAm foi determinada pelo método de comparação dos limiares dos ciclos (Ct) para se obter valores de $\Delta\Delta C_t$ para cada amostra. Valores expressos como média e desvio padrão.

Empregando-se ANOVA, detectou-se efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço para a expressão de genes de proteínas relacionadas com o metabolismo oxidativo: CS ($p=0,005$), FABP ($p=0,005$), Homer 2 ($p=0,024$) e LPL ($p=0,042$); e com o metabolismo glicolítico: LDH ($p=0,046$). Em seguida empregou-se pós teste Bonferroni. Na figura 16 observa-se a diferença de comportamento dos membros DM e ND em função do esforço.

Para CS (figura 16 a), o pós-teste detectou diferença significativa entre DM e ND, apenas no MA, com a expressão mais alta no membro DM, $p<0,05$. Em relação ao esforço, houve diferença significativa entre AT e MA apenas no membro DM, $p<0,05$, com maior expressão gênica do MA, mais uma vez apontando heterogeneidade na adaptação ao treinamento de resistência.

Para FABP (figura 16 b), o pós-teste detectou diferença significativa entre os membros DM e ND no grupo MA, $p<0,05$, com maior expressão gênica no membro DM, apontando que treinamento de resistência exacerba a heterogeneidade metabólica entre os membros. Em relação ao esforço, a heterogeneidade foi detectada apenas para membros ND, em que o treinamento de resistência diminui a expressão do gene FABP, $p<0,05$.

Para Homer 2 (figura 16 c), o pós-teste mostrou $p=0,061$ na comparação entre AT e MA no membro DM.

Para LPL (figura 16 d), foi significativa a diferença de comportamento dos membros DM e ND em função do esforço, apesar de o pós-teste não detectar as diferenças significantes entre eles.

Para LDH (figura 16 e), foi significativa a diferença de comportamento dos membros DM e ND em função do esforço, apesar de o pós-teste não detectar as diferenças significantes entre eles.

Esses dados corroboram a hipótese de heterogeneidade na adaptação metabólica à corrida de resistência.

Figura 16- Valores da expressão gênica, em unidades arbitrárias; nos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=7). a- citrato sintase (CS); b- proteína ligadora de ácidos graxos (FABP); c- HOMER2; d- lipase lipoprotéica (LPL); e- lactato desidrogenase (LDH). A concentração de RNAm foi determinada pelo método de comparação dos limiares dos ciclos (Ct) para se obter valores de $\Delta\Delta C_t$ para cada amostra. Valores expressos como média e desvio padrão. *Bonferroni, $p < 0,05$.

Quanto à expressão do gene CPT2, não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço com $p=0,540$, nem para a lateralidade com $p=0,643$. Para o esforço, há diferença entre MA e AT, independente da lateralidade, $p=0,046$. O treinamento de corrida de resistência diminui a expressão do gene CPT2. (Figura 17).

Figura 17- Valores da expressão gênica, em unidades arbitrárias, da carnitina palmitoil transferase (CPT2) nos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=7). A concentração de RNAm foi determinada pelo método de comparação dos limiares dos ciclos (Ct) para se obter valores de $\Delta\Delta C_t$ para cada amostra. Valores expressos como média e desvio padrão. *ANOVA, MA $\neq$ AT, independente da lateralidade, p=0,046.

5.7 Resultados da imunohistoquímica

5.7.1 Área das fibras

Com relação à área dos miócitos, a figura 18 ilustra a marcação dos três tipos de fibras, tipo I (figura 18 a), tipo IIA (figura 18 b) e tipo IIX (figura 18 c). Por teste de ANOVA, não foi detectado nenhum efeito significativo.

Em relação à área média das fibras tipo I, não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, p=0,747, nem diferença significativa entre DM e ND, p=0,611, bem como não foi detectada diferença significativa entre MA e AT, p=0,810 (figura 18 a).

Para as fibras tipo IIA, não foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, p=0,897, não foi detectada diferença significativa entre DM e ND, p=0,558, e tão pouco para o esforço, p=0,530 (figura 18 b).

Para as fibras tipo IIX, tampouco foi detectado efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, p=0,574, nem para lateralidade, p=0,635, nem para o esforço, p=0,413 (figura 18 c).

Figura 18- Área das fibras do músculo GM, em μm^2 , nos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=7). a- fibras tipo I; b- fibras tipo IIa; c- fibras tipo IIx. Valores expressos como média e desvio padrão.

Empregou-se ANOVA três fatores para comparar a área das fibras tipo I, IIa e IIx, em relação ao esforço e a lateralidade (figura 19). Não foi detectado efeito de interação significativa entre tipo de fibra, esforço e lateralidade, $p=0,461$, nem entre tipo de fibra e lateralidade, $p=0,811$. Também não foi detectado efeito de interação significativa entre tipo de fibra e esforço,

$p=0,084$, bem como não foi detectada diferença significativa de área das fibras do tipo I, IIA e IIX, $p=0,210$.

Esses resultados apontam para a área das fibras média independente do tipo de fibra, esforço ou lateralidade, de $2840 \pm 818 \mu\text{m}^2$.

Figura 19- Área das fibras tipo I, IIA e IIX do músculo GM, em μm^2 , nos membros DM e ND para os grupos AT ($n=8$) e MA ($n=6$). Valores expressos como média e desvio padrão.

A figura 20 mostra a relação da área das fibras entre os tipos I, IIA e IIX, do músculo GM, para os membros DM e ND dos participantes AT e MA.

Podemos observar que, tanto para o membro DM (gráfico da esquerda), quanto para o membro ND (gráfico da direita), há forte correlação positiva entre área das fibras mostrando que a área de um tipo de fibra acompanha a área do outro tipo de fibra num mesmo membro, ou seja, a área de um tipo de fibra é diretamente proporcional à área de outro tipo de fibra, tanto para AT quanto para MA.

Como visto anteriormente, figura 19, não foi detectada diferença significativa entre a área das fibras de tipo I, IIA e IIX, independentemente da lateralidade e esforço; na figura 20, em um mesmo membro, há um alto grau de associação entre a área das fibras de tipo-I, IIA e IIX, tanto para AT como para MA.

Figura 20- Correlação entre a área das fibras tipo I, IIA e IIX do músculo GM, em μm^2 , nos membros DM (coluna à esquerda) e ND (coluna à direita) para os grupos MA e AT. Fibras tipo I e IIA, AT (n=8) e MA (n=7). Fibras IIX, AT (n=8) e MA (n=6). r=coeficiente de correlação de Spearman; p=nível descritivo do teste de significância do coeficiente de correlação. Correlação significativa para $p<0,05$.

Já na figura 21 podemos observar a correlação da área das fibras entre os membros DM e ND para as fibras de tipo I, IIA e IIX. No grupo AT não houve correlação significativa de área das fibras entre os membros DM e ND. No grupo MA há correlação significativa de área somente das fibras tipo I entre os membros DM e ND, $r=0,893$, $p=0,029$. Para a fibra de tipo IIA, $r=0,786$, $p=0,054$; e tipo IIX, $r=0,829$, $p=0,064$. Esse resultado nos mostra que, quanto à área das fibras, não foi significativa a relação entre os membros DM e ND no grupo AT. No grupo MA, devido aos valores de correlação altos e os valores de p estarem próximos de 0,05, sugere-se uma investigação com maior amostra.

Figura 21- Correlação da área das fibras entre os membros DM e ND para o tipo I, IIA e IIX, em μm^2 , do músculo GM, para os grupos AT e MA. Fibras tipo I e IIA, AT (n=8) e MA (n=7). Fibras IIX, AT (n=8) e MA (n=6). r=coeficiente de correlação de Spearman; p=nível descritivo do teste de significância do coeficiente de correlação. Correlação significativa para $p<0,05$.

5.7.2. Distribuição das fibras

Na figura 22 observa-se a distribuição, por sujeito da pesquisa, da porcentagem de fibras do tipo I, IIA e IIX no músculo GM dos membros DM e ND para os grupos AT e MA. Nota-se, nos sujeitos MA, ligeira diminuição na porcentagem de fibras do tipo IIX, com pequeno aumento da porcentagem de fibras IIA.

Figura 22- Distribuição, por sujeito da pesquisa, da porcentagem de fibras do tipo I, IIA e IIX do músculo GM nos membros DM e ND para os grupos AT (n=8) e MA (n=7).

Empregando-se a ANOVA, observa-se que esses resultados foram significantes, figura 23. Para as fibras tipo I (figura 23 a), não houve efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,157$, nem diferença significativa entre DM e ND, $p=0,747$, nem entre MA e AT, $p=0,968$.

Para as fibras tipo IIA (figura 23 b), não houve efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, $p=0,413$, nem entre DM e ND, $p=0,250$. Para o esforço, houve diferença significativa entre os grupos MA e AT, $p=0,049$, independentemente da lateralidade. Os sujeitos MA apresentam aproximadamente 8,7% mais fibras IIA do que os sujeitos AT.

Para as fibras do tipo IIX (figura 23 c), não houve efeito de interação significativa entre

lateralidade e esforço, $p=0,449$, nem diferença significativa entre DM e ND, $p=0,879$. Para o esforço, houve diferença significativa entre MA e AT, $p=0,024$; nesse caso, os sujeitos MA apresentaram aproximadamente 8,9% menos fibras IIX que os sujeitos AT.

Resultados mostram que independentemente da lateralidade, com o treinamento de corrida de resistência os sujeitos MA aumentaram a quantidade de fibras IIA ao mesmo tempo em que diminuíram proporcionalmente a quantidade de fibras IIX fato que ocorre pela plasticidade das fibras em consequência da prática do treinamento de corrida de resistência.

Figura 23- Porcentagem de fibras tipo I, IIA e IIX do músculo GM, nos membros DM e ND para os grupos AT

(n=8) e MA (n=7).

5.8 Resultados para o grupo AT

No impulso horizontal de frenagem da marcha, encontramos diferença significativa entre os membros DM e ND, com o membro DM apresentando impulso horizontal 21% maior do que o membro ND, ou seja, o membro DM, por apresentar um valor maior de impulso, apresenta menor frenagem do que o membro ND, como visto na figura 10.

O impulso vertical de propulsão da marcha do membro DM é 29% menor que o membro ND (figura 11), ou seja, o membro DM freia menos que o membro ND na fase de propulsão.

Com isso podemos dizer que, tanto na fase de frenagem quanto na fase de propulsão, o membro DM freia menos que o membro ND.

Com relação à expressão gênica das proteínas testadas para os sujeitos AT, não foram detectadas diferenças significantes entre os membros, o que é consistente com estudos anteriores em idosos sedentários cujo estudo não definiu o predomínio da lateralidade do MI (TARNOPOLSKY et al. 2007), ou ainda em estudo com adultos jovens sedentários que foram avaliados para lateralidade dos membros superiores (LEXELL; TAYLOR, 1991).

Esse equilíbrio metabólico pôde ser observado nos resultados das correlações entre as expressões gênicas nos membros DM e ND. Os membros não demonstram especializações metabólicas detectáveis (figura 24), com correlação positiva na expressão gênica entre o metabolismo oxidativo - CS e o metabolismo glicolítico - LDH (DM, $r=0,810$, $p=0,032$ e ND, $r=0,881$, $p=0,020$).

Demais correlações não foram de interesse no grupo AT.

Figura 24- Correlação entre as expressões gênicas, em unidades arbitrárias, das proteínas do musculo GM para o grupo AT (n=8). A concentração de RNAm foi determinada pelo método de comparação dos limiares dos ciclos (Ct) para se obter valores de $\Delta\Delta Ct$ para cada amostra. r=coeficiente de correlação de Spearman; p=nível descritivo do teste de significância do coeficiente de correlação. Correlação significativa para $p<0,05$.

5.9 Resultados para o grupo MA

Na fase de frenagem da marcha, não foram detectadas diferenças significantes para o impulso vertical nem para o impulso horizontal entre os membros DM e ND, como mostram as figuras 9 e 10.

Na fase de propulsão da marcha, o impulso vertical foi aproximadamente 20% menor no membro DM em relação ao membro ND.

Na corrida não foram detectadas assimetrias significantes para os impulsos testados, conforme observamos na figura 14.

Com relação ao metabolismo, para a expressão gênica de CS (figura 16 a), foram detectadas diferenças significantes entre os membros DM e ND, com a expressão no lado DM aproximadamente 59% maior que a do membro ND.

Para a expressão gênica de FABP (figura 16 b), encontramos assimetria entre os membros DM e ND. A expressão gênica no membro DM é 4,4 vezes a expressão gênica do membro ND.

Para a expressão gênica de Homer 2 (figura 16 c), LPL e LDH houve efeito de interação significativa entre lateralidade e esforço, porém o pós-teste não foi capaz de identificar a natureza da assimetria. Porém observa-se na figura 16 que em todos os gráficos o membro DM apresenta valores maiores de expressão gênica.

Além disso, nota-se também no membro DM que o aumento da expressão gênica da proteína, CS, é acompanhado pela diminuição da expressão gênica das proteínas de armazenamento do TAG, HSL e FATP. Esse perfil metabólico pode ser visto nas correlações da figura 25 a e b. Na figura 25 c, há correlação perfeita entre a expressão gênica das proteínas de armazenamento ($r=1,000$, $p=0,000$). A expressão gênica proteica lipolítica, FABP, aumenta com o aumento do sinal EMG correspondente à contração do músculo GM na fase de frenagem da corrida (figura 25 d e e).

Figura 25- Correlações entre dos valores de $\Delta\Delta C_t$ a partir do número de ciclos da expressão gênica das proteínas do músculo GM para o grupo MA, membro DM (n=7). Diferença significante quando $p \leq 0,05$.

Já no membro ND a expressão gênica de Homer 2, proteína relacionada com a atividade da densidade pós-sináptica da fibra tipo I, correlaciona-se positivamente com o sinal EMG do músculo na fase de frenagem da corrida (figura 26 a), negativamente com a frenagem da corrida (figura 26 b), e positivamente com a expressão gênica de FATP ligada ao armazenamento do TAG na célula (figura 26 c).

Figura 26-Correlações entre dos valores de $\Delta\Delta Ct$, a partir do número de ciclos da expressão gênica das proteínas do músculo GM, impulsos e EMG para o grupo MA membro ND (n=7). Diferença significante quando $p \leq 0,05$.

Com relação à porcentagem de fibras (figura 23) e à EMG de corrida (figura 13), apesar de não detectar diferenças significantes em função do esforço e da lateralidade, a análise de correlações aponta para a presença de heterogeneidade nas respostas ao treinamento de resistência.

Na figura 27a observa-se que não há correlação significativa entre os resultados da EMG de frenagem da corrida e da EMG total da corrida no GM do membro ND. Já no GM do membro DM (figura 27 b), observa-se correlação perfeita entre o resultado da EMG de frenagem da corrida e o resultado do sinal da EMG total da corrida. Porém observa-se que não há correlação significativa para os resultados da EMG de frenagem da corrida no GM entre os membros DM e ND (figura 27 c).

Figura 27- Correlações entre dos valores de EMG de frenagem e total da corrida nos membros DM e ND do grupo MA (n=7). Valores expressos pela média da porcentagem em relação à contração máxima do músculo (CIVM). Diferença significativa quando $p \leq 0,05$.

A EMG de frenagem da corrida e consequentemente a EMG total da corrida correlacionaram-se fortemente com a porcentagem de fibras Tipo I no membro DM, ou seja, quanto maior o sinal EMG do músculo GM durante a fase de frenagem da corrida maior é o percentual de fibras tipo I (figura 28 a e 28 b). Essa mesma correlação não ocorreu no membro ND (figura 28 c e 28 d).

Figura 28- Correlações entre dos valores de EMG nos membros DM e ND do grupo MA (n=7). Valores expressos pela média da porcentagem em relação à contração máxima do músculo (CIVM). Diferença significativa quando $p \leq 0,05$.

A EMG de frenagem da corrida e consequentemente a EMG total da corrida também se correlacionaram fortemente com a porcentagem de fibras IIA, porém inversamente proporcional e novamente somente no membro DM (figura 29 a e 29 b). Quanto maior o recrutamento de fibras do músculo GM na fase de frenagem da corrida menor a porcentagem de fibras IIA. O mesmo não ocorreu com as fibras do GM do membro ND (figura 29 c e 29 d).

Figura 29- Correlações entre dos valores de EMG nos membros DM e ND do grupo MA (n=7). Valores expressos pela média da porcentagem em relação à contração máxima do músculo (CIVM). Diferença significante quando $p \leq 0,05$.

Os sujeitos da pesquisa que registraram maior contração do músculo GM na fase de frenagem, apresentaram maior porcentagem de fibras tipo I e menor porcentagem de fibras tipo IIA, sugerindo plasticidade no sentido de adaptação de fibras oxidativas, mais aptas ao treinamento de corrida de resistência, somente no membro DM. Dessa maneira podemos ver que há adaptação heterogênea das fibras musculares do GM dos MMII

Demais correlações não foram de interesse no grupo MA.

5.10 Resultados entre os grupos AT e MA

Em relação à diferença entre os grupos MA e AT, houve diferença significativa no membro ND para impulso horizontal de frenagem da marcha, com MA freando menos do que AT, (figura 10). Nesse caso, a atividade física mais regular cancela o efeito da assimetria que estava presente no grupo AT e torna os membros homogêneos.

Para o impulso horizontal de propulsão da marcha (figura 12), houve diferença significativa entre MA e AT no membro DM, com aumento significativo em MA.

Na marcha, com diferentes ajustes para diferentes membros, o treinamento de resistência não só diminuiu o impulso de frenagem do membro ND como aumentou o impulso de propulsão do membro DM.

Para a expressão gênica de CS, houve diferença no membro DM. Nesse caso o treinamento de resistência aumentou a expressão gênica CS (figura 16 a).

Para a expressão gênica de FABP, houve diferença significativa no membro ND, sendo que o treinamento diminuiu esse parâmetro no grupo MA (figura 16 b).

Esses resultados de expressão gênica mostram que o treinamento de corrida de resistência produz diferentes adaptações nos membros.

5.11 Resumo dos resultados obtidos

A tabela 4 apresenta de forma resumida os resultados da relação entre esforço e lateralidade, da diferença dos níveis de esforço e da diferença entre os lados.

Para a EMG total, de frenagem e de propulsão da marcha e da corrida, para todos os impulsos da corrida, para o impulso vertical de frenagem da marcha, para as expressões gênicas das proteínas FATP, HSL e CPT1, para a área das fibras tipo I, IIA e IIX e para a porcentagem de fibras tipo I, não foi detectada interação significativa entre esforço e lateralidade nem diferença significativa entre os níveis de esforço e nem entre os hemisférios corporais.

Para o comprimento dos membros inferiores e para o impulso vertical de propulsão da marcha, independentemente do nível de esforço, foi detectada diferença significativa entre o lado DM e ND.

Já para a expressão de CPT 2 e para a porcentagem das fibras IIA e IIX, independentemente da lateralidade, foi detectada diferença significativa entre os grupos MA e AT.

Para a expressão gênica das proteínas Homer 2, LPL e LDH, foi detectada interação significativa entre esforço e lateralidade, porém não detectadas no pós-teste.

Para o impulso horizontal de frenagem da marcha, impulso horizontal de propulsão da marcha e para a expressão gênica das proteínas CS e FABP, foi detectada interação significativa entre esforço e lateralidade. No grupo MA, o membro DM apresentou maior expressão gênica de CS e FABP do que o membro ND. No grupo AT, o membro DM apresentou maior ImpHorFreM, menor frenagem do que o membro ND. Para o membro DM, o grupo MA apresentou maior ImpHorPropM e maior expressão gênica de CS do que o grupo AT. E, para

o membro ND, o grupo MA apresentou maior ImpHorFreM menor frenagem e menor expressão gênica de FABP do que o grupo AT.

Tabela 4- Resumo dos resultados obtidos

Parâmetro	Esforço x Lateralidade	Esforço: MA x AT	Lateralidade: DM x ND
Comprimento MI	-	-	DM > ND
EMGtotM, EMGfreM, EMGpropM, EMGtotC, EMGfreC e EMGpropC	-	-	-
ImpHorFreC, ImpHorPropC, ImpVerFreC e ImpVerPropC	-	-	-
ImpVertPropM	-	-	DM < ND
ImpVertFreM	-	-	-
ImpHorPropM	MA_DM > AT_DM		
ImpHorFreM	AT_DM > AT_ND MA_ND > AT_ND		
FATP	-	-	-
FABP	MA_DM > MA_ND MA_ND < AT_ND		
CS	MA_DM > AT_DM		
HSL	-	-	-
HOMER 2	+		
LPL	+		
LDH	+		
CPT 1	-	-	-
CPT 2	-	MA < AT	-
Área fibra tipo I	-	-	-
Área fibra tipo IIA	-	-	-
Área fibra tipo IIX	-	-	-
% fibras tipo I	-	-	-
% fibras tipo IIA	-	MA > AT	-
% fibras tipo IIX	-	MA < AT	-

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a possível existência de adaptação metabólica dos membros inferiores imposta pela dominância em diferentes tarefas em indivíduos ativos e muito ativos, já que o metabolismo das fibras musculares pode estar associado com a especialização em partes DM/ND pela atividade. Assim, ciclos assimétricos se traduzem em capacidade adaptativa à demanda física.

A hipótese que trazemos pressupõe que, devido às diferenças nas funções dos membros contralaterais durante o exercício, os membros dominantes e não dominantes poderiam se utilizar de diferentes vias metabólicas de acordo com sua tarefa preponderante no exercício.

Compreender uma dessas adaptações específicas pode apresentar contribuição para revelar a etiologia das lesões e e produzir estratégias específicas de tratamento e treinamento físico. Além disso, uma vez que a literatura fornece muitos estudos em que, durante o exercício, um membro é comparado com um membro contralateral, os resultados mostram não ser esta estratégia apropriada.

Estudos anteriores sobre a assimetria dos membros (POTDEVIN et al., 2008) mostraram que a marcha de 70,8% de todos os indivíduos é heterogênea, com diferenças entre os lados corporais para frear e propulsionar o corpo em relação à duração da fase da marcha.

Os controles básicos de propulsão e frenagem relacionados com a intensidade das diferentes forças aplicadas nessas ações e a divisão do tempo gasto com cada uma delas sugerem que haja uma estratégia de controle temporal e cinético na ação dos membros inferiores (POTDEVIN et al., 2008).

Para estudar se essas diferenças impõem adaptação metabólica, obtivemos biópsias do músculo GM, devido ao seu papel na caminhada nos momentos de frenagem e propulsão (LIU et al., 2008).

Para determinar a dominância entre os membros, o protocolo de Waterloo (ELIAS; BRYDEN; BULMAN-FLEMING, 1998) foi escolhido por abordar os membros inferiores; no entanto, apesar de constituído por um questionário abrangente, não pode ser considerado impecável.

Com relação à possível presença de assimetria em humanos, esse é, no nosso entender, o primeiro estudo que mostra aspectos morfológicos, fisiológicos e biomecânicos entre os hemisférios corporais, tentando integrá-los por meio de análise de correlações.

6.1 A marcha do MA difere mecanicamente da marcha do AT

Em relação à diferença na marcha entre os grupos AT e MA, para a frenagem, houve diferença significativa no membro ND para o impulso horizontal, sendo que MA é maior do que o AT, o que significa que MA freia menos (figura 10). Nesse caso, a atividade física cancelou o efeito da assimetria que estava presente no AT, sugerindo que o membro ND do AT mostra maior demanda metabólica em relação ao MA e que o treinamento de resistência diminui o custo metabólico da marcha ao diminuir a frenagem. Para propulsão, no impulso horizontal houve diferença significativa entre os membros DM para os grupos AT e MA, aumentando significativamente no MA (figura 12). Com isso, mostramos que o treinamento aeróbio interfere nos padrões motores de movimento e, nesse caso, a marcha do grupo MA se diferenciou do grupo AT. Como não encontramos estudos anteriores de marcha relativo a essa diferença, sugere-se que em futuros estudos sobre marcha os grupos devem ser separados para melhor compreendermos os efeitos do treinamento de corrida nos padrões motores da marcha.

6.2 Relação entre assimetria funcional e metabólica

Uma importante questão a respeito da caminhada refere-se ao custo metabólico de apoiar o corpo e propulsionar o centro de massa para a frente. A força de trabalho gerada incorre em um custo metabólico significativo. O apoio da massa corporal compromete-se com 28% do custo metabólico líquido da caminhada normal, e o custo de realizar o trabalho para redirecionar e acelerar o centro de massa é quase duas vezes maior que o custo de geração de força para suportar o peso corporal (GRABOWSKI et al., 2005).

Neste estudo mostramos que há assimetria funcional e metabólica nos MMII, e que essa assimetria está associada com aspectos da marcha e da corrida, com diferentes respostas dos membros DM e ND, de acordo com o grau do treinamento de resistência.

As fibras musculares são orientadas para reduzir sua velocidade de encurtamento em relação à velocidade da unidade do tendão muscular e isso permite que os músculos gerem saídas de alta potência com alta eficiência, mesmo com movimentação rápida do membro (WAKELING et al., 2011).

As fibras musculares mais rápidas são mais eficazes mecanicamente do que as fibras musculares mais lentas durante movimentos rápidos dos membros e podem ser recrutadas preferencialmente em alguns músculos, mas provavelmente não todos (WAKELING et al., 2011).

Os padrões de coordenação dos músculos estão relacionados às demandas mecânicas de

cada movimento com o tempo apropriado e o nível de ativação para cada músculo relacionado à velocidade e carga do movimento. A coordenação muscular determina a eficácia de toda a mecânica dos membros, e uma coordenação fraca leva a ineficiências e perda de força. É necessária uma coordenação ótima para saídas de alta potência e altas eficiências mecânicas do membro (WAKELING et al., 2011).

Ainda segundo Wakeling et al. (2006), diferentes unidades motoras podem ser recrutadas de forma específica para tarefas durante a locomoção. Além disso, nossos estudos mostraram que, sob certas condições locomotoras cíclicas, os padrões de recrutamento de diferentes tipos de unidades motoras estão relacionados aos requisitos mecânicos da tarefa locomotora. Esse recrutamento preferencial pode ocorrer através de uma gama de velocidades locomotoras e até mesmo ocorre em velocidades onde as fibras mais lentas ainda poderiam produzir força útil.

Mesmo na atividade aeróbia, dependendo do seu papel nos gestos executados pontuais, os músculos podem usar o metabolismo oxidativo ou glicolítico. No momento da frenagem, o GM contribui para conter a descida do tronco e trazê-lo para cima, bem como para parar o avanço da tíbia. No início da propulsão, o GM contribui para apoiar o tronco e mover o centro de massa, mas, no final da fase de propulsão, o GM mantém a contração isométrica, direcionando a energia para avançar a perna e armazenando energia para a fase de balanço (NEPTUNE; KAUTZ; ZAJAC, 2001).

Com respeito às características de utilização do músculo, na fase de frenagem o GM realiza inicialmente uma contração isotônica excêntrica e, em seguida, uma contração isotônica concêntrica, para manter a isometria no estágio de propulsão (ISHIKAWA et al., 2005). Entretanto tais estudos foram feitos em membro DM. Nossos achados sugerem que esse é um processo dinâmico e pode ocorrer com diferentes intensidades de força e impulsos entre os membros. A atividade física crônica pode promover essas mudanças de forma sistemática (BOOTH; THOMASON, 1991; EGAN; ZIERATH, 2013) e pode ser responsável por diferenças entre os tecidos musculares de massa total dos membros, como demonstrado antes (CHIBBER; SINGH, 1972).

Nesse estudo observamos que o aumento do sinal da EMG da fase de frenagem da corrida no membro DM do MA interferiu na plasticidade provocando aumento da porcentagem de fibras tipo I (figura 28a e 28b) e diminuição da porcentagem das fibras tipo IIA (figura 29a e 29b) mostrando a melhor adaptação aeróbia ao esforço. O mesmo não ocorreu no membro ND do MA (figura 28 c e d para DM; figura 29 c e d para ND). Sugere-se que diferenças de

função de DM e ND para caminhada e corrida mudam o metabolismo do músculo GM e resultam em heterogeneidade funcional, podendo estar ligadas à heterogeneidade metabólica do MA DM mostrada na figura 16, onde se verifica aumento da expressão gênica.

Tendo em mente que diferentes intensidades de uso dos membros inferiores promovem diferenças metabólicas, como no caso de indivíduos treinados e não treinados, é esperado encontrar a assimetria metabólica entre os membros que, no presente estudo, foi detectada pela análise de expressão gênica. No caso, a expressão gênica de Homer 2, LPL, LDH, FABP e CS apresentou diferença significativa considerável nos testes de lateralidade e esforço e, como observado na figura 12, em todos os gráficos, há maior expressão no membro DM do grupo MA.

Para avaliar as principais vias que contribuíram para o metabolismo do substrato e eventual heterogeneidade entre os membros, investigamos algumas proteínas-chave do metabolismo oxidativo. As fibras oxidativas do músculo esquelético adotam o ácido graxo de cadeia longa (AGCL) como substrato principal (EGAN; ZIERATH, 2013). Durante a atividade física, várias proteínas desempenham um papel de catabolismo do AGCL. No metabolismo da glicose, o AGCL e / ou a glicose são metabolizados de acordo com o tipo de fibra, duração e intensidade do esforço; quanto mais se prolonga o esforço, mais usamos o AGCL (EGAN; ZIERATH, 2013).

Avaliamos a expressão gênica das proteínas CS, a proteína-chave para o ciclo do ácido cítrico, FABP e FATP, proteínas envolvidas na absorção, transporte e esterificação do AGCL, HSL, a enzima responsável pela hidrólise e armazenamento do IMTAG e LPL, enzima expressa na célula endotelial que permite a captação do AGCL contido nas lipoproteínas.

Além disso, avaliamos LDH, ligada à via glicolítica, e Homer 2, que é uma proteína presente na densidade pós-sináptica do tipo de fibras musculares oxidativas (LIU et al., 2008) e sua regulação é um marcador para o fenótipo das fibras (SALANOVA et al., 2011). O aumento de estímulos neurológicos apropriados resulta em aumento local da expressão de Homer 2, que recruta NFAT na densidade pós-sináptica. Posteriormente, a desfosforilação de NFAT pela calcineurina ocorre, culminando na translocação nuclear, modulando assim a atividade transcricional das fibras musculares de contração lenta (SCHIAFFINO; SERRANO, 2002). Na ausência de estímulos, após o repouso prolongado, a expressão de Homer 2 diminui (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

No membro DM do grupo MA, observamos que há maior expressão gênica de CS (figura 16 a), FABP (figura 16 b) e Homer 2 (figura 16 c) que demonstra maior atividade das

fibras oxidativas. Além disso, pela análise das correlações da figura 25, pudemos observar que, na medida em que há aumento das expressões de CS e FABP, proteínas envolvidas nos passos da oxidação, transporte e lipólise do TAG, a expressão gênica das proteínas FATP e HSL, ligadas ao armazenamento intracelular, diminui. Observamos isso ocorre na medida que aumenta a contração do músculo GM, principalmente na fase de frenagem da corrida.

Já no membro ND do grupo MA as correlações importantes, também ligadas à fase de frenagem da corrida, apontam para um aumento do armazenamento de gordura à medida que aumenta a atividade aeróbia, conforme observamos na figura 25. Tanto essa assimetria metabólica como essas correlações só foram observadas após o treinamento de corrida pois, no grupo AT (figura 24), não houve tendência de especialização metabólica entre os membros. Apesar disso, Girard. et al (2017) em estudo sobre assimetria em membros inferiores de corredores, encontrou diversos parâmetros de assimetria, mas não encontrou diferença no tempo de fadiga entre os membros, para velocidade máxima.

6.3 Relevância científica

Além do fato da marcha do AT diferir da marcha do MA, o treinamento de corrida produz distintas adaptações em diferentes membros. Para o impulso horizontal de frenagem da marcha (figura 10), o treinamento de corrida diminuiu a frenagem da marcha somente no membro ND, com o grupo MA apresentando menor frenagem na marcha do que o grupo AT. Já para o impulso horizontal de propulsão da marcha (figura 12), houve diferença significativa somente entre os membros de DM dos grupos AT e MA, aumentando significativamente no grupo MA. Com isso podemos observar a ocorrência de diferentes ajustes em diferentes membros.

A análise da expressão gênica da FABP (figura 16 b) mostrou diferença somente nos membros ND entre os grupos AT e MA, sendo que a expressão de MA foi menor do que AT. Nesse caso, a fibra disposta anatomicamente no lado ND do indivíduo MA pode estar esterificando menos ácidos graxos e exigindo menos FABP para transportá-los (BONEN et al, 2012). Esse fato pode estar relacionado ao maior armazenamento de AG nesse membro, se associarmos com o aumento da expressão gênica de Homer 2, que nesse membro correlaciona-se com o aumento da expressão gênica de FATP (figura 26).

Já para a CS, a diferença ocorreu somente nos membros DM entre os grupos AT e MA (figura 16 a), sendo a expressão de MA maior do que AT, apontando novamente que o aumento do volume do exercício produz diferentes adaptações entre os membros. No membro DM do

grupo MA, a maior expressão de CS encontrada neste estudo, sugere que há maior capacidade oxidativa nesse membro.

Para Homer 2, houve uma diferença significativa somente no membro DM entre AT e MA, com viés estatístico maior em MA, que pode sugerir maior modulação neuromuscular no membro de DM com intensidade crescente de dados de treinamento, isso deve ser, contudo, confirmado.

Finalmente, nos estudos que examinam as adaptações da fibra muscular à atividade física (HELGE, et al., 2011; SALVADEGO, et al., 2011), recorrentemente há comparação de um membro (executor do esforço) com o contralateral (controle em repouso). Contudo há indícios claros de que haja significativa heterogeneidade de resposta da musculatura de membros em hemisférios opostos frente ao seu papel específico na realização do gesto do exercício, como nossos resultados mostram.

6.4 Relevância para o treinamento físico e tratamento de lesões

Segundo Mann et al (2008), a quantificação da força de reação do solo imposta ao membro inferior durante a marcha é importante para criação de programas de exercícios físicos e terapias de reabilitação da marcha. Nesse aspecto, ao mostrarmos a assimetria da FRS na marcha, ela se torna fundamental para elaboração de estratégias de treinamento e tratamento físico.

Em recente artigo publicado, Udofa et al (2016) abordam uma nova forma de observação da força de reação ao solo através de imagens de vídeo, sugerindo modelo de duas massas. Para isso, avaliaram centenas de atletas, sendo o mais conhecido o campeão olímpico Usain Bolt. Sobre esse assunto, em entrevista ao blog da SMU, os autores do artigo (Udofa; Weyand, 2017⁴) relatam presença de importante assimetria na FRS da passada de Bolt e perguntam se a uniformidade do passo é importante para a velocidade. Bolt otimizou essa irregularidade para se tornar o humano mais rápido? Com um passo mais equilibrado durante o seu ápice, ele poderia ter corrido mais lento ou rápido?

Apesar de estarem analisando corrida de velocidade, podemos questionar o quanto, para a corrida de resistência, as forças assimétricas podem interferir no desempenho. Além disso, como essas forças estariam relacionadas com o aparecimento de lesões. Poderíamos admitir uma faixa de assimetria necessária?

⁴ <http://blog.smu.edu/research/2017/06/27/does-symmetry-matter-for-speed-study-finds-usain-bolt-may-have-asymmetrical-running-gait/>

Ao mostrar diferença nos padrões de marcha e de corrida entre AT e MA, estamos demonstrando pela primeira vez que o treinamento ou a ausência dele interfere nos padrões neurológicos e nas forças às quais estamos sujeitos no dia a dia. Isso leva o corpo a adaptações que vão de aspectos biomecânicos até bioquímicos. A consequência disso é que por meio de programas de treinamento e de reabilitação que considerem esses aspectos de assimetria, podemos interferir nos padrões da marcha e da corrida controlando a força corporal e a carga de treinamento.

Vale dizer que os aspectos de assimetria podem abrir possibilidades de diagnósticos em lesões musculoesqueléticas, com nova compreensão dos efeitos cíclicos das forças aplicadas no gesto cotidiano, na marcha e na corrida.

Nesse sentido, a compreensão das estratégias de força dos hemisférios corporais ganha importância relevante para a reabilitação e para o desempenho esportivo. A análise e quantificação do movimento tem permitido maior conhecimento dos efeitos de patologias, da maturação e desenvolvimento, e da capacidade de aquisição de movimentos humanos selecionados (SOUSA, 2010; CAPECCI et al, 2006). Nesse aspecto, observar o desenvolvimento humano pela ótica da assimetria pode trazer benefícios tanto para crianças com dificuldade motora para desenvolvimento da marcha quanto para idosos com risco de queda.

Com o crescimento do número de praticantes de corrida, de rua torna-se fundamental compreendermos a relação entre a mecânica da marcha e da corrida e a força de reação ao solo. Sobre isso, Clark et al (2017) nos alertam que a relação entre a mecânica da marcha e as forças de reação do solo é considerada complexa. Acrescentam que esse ponto de vista evoluiu principalmente por meio de esforços para explicar o aumento do nível das formas verticais de força-tempo observadas durante a corrida humana lenta. A partir daí, surge a pergunta do quanto a velocidade da marcha e da corrida interferem nas assimetrias.

Outro ponto a considerar a partir desse estudo é a relação entre assimetria funcional e metabólica com as variações do lactato sanguíneo. Isto sendo levado em conta durante os treinos de corrida são estudos que podem aperfeiçoar programas de treinamento e também permitir a compreensão com aparecimento de lesões.

Os resultados deste estudo apontam para adaptações específicas relacionadas à atividade física. Elas devem ser consideradas no treinamento, nos estudos e na clínica, e são de potencial relevância para a concepção de estratégias de treino e prevenção de lesões associada à atividade física.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e aqui apresentados confirmam a hipótese de que a assimetria funcional está associada à heterogeneidade metabólica na marcha, com diferentes respostas dos membros dominante e não dominante, de acordo com o grau de treinamento de resistência. Vimos também que a marcha do ativo difere mecanicamente da marcha do muito ativo. Sugere-se que a diferença na coordenação motora de dominante e não dominante para andar e correr altera o metabolismo do músculo gastrocnêmio medial e resulta em heterogeneidade metabólica. As descobertas são de relevância potencial para o desenvolvimento de estratégias de treinamento e prevenção de lesões. Além disso, é de suma importância que nos estudos de exercício em que um membro é empregado como controle do outro membro, as imprecisões metabólicas e funcionais podem não ser consideradas.

REFERÊNCIAS

- ALSTED, T. J. et al. Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 3, p. E445-53, mar. 2009.
- ACHTEN, J., GLEESON, M. & JEUKENDRUP, A.E. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. **Med Sci Sports Exerc** 34, 92–97, 2002
- ANNETT, M. The Right Shift Theory of Handedness and Brain Asymmetry in Evolution, Development and Psychopathology. **Cognitie, Creier, Comportament (Cognition, Brain, Behavior)** 10, p. 235- 250, 2008.
- BELMONTE, A.; AOKI, M. S.; AP, G. Triacilglicerol intramuscular: um importante substrato energético para o exercício de endurance. **Revista Brasileira De Medicina**, v. 11, p. 135–140, 2005.
- BONEN, A. et al. Mechanisms and Regulation of Protein-Mediated Cellular Fatty Acid Uptake: Molecular, Biochemical, and Physiological Evidence. **Physiology**, p. 15–28, 2012.
- BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. **Physiological reviews**, v. 71, n. 2, p. 541–585, 1991.
- BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. **Physiological reviews**, v. 71, n. 2, p. 541–585, 1991.
- BORTOLOSO E, MEGIGHIAN A, FURLAN S, GORZA L, VOLPE P. Homer 2 antagonizes protein degradation in slow-twitch skeletal muscles. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2013;304(1), 2012.
- BOSCH, K.; ROSENBAUM, D. Gait symmetry improves in childhood--a 4-year follow-up of foot loading data. **Gait & posture**, v. 32, n. 4, p. 464–8, out. 2010.
- BRADLEY, N. S. et al. Acute endurance exercise increases plasma membrane fatty acid transport proteins in rat and human skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, 25 out. 2011.
- BURDEN, A. How should we normalize electromyograms obtained from healthy participants? What we have learned from over 25 years of research. **J Electromyogr Kinesiol**, v.20, n.6, p.1023-1035, 2010.
- CARPES, F. P.; MOTA, C. B.; FARIA, I. E. On the bilateral asymmetry during running and cycling - a review considering leg preference. **Physical therapy in sport: official journal of the Association of Chartered Physiotherapists in Sports Medicine**, v. 11, n. 4, p. 136–42, nov. 2010.

CAPECCI, M; et al. Gait analysis of stroke subjects walking at different self-selected speed **Gait and Posture**, v 24: 43-44, 2006.

CAPOZZO, A et al. Position and orientation in space of bones during movement: anatomical frame definition and determination. **Clinical Biomechanics (Bristol Avon)**, v. 10, n. 4, p. 171-178, 1995.

CHHIBBER, S. R., & SINGH, I. Asymmetry in muscle weight and one-sided dominance in the human lower limbs. **Journal of anatomy**, 106(Pt 3), 553–6, 1970

CHIBBER S.R., SINGH I. Asymmetry in muscle and bone weight in the lower limb of human **foetuses**. **J Anat Soc Ind**, 21:33–9, 1972

CORBALLIS, M. C. **Lateralization of the human brain**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2012. v. 195

CORBALLIS, M. C. The evolution of lateralized brain circuits. **Frontiers in Psychology**, v. 8, n. JUN, p. 1–6, 2017.

CORBETTA D., THELEN E. Behavioral fluctuations and the development of manual asymmetries in infancy: contributions of the dynamic systems approach. **Handb. Neuropsychol.** 8 311–330, 2002.

COREN, S.; PORAC, C. Fifty centuries of right-handedness: the historical record. **Science**, v. 198, n. 4317, p. 631–632, 1977.

CORYELL, J. F.; MICHEL, G. F. How supine postural preferences of infants can contribute toward the development of handedness. **Infant Behavior and Development**, v. 1, n. 1, p. 245–257, 1978.

CROW, T. Directional asymmetry is the key to the origin of modern Homo sapiens (the Broca-Annet axiom): A reply to Rogers' review of The Speciation of Modern Homo Sapiens. **Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition**, v. 9, n. 2, p. 233–242, 2004.

DUGAN, S. A.; BHAT, K. P. Biomechanics and analysis of running gait. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 16, n. 3, p. 603–621, 2005.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–84, 5 fev. 2013.

ELIAS, L. J.; BRYDEN, M. P.; BULMAN-FLEMING, M. B. Footedness is a better predictor than is handedness of emotional lateralization. **Neuropsychologia**, v. 36, n. 1, p. 37–43, jan. 1998.

FORRESTER, G. S. et al. Human handedness: An inherited evolutionary trait. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 200–206, 2013.

GILJOV, A. et al. Parallel Emergence of True Handedness in the Evolution of Marsupials and Placentals. **Current Biology**, v. 25, n. 14, p. 1878–1884, 2015.

GIRARD, O. et al. Lower limb mechanical asymmetry during repeated treadmill sprints. **Human Movement Science**, v. 52, n. February, p. 203–214, 2017.

GORZA, L. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 38, n. 2, p. 257–265, 1990.

GRABOWSKI, A. et al. Independent metabolic costs of supporting body weight and accelerating body mass during walking. **J Appl Physiol** 98, v. 354, p. 579–583, 2005.

GUO, Z., AND M. D. JENSEN. J. Intramuscular fatty acid metabolism evaluated with stable isotopic tracers **J Appl. Physiol**, 84:1674– 1679, 1998.

HARRISON, A. J.; FOLLAND, J. P. Investigation of gait protocols for plantar pressure measurement of non-pathological subjects using a dynamic pedobarograph. **Gait and Posture**, v. 6, n. 1, p. 50–55, 1997.

HARKINS D. A., MICHEL G. F. Evidence for a maternal effect on infant hand-use preferences. **Dev. Psychobiol.** 21 535–541 10.1002/dev.420210604, 1988.

HARKINS, D. A.; UŽGIRIS, I. Č. Hand-use matching between mothers and infants during the first year. **Infant Behavior and Development**, v. 14, n. 3, p. 289–298, 1991.

HELGE, J. W. et al. Interleukin-6 release is higher across arm than leg muscles during whole-body exercise. **Experimental physiology**, v. 96, n. 6, p. 590–8, jun. 2011.

INGELMARK BE. Asymmetry in the length of extremities and their relation to right- and left-handedness. **Upsala Laekarefo erening Forhandlingar**; 52:17–82, 1974

ISHIKAWA, M. et al. Muscle-tendon interaction and elastic energy usage in human walking. **Journal of applied physiology**, v. 35, p. 603–608, 2005.

JONG-YEON, K. et al. Long- and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle. **Metabolism**, v. 51, n. 4, p. 460–464, abr. 2002.

KAUFMAN K.R., MILLER L.S., SUTHERLAND D.H. Gait asymmetry in patients with limb-length inequality. **J Pediatr Orthop**; 16:144–50. 1996

KIENS, B., ROEMEN, T.H.&VAN DER VUSSE, G.J. Muscular long-chain fatty acid content during graded exercise in humans. **Am J Physiol**, 276, E352–E357, 1999.

KUBOTA, H.; DEMURA, S.; KAWABATA, H. Laterality and age-level differences between young women and elderly women in controlled force exertion (CFE). **Archives of gerontology and geriatrics**, 18 set. 2011.

LEE, J. B. et al. Identifying symmetry in running gait using a single inertial sensor. **Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia**, v. 13, n. 5, p. 559–63, set. 2010.

LEE, M.; PARK, J. Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. **Molecules and cells**, v. 22, n. 1, p. 1–7, 2006.

LEEK, B. T. et al. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, n. 2, p. R441–7, fev. 2001.

LEVY, J.; NAGYLAKI, T. A model for the genetics of handedness. **Genetics**, v. 72, n. 1, p. 117–128, 1972.

LEXELL J, TAYLOR CC. A morphometrical comparison of right and left whole human vastus lateralis muscle: how to reduce sampling errors in biopsy techniques. **Clin Physiol.**, 11:271–276, 1991.

LIU, M. Q. et al. Muscle contributions to support and progression over a range of walking speeds. **Journal of biomechanics**, v. 41, n. 15, p. 3243–52, 14 nov. 2008.

LOHMAN, E. B.; BALAN SACKIRIYAS, K. S.; SWEN, R. W. A comparison of the spatiotemporal parameters, kinematics, and biomechanics between shod, unshod, and minimally supported running as compared to walking. **Physical therapy in sport : official journal of the Association of Chartered Physiotherapists in Sports Medicine**, v. 12, n. 4, p. 151–63, nov. 2011.

MANN, L.; TEIXEIRA, C.; MOTA, C. A marcha humana: interferências de cargas e de diferentes situações. **Arq. ciências saúde UNIPAR**, p. 257–264, 2008.

MATSUDO SM, ARAÚJO TL, ET AL. Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. **Rev Bras Ativ Saude.**;10:5-18, 2001.

MCLEAN, L.; M. CHISLETT; M. KEITH; M. MURPHY; P. WALTON. The effect of head position, electrode site, movement and smoothing window in the determination of a reliable maximum voluntary activation of the upper trapezius muscle. **J Electromyogr Kinesiol**, v.13, n.2, p.169-180, 2003.

MCMANUS C. Right Hand, Left Hand: The Origins of Asymmetry in Brains, Bodies, Atoms, and Cultures. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2002.

MEGUERDITCHIAN, A. et al. The sound of one-hand clapping: handedness and perisylvian neural correlates of a communicative gesture in chimpanzees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1735, p. 1959–1966, 2012.

MACINNIS, M. J. et al. Superior mitochondrial adaptations in human skeletal muscle after interval compared to continuous single-leg cycling matched for total work. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 9, p. 2955–2968, 2017.

MITCHELL, C. J. et al. Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. **Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 1, p. 71–77, 2012.

MURRAY M. P., DROUGHT A. B., KORY R.C. Walking patterns in normal man. **J Bone Joint Surg** 46A (2): 335-360, 1964

NAHAS, MV. Atividade física, saúde e qualidade de vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo. Londrina: **Midiograf**, 2001

NEPTUNE, R. R.; KAUTZ, S. A.; ZAJAC, F. E. Contributions of the individual ankle plantar flexors to support, forward progression and swing initiation during walking. **Journal of Biomechanics**, v. 34, n. 11, p. 1387–1398, 2001.

NORDBY, P.; SALTIN, B.; HELGE, J.W. Whole-body fat oxidation determined by graded exercise and indirect calorimetry: a role for muscle oxidative capacity? **Scand J Med Sci Sports** 16, 209–214, 2006.

NUDO, R. J. et al. Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 785–807, 1996.

OBRZUT, J. E. et al. Factorial structure of the waterloo handedness questionnaire for control and learning-disabled adults. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**. February 2013, p. 37–41, 1992.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy research and technique**, v. 50, n. 6, p. 500–9, 15 set. 2000.

POTDEVIN, F. et al. The study of Asymmetry in Able-bodied Gait with the concept of Propulsion and Brake. **Science & Sports**, n. 3, 2008.

PROVINS, K. A. Handedness and speech: A critical reappraisal of the role of genetic and environmental factors in the cerebral lateralization of function. **Psychological Review**, v. 104, n. 3, p. 554–571, 1997.

SACKEIM, H. A.; WEIMAN, A. L.; GREGA, D. M. Effects of predictors of hemispheric specialization on individual differences in hemispheric activation. **Neuropsychologia**, v. 22, n. 1, p. 55–64, 1984.

SADEGHI, H., ALLARD, P., PRINCE, F., & LABELLE, H. Symmetry and limb dominance in able-bodied gait: a review. **Gait & posture**, 12(1), 34–45. 2000

SAHLIN, K.; HARRIS, R. C. Control of lipid oxidation during exercise: role of energy state and mitochondrial factors. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 194, n. 4, p. 283–91, dez. 2008.

SALANOVA, M. et al. Expression and regulation of Homer in human skeletal muscle during neuromuscular junction adaptation to disuse and exercise. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 12, p. 4312–25, dez. 2011.

SANTROCK J. W. Motor, sensory, and perceptual development. In: Ryan M, editor. A topical approach to life-span development. Boston: **McGraw-Hill Higher Education**, p. 172–205, 2008.

SALVADEGO, D. et al. Functional impairment of skeletal muscle oxidative metabolism during knee extension exercise after bed rest. **J Appl Physiol** 111: p. 1719–1726, 2011.

SCHIAFFINO, S. et al. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 10, p. 197–205, 1989.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–531, out. 2011.

SCHIAFFINO, S.; SERRANO, A. Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 12, p. 569–75, dez. 2002.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; STUART, A. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. **Physical Therapy**, DOI: 10.1093/ptj/81.11.1810 Dez 2001.

SOUSA, A. S. P. Controlo postural em marcha humana: análise multifactorial. **Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto** p. 112, 2010.

TALANIAN, J. L. et al. Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 299: n. 26, p. 180–188, 2010.

TARNOPOLSKY, M. et al. Gene expression, fiber type, and strength are similar between left and right legs in older adults. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 62, n. 10, p. 1088–95, out. 2007.

TERMIN, A; STARON, R. S.; PETTE, D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. **Histochemistry**, v. 92, n. 6, p. 453–457, 1989.

TURCOTTE, L.P., RICHTER, E.A. & KIENS, B. Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. **Am J Physiol**, 262, E791– E799, 1992.

UDOFIA, A. B.; RYAN, L. J.; WEYAND, P. G. Impact forces during running: Loaded questions, sensible outcomes. **BSN 2016 - 13th Annual Body Sensor Networks Conference**, p. 371–376, 2016.

VALLORTIGARA, G.; CHIANDETTI, C.; SOVRANO, V. A. Brain asymmetry (animal). **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 2, n. 2, p. 146–157, 2011.

VAN LOON L. J. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. **J Appl Physiol**, 97 (4):1170-87. 2004

WAKELING, J. M. et al. Movement mechanics as a determinate of muscle structure, recruitment and coordination. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1570, p. 1554–1564, 2011.

WAKELING, J. M.; UEHLI, K.; ROZITIS, A. I. Muscle fibre recruitment can respond to the mechanics of the muscle contraction. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 3, n. 9, p. 533–544, 2006.

WINTER D.A. The biomechanics and motor control of human gait. 2nd ed. Waterloo, Ont., Canada: University of Waterloo Press, 1991.

ANEXOS

ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

ESTUDO: HETEROGENEIDADE METABÓLICA MUSCULAR ASSOCIADA À ASSIMETRIA FUNCIONAL

Você está sendo convidado (a) a participar do Projeto de Pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (inserir o nome, profissão, residente e domiciliado na, telefone)

.....

....., portador da Cédula de identidade, RG
 , e inscrito no CPF/MF..... Nascido (a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Heterogeneidade metabólica muscular associada à assimetria funcional”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir se a diferença das funções desempenhadas na marcha na corrida e na manutenção da postura acarreta respostas distintas nas fibras musculares dos diferentes lados corporais no tangente à forma e metabolismo energético, uma vez que está claramente estabelecido que a atividade física crônica gere profundas respostas adaptativas no músculo. Em outras palavras, se as pernas direitas e esquerdas têm músculo com aspecto e função diferentes.
- II) Concordo em ser submetido a exames antropométricos como medições de peso, altura, medidas de circunferências da coxa e da perna, comprimento dos membros inferiores, índice de massa corpórea.
- III) Concordo em realizar teste realizado em esteira ergométrica com caminhada e, ou corrida para medir o consumo máximo de oxigênio, ou seja, a capacidade aeróbia.

- IV)** Concordo em ser submetido à biopsia muscular (retirada de um fragmento pequeno do músculo, sob anestesia local), em ambos os membros inferiores. Tenho clareza dos riscos que os procedimentos desta pesquisa podem ocasionar dor transitória ou inflamação e que esta é a única forma de atingir os objetivos do trabalho. Todas as orientações e esclarecimentos necessários sobre os procedimentos me serão fornecidos antes, durante e após o mesmo.
- V)** Estou certo de que não arcarei com nenhum custo, não necessitando assim de ressarcimento de despesas.
- VI)** Essas coletas serão realizadas apenas para este estudo.
- VII)** A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médicos, clínicos e terapêuticos efetuados com o estudo;
- VIII)** Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- IX)** A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem-estar físico.
- X)** Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- XI)** Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:
- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

XII) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros Projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa.

() Sim ou () Não

“DECLARO QUE, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, CONSINTO EM PARTICIPAR DA PRESENTE PESQUISA”.

São Paulo, ____ de _____ de 201____

() Paciente / () Responsável.....

Testemunha 1: _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Profª Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender

Instituto de Ciências Biomédicas I

Telefone para contato: 3091-7225

Identificação do CEP-HU: Endereço: Av. Prof. Lineu Preste, 2565 – Cidade Universitária

CEP: 05508-000 - São Paulo – SP

Telefones: 3091-9457 – Fax: 3091-9479 - E-mail:

cep@hu.usp.br

ANEXO B – Questionário Internacional de Atividade Física (IPAC) versão Português

Nome: _____ Data: ____/ ____/ ____

Idade: ____ Sexo: F () M () Você trabalha de forma remunerada: () Sim () Não.

Quantas horas você trabalha por dia: ____

Quantos anos completos você estudou: ____

De forma geral sua saúde está: () Excelente () Muito boa () Boa () Regular () Ruim

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física em uma semana **última semana**. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

- Atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- Atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

SEÇÃO 1- ATIVIDADE FÍSICA NO TRABALHO

Esta seção inclui as atividades que você faz no seu serviço, que incluem trabalho remunerado ou voluntário, as atividades na escola ou faculdade e outro tipo de trabalho não remunerado fora da sua casa. **NÃO** incluir trabalho não remunerado que você faz na sua casa como tarefas domésticas, cuidar do jardim e da casa ou tomar conta da sua família. Estas serão incluídas na seção 3.

1a. Atualmente você trabalha ou faz trabalho voluntário fora de sua casa?

() Sim () Não – Caso você responda não **Vá para seção 2: Transporte**

As próximas questões são em relação a toda a atividade física que você fez na **última semana** como parte do seu trabalho remunerado ou não remunerado. **NÃO** inclua o transporte para o

trabalho. Pense unicamente nas atividades que você faz por **pelo menos 10 minutos contínuos**:

1b. Em quantos dias de uma semana normal você **anda**, durante **pelo menos 10 minutos contínuos**, **como parte do seu trabalho**? Por favor, **NÃO** inclua o andar como forma de transporte para ir ou voltar do trabalho.

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 1d.**

1c. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** caminhando **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minutos

1d. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades **moderadas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como carregar pesos leves **como parte do seu trabalho**?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 1f**

1e. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades moderadas **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minutos

1f. Em quantos dias de uma semana normal você gasta fazendo atividades **vigorosas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como trabalho de construção pesada, carregar grandes pesos, trabalhar com enxada, escavar ou subir escadas **como parte do seu trabalho**:

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 2a.**

1g. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades físicas vigorosas **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minuto

SEÇÃO 2 - ATIVIDADE FÍSICA COMO MEIO DE TRANSPORTE

Estas questões se referem à forma típica como você se desloca de um lugar para outro, incluindo seu trabalho, escola, cinema, lojas e outros.

2a. O quanto você andou na ultima semana de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para questão 2c**

2b. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** andando de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ horas _____ minutos

Agora pense **somente** em relação a caminhar ou pedalar para ir de um lugar a outro na última semana.

2c. Em quantos dias da última semana você andou de bicicleta por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua o pedalar por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a questão 2e.**

2d. Nos dias que você pedala quanto tempo no total você pedala **POR DIA** para ir de um lugar para outro?

_____ horas _____ minutos

2e. Em quantos dias da última semana você caminhou por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a Seção 3.**

2f. Quando você caminha para ir de um lugar para outro quanto tempo **POR DIA** você gasta? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 3 – ATIVIDADE FÍSICA EM CASA: TRABALHO, TAREFAS DOMÉSTICAS E CUIDAR DA FAMÍLIA.

Esta parte inclui as atividades físicas que você fez na última semana na sua casa e ao redor da sua casa, por exemplo, trabalho em casa, cuidar do jardim, cuidar do quintal, trabalho de manutenção da casa ou para cuidar da sua família. Novamente pense **somente** naquelas atividades físicas que você faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**.

3a. Em quantos dias da última semana você fez atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer, rastelar **no jardim ou quintal**.

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 3c.**

3b. Nos dias que você faz este tipo de atividades quanto tempo no total você gasta **POR DIA** fazendo essas atividades moderadas **no jardim ou no quintal**?

_____ horas _____ minutos

3c. Em quantos dias da última semana você fez atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer ou limpar o chão **dentro da sua casa**.

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 3e.**

3d. Nos dias que você faz este tipo de atividades moderadas **dentro da sua casa** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

3e. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades físicas **vigorosas no jardim ou quintal** por pelo menos 10 minutos como carpir, lavar o quintal, esfregar o chão:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a seção 4.**

3f. Nos dias que você faz este tipo de atividades vigorosas **no quintal ou jardim** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 4- ATIVIDADES FÍSICAS DE RECREAÇÃO, ESPORTE, EXERCÍCIO E DE LAZER.

Esta seção se refere às atividades físicas que você fez na ultima semana unicamente por recreação, esporte, exercício ou lazer. Novamente pense somente nas atividades físicas que faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**. Por favor, **NÃO** inclua atividades que você já tenha citado.

4a. Sem contar qualquer caminhada que você tenha citado anteriormente, em quantos dias da ultima semana você caminhou **por pelo menos 10 minutos contínuos no seu tempo livre**?

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4c**

4b. Nos dias em que você caminha **no seu tempo livre**, quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

4c. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades **moderadas no seu tempo livre** por pelo menos 10 minutos, como pedalar ou nadar a velocidade regular, jogar bola, vôlei, basquete, tênis:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4e.**

4d. Nos dias em que você faz estas atividades moderadas **no seu tempo livre** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

4e. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades **vigorosas no seu tempo livre** por pelo menos 10 minutos, como correr, fazer aeróbicos, nadar rápido, pedalar rápido ou fazer Jogging:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para seção 5.**

4f. Nos dias em que você faz estas atividades vigorosas **no seu tempo livre** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 5 - TEMPO GASTO SENTADO

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

5a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____ horas _____ minutos

5b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

_____ horas _____ minutos

ANEXO C - Questionário de Waterloo – Versão Português

Por favor responda as questões da forma mais adequada seguindo as instruções abaixo.

Por favor, responda cada questão do inventário de Waterloo, a seguir, da melhor forma para você. Se você **SEMPRE** usa um pé para a atividade descrita, circule DS ou ES (para direito sempre, ou, esquerdo sempre). Se você frequentemente (mas não sempre) usa o pé direito ou esquerdo, circule DF ou EF (para direito frequentemente, ou, esquerdo frequentemente), respectivamente de acordo com sua resposta. Se você usa ambos os pés com a mesma frequência para a atividade descrita, assinale AMB (ambos).

Por favor, não simplesmente circule uma resposta, mas imagine a realização da atividade e então marque a resposta. Se precisar, pare e realize o movimento.

1. Qual pé você usa para chutar uma bola que está parada na sua frente e alinhada com um alvo também a sua frente?	DS	DF	AMB	EF	ES
2. Se você tiver que ficar em um pé só, em qual ficaria?	DS	DF	AMB	EF	ES

3. Com qual pé você costuma mexer na areia da praia (desenhar ou aplanar a areia)	DS	DF	AMB	EF	ES
4. Se você tem que subir numa cadeira, qual pé você coloca primeiro em cima dela?	DS	DF	AMB	EF	ES
5. Com qual pé você tenta matar um inseto rápido no chão, como uma barata ou um grilo?	DS	DF	AMB	EF	ES
6. Se você tiver que ficar em pé sobre um trilho de trem, em um pé só, qual pé seria?	DS	DF	AMB	EF	ES
7. Se você tiver que pegar uma bola de gude com os pés, qual pé escolheria?	DS	DF	AMB	EF	ES
8. Se você tem de saltar em um pé só, qual pé seria?	DS	DF	AMB	EF	ES
9. Com qual pé você ajudaria a enterrar uma pá no solo?	DS	DF	AMB	EF	ES
10. Quando estamos em pé parados, geralmente largamos nosso peso mais sobre uma das pernas, no seu caso, em qual das pernas você apoia mais o peso?	DS	DF	AMB	EF	ES
11. Alguma vez houve alguma razão (uma lesão por exemplo) que fez você mudar sua preferência para alguma das atividades descritas acima?	Sim () Não ()				
12. Alguma vez você treinou uma das pernas em especial para alguma dessas atividades descritas?	Sim () Não ()				
Se você respondeu sim para as questões 11 e 12 por favor explique:					