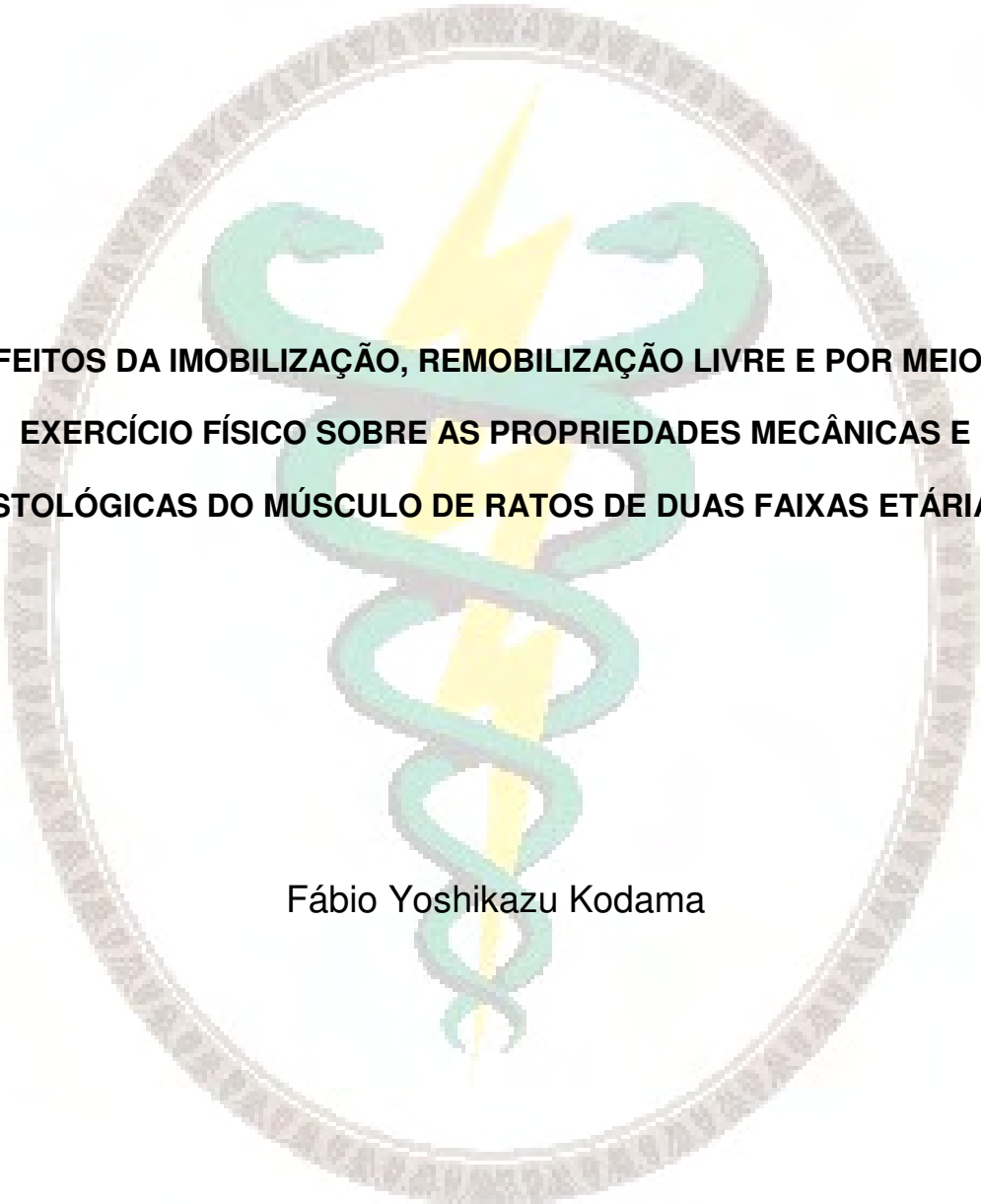


Programa de Pós Graduação em Fisioterapia



**“EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO, REMOBILIZAÇÃO LIVRE E POR MEIO DE
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS E
HISTOLÓGICAS DO MÚSCULO DE RATOS DE DUAS FAIXAS ETÁRIAS”**

Fábio Yoshikazu Kodama

Fábio Yoshikazu Kodama

**EFEITOS DA IMOBILIZAÇÃO, REMOBILIZAÇÃO LIVRE E POR MEIO DE
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS E
HISTOLÓGICAS DO MÚSCULO DE RATOS DE DUAS FAIXAS ETÁRIAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia - FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho

Presidente Prudente
2011

Kodama, Fábio Yoshikazu.

K81e Efeitos da imobilização, remobilização livre e por meio de exercício físico sobre as propriedades mecânicas e histológicas do músculo de ratos de duas faixas etárias / Fábio Yoshikazu Kodama. - Presidente Prudente : [s.n], 2010
101 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia

Orientador: José Carlos Silva Camargo Filho

Banca: Neri Alves, Mário Jefferson Quirino Louzada

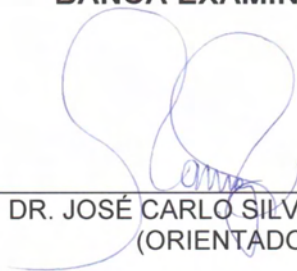
Inclui bibliografia

1. Fisioterapia. 2. Músculo esquelético. 3. Biomecânica. 4. Histologia. 5. Imobilização. I. Autor. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

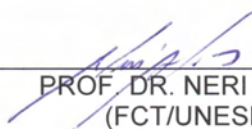
CDD 615.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Presidente Prudente.

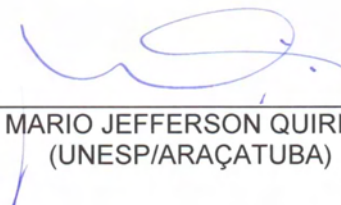
BANCA EXAMINADORA



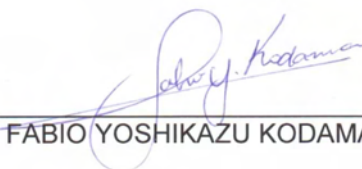
PROF. DR. JOSÉ CARLO SILVA CAMARGO FILHO
(ORIENTADOR)



PROF. DR. NERI ALVES
(FCT/UNESP)



PROF. DR. MARIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA
(UNESP/ARAÇATUBA)



FABIO YOSHIKAZU KODAMA

PRESIDENTE PRUDENTE (SP), 14 DE FEVEREIRO DE 2011.

RESULTADO: Reprovado

Dedicatória

Aos meus pais, Masakazu e Eunice, pelo incondicional apoio e incentivos.

Ao meu irmão, Diogo, pelo companheirismo e amizade.

A minha namorada, Ingrid, por me acompanhar e apoiar em todos momentos.

Aos meus avós, Kineo (in memoriam) e Nobuko, por desejarem o melhor para mim.

A toda família pela torcida, união e confiança.

*Ao Ikeda Sensei por todos os incentivos e por ser um importante exemplo,
motivando-me a persistir nos momentos mais difíceis.*

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho pela oportunidade de aprender, pela paciência e apoio em todas as dificuldades que tive e pela amizade. Com certeza serei eternamente grato.

A equipe do laboratório de Histologia, Sidney, Mariana, Bruna, Alice, Guilherme, Tatiana, Adriana e Prof^a Regina pelo apoio incondicional e amizade. Sem vocês não teria conseguido.

Ao Prof. Dr. Aldo Eloízio por permitir a utilização da máquina de ensaios, e dispor sua equipe para nos apoiar.

Ao Elton pela paciência e disposição para ajudar.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano por permitir meu aprendizado em seu laboratório.

Ao Rodrigo Okubo, pelo apoio, paciência e disposição para ajudar.

Ao Prof. Dr. Neri Alves e ao Prof. Dr. Mário Jefferson pelo aceite para fazer parte da banca examinadora.

A equipe da Seção de Pós-graduação, principalmente ao André, pela atenção e orientações.

A Pró-reitoria de Pós-graduação da UNESP por ter concedido a bolsa de Mestrado.

Ao Milton e Olga por me receberem como parte de sua família. Jamais esquecerei o que fizeram por mim.

Ao Wagner, Sérgio, Miriam, Luty, Renato e Roberta pelos incentivos e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Grupo Gajokai pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

A todos os membros da Associação Brasil Soka Gakkai Internacional (BSGI) pelo apoio, incentivos e amizade.

Epigrafe

Sonhem, ainda que o sonho pareça impossível.
Lutem, ainda que o inimigo pareça invencível.
Suportem a dor, ainda que esta pareça insuportável.
Percorram por onde os bravos não ousaram percorrer.
Transformem o mal em bem, ainda que seja necessário caminhar mil milhas.
Amem o puro e inocente, ainda que sejam inexistentes.
Resistam ainda quando o corpo não mais resista.
E no final, alcançarão aquela estrela, ainda que esta pareça inalcançável.

Daisaku Ikeda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. <i>Músculo esquelético</i>	7
2.2. <i>Imobilização.....</i>	15
2.3. <i>Exercício físico.....</i>	18
2.4. <i>Ensaio mecânico.....</i>	19
2.4.1. <i>Ensaio de tração</i>	20
2.4.2. <i>Tensão e Deformação.....</i>	21
2.4.3. <i>Deformação elástica e Deformação plástica.....</i>	21
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. <i>Geral.....</i>	26
3.2. <i>Específicos</i>	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. <i>Animais de experimentação.....</i>	28
4.2. <i>Grupos experimentais.....</i>	29
4.3. <i>Técnica de imobilização.....</i>	30
4.4. <i>Remobilização livre.....</i>	31
4.5. <i>Adaptação ao meio líquido</i>	31
4.6. <i>Protocolo de exercício físico.....</i>	32
4.7. <i>Coleta e preparo do material</i>	33
4.8. <i>Ensaio mecânico de tração muscular</i>	34
4.9. <i>Análise morfométrica das fibras musculares</i>	36
4.10. <i>Análises estatísticas</i>	38

5. RESULTADOS	40
5.1. <i>Massa corpórea</i>	41
5.2. <i>Medidas do músculo gastrocnêmio direito</i>	47
5.3. <i>Propriedades biomecânicas</i>	52
5.4. <i>Medidas de menor diâmetro das fibras musculares</i>	56
6. DISCUSSÃO	59
6.1. <i>Técnica de imobilização</i>	61
6.2. <i>Análise da massa corpórea</i>	62
6.3. <i>Análise das propriedades biomecânicas</i>	64
6.3.1. <i>Alongamento no limite máximo (ALM)</i>	64
6.3.2. <i>Carga no limite máximo (CLM)</i>	65
6.3.3. <i>Rigidez</i>	66
6.4. <i>Medidas do músculo gastrocnêmio</i>	67
6.4.1. <i>Comprimento muscular</i>	67
6.4.2. <i>Perímetro muscular</i>	68
6.4.3. <i>Massa muscular</i>	69
6.5. <i>Análise morfométrica</i>	69
6.6. <i>Observações</i>	70
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS	73
9. ANEXO I	79
10. ANEXO II	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática ilustrando a organização do músculo esquelético (adaptado)	8
Figura 2	Organização do músculo esquelético do nível macroscópico ao nível molecular	9
Figura 3	Representação dos componentes protéicos principais de um sarcômero	12
Figura 4	Representação da nebulina e titina e suas respectivas distribuições no sarcômero	13
Figura 5	Localização e arranjo da titina	13
Figura 6	Ilustração esquemática da atuação das cargas ou forças gerando deformações	20
Figura 7	Curva carga x deformação	22
Figura 8	Diagrama esquemático tensão-deformação mostrando a deformação elástica linear para ciclos de carga e descarga	23
Figura 9	Aplicação da técnica de imobilização gessada	31
Figura 10	Tanque com compartimentos de PVC utilizados para realização do protocolo de exercício físico.	32
Figura 11	Conjunto de acessórios confeccionados para fixação do fêmur e do calcâneo	34
Figura 12	Músculo gastrocnêmio acoplado às peças de fixação	35
Figura 13	Imagem do programa Tesc demonstrando gráfico e resultados do ensaio de tração muscular	36
Figura 14	Micrótomo criostato - HM 505 E Microm com blocos de tecido muscular fixados.	37
Figura 15	Imagem do software NIS-Elements D3.0 - SP7 (Nikon®), demonstrando medidas de menor diâmetro das fibras musculares	38
Figura 16	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A1 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = 7 dias após o início do experimento. T2 = 14 dias após o início do experimento.	43
Figura 17	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A2 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = após 7 dias de imobilização.	44
Figura 18	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A3 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = após 7 dias de imobilização. T2 = após 7 dias de remobilização livre.	44
Figura 19	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A4 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = após 7 dias de imobilização. T2 = após período de remobilização por meio de exercício físico.	45

Figura 20	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B1 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = 7 dias após o início do experimento. T2 = 14 dias após o início do experimento.	45
Figura 21	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B2 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = após 7 dias de imobilização.	46
Figura 22	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B3 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = após 7 dias de imobilização. T2 = após 7 dias de remobilização livre.	46
Figura 23	“Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B4 nos tempos T0, T1 e T2. T0 = início do experimento. T1 = após 7 dias de imobilização. T2 = após período de remobilização por meio de exercício físico.	47
Figura 24	“Box-plot” das medidas de comprimento inicial do complexo fêmur-gastrocnêmio-calcâneo dos subgrupos adultos	49
Figura 25	“Box-plot” das medidas de comprimento inicial do complexo fêmur-gastrocnêmio-calcâneo dos subgrupos idosos.	49
Figura 26	“Box-plot” das medidas de perímetro do músculo gastrocnêmio dos subgrupos adultos.	50
Figura 27	“Box-plot” das medidas de perímetro do músculo gastrocnêmio dos subgrupos adultos	50
Figura 28	“Box-plot” das medidas de massa do gastrocnêmio dos animais dos subgrupos adultos	51
Figura 29	“Box-plot” das medidas de massa do gastrocnêmio dos animais dos subgrupos idosos.	51
Figura 30	“Box-plot” dos valores de alongamento no limite máximo (ALM) dos subgrupos adultos.	53
Figura 31	“Box-plot” dos valores de alongamento no limite máximo (ALM) dos subgrupos idosos.	53
Figura 32	“Box-plot” dos valores de carga no limite máximo (CLM) dos subgrupos adultos.	54
Figura 33	“Box-plot” dos valores de carga no limite máximo (CLM) dos subgrupos idosos	54
Figura 34	“Box-plot” dos valores de rigidez dos subgrupos adultos	55
Figura 35	“Box-plot” dos valores de rigidez dos subgrupos idosos.	55
Figura 36	“Box-plot” das medidas de morfometria dos subgrupos adultos.	57
Figura 37	“Box-plot” das medidas de morfometria dos subgrupos idosos.	58

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Massa corpórea dos grupos adulto e idoso	42
Tabela 2	Medidas do músculo gastrocnêmio direito. Grupo adulto (A)	48
Tabela 3	Medidas do músculo gastrocnêmio direito. Grupo idoso (B)	48
Tabela 4	Propriedades biomecânicas do grupo adulto (A)	52
Tabela 5	Propriedades biomecânicas do grupo idoso (B)	52
Tabela 6	Morfometria do gastrocnêmio esquerdo (Grupos adultos)	56
Tabela 7	Morfometria do gastrocnêmio esquerdo (Grupos idosos)	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm – micrometro

nm – nanômetro

mg/kg – miligrama por kilograma

cm - centímetro

TnC – troponina C

TnI – troponina I

TnT – troponina T

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

PFK – fosfofrutoquinase

LDH – lactato desidrogenase

ml – mililitro

kgf – kilograma-força

mm – milímetro

kg/cm^2 – kilograma por centímetro quadrado

CLM – carga no limite máximo

ALM – alongamento no limite máximo

HE – hematoxilina e eosina

N – Newton

N/m – newtons/metro

% - porcentagem

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

σ – sigma (tensão)

F – força

A – área

ε – épsilon (deformação)

ΔL – deformação sofrida

L – comprimento inicial

E – constante de proporcionalidade

A1 – subgrupo adulto controle

A2 – subgrupo adulto imobilizado

A3 – subgrupo adulto remobilizado livre

A4 – subgrupo adulto remobilizado por meio de exercício físico

B1 – subgrupo idoso controle

B2 – subgrupo idoso imobilizado

B3 – subgrupo idoso remobilizado livre

B4 – subgrupo idoso remobilizado por meio de exercício físico

Resumo

RESUMO

KODAMA, F. Y. Efeitos da imobilização, remobilização livre e por meio de exercício físico sobre as propriedades mecânicas e histológicas do músculo de ratos de duas faixas etárias. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Presidente Prudente, 2011.

A imobilização é geralmente considerada como o método de escolha para o tratamento de lesões musculoesqueléticas, embora possa incorrer em alterações estruturais indesejáveis. Na literatura poucos estudos avaliam a recuperação da resistência do músculo após a imobilização, principalmente do músculo envelhecido, desta forma o objetivo do presente estudo é descrever os efeitos da imobilização, da remobilização livre e por meio de exercício físico sobre as propriedades mecânicas e histológicas do músculo esquelético de ratos de duas faixas de idade. Para tanto, foram utilizados 69 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) divididos em dois grupos de acordo com a idade, sendo um grupo adulto (cinco meses) e um idoso (15 meses). Estes grupos foram subdivididos de acordo com os procedimentos experimentais em controle, imobilizado, remobilizado livre e remobilizado por meio de exercício físico. A imobilização foi realizada com membros posteriores dos animais em posição de encurtamento por um período de sete dias. O protocolo de exercícios foi composto por 5 sessões de natação, 1 vez por dia e 25 minutos por sessão. Para obtenção dos valores das propriedades mecânicas, o músculo gastrocnêmio foi submetido a ensaios mecânicos de tração na máquina universal de ensaio EMIC® (modelo DL 2000) e calculadas as respectivas propriedades mecânicas: alongamento no limite máximo, carga no limite máximo e rigidez. Foram realizadas também medidas de morfometria por meio de técnica histológica. Os resultados do ensaio mecânico demonstram diferenças significantes dos valores de carga no limite máximo entre os subgrupos controle e os demais, tanto no grupo adulto como no idoso. Não houve diferença significativa com relação à rigidez. O alongamento no limite máximo só apresentou diferença no grupo idoso. Os resultados de morfometria demonstraram redução decorrente da imobilização. Concluiu-se que a imobilização induz a redução das propriedades mecânicas e valores de morfometria, e que os protocolos de remobilização livre e por meio de exercício físico apresentam uma tendência a corrigir os valores ao padrão do controle.

Palavras-chave: músculo esquelético, imobilização, biomecânica, fatores etários.

Abstract

ABSTRACT

KODAMA, F. Y. Effects of immobilization, free remobilization and remobilization by with physical exercise on the mechanical properties and histological muscle of rats of two age groups. 2011. 101 f. Dissertation (Master) Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Presidente Prudente, 2011.

Immobilization is generally regarded as the method of choice for the treatment of musculoskeletal injuries, but may incur undesirable structural changes. In literature, few studies evaluate the recovery of muscle strength after immobilization, mainly aged muscle, so the purpose of this study is to describe the effects of immobilization, the free remobilization and physical exercise on the mechanical and histological properties in the skeletal muscle of two age groups of rats. To this end, we used 69 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) divided into two groups according to age, being an adult group (five months) and old group (15 months). These groups were subdivided according to the experimental procedures in control, immobilized, free remobilized and remobilized through exercise. Immobilization was performed with the hindquarters of the animals in a shortened position for a period of seven days. The exercise protocol consisted of five sessions of swimming, 1 time per day and 25 minutes per session. To obtain the values of mechanical properties, the gastrocnemius muscle was subjected to mechanical testing machine EMIC universal test ® (model DL 2000) and assessed their mechanical properties: stretching at the maximum limit, load at the maximum limit and stiffness. Morphometry measurements were also taken using histological technique. The results of mechanical tests show significant differences in the values of the maximum load between the control and the other subgroups, both in the adult and the elderly. There was no significant difference with respect to stiffness. Stretching at the maximum limit only differ in the elderly group. The results of morphometry showed decreased due to immobilization. It was concluded that immobilization induces a reduction of mechanical properties and morphology of values, and that the protocols of free remobilization and physical exercise have a tendency to correct the values of the standard control.

Key Words: skeletal muscle, immobilization, biomechanics, age.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A imobilização de um segmento corpóreo é o repouso local, contínuo e rígido⁽¹⁾, e geralmente é considerada como o método de escolha para o tratamento de lesões musculoesqueléticas, embora possa incorrer em alterações estruturais indesejáveis⁽²⁾.

O músculo esquelético possui notável capacidade para adaptação estrutural e funcional frente a diversos estímulos, sendo assim responde a imobilização gerando alterações como redução da reserva de glicogênio muscular, proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, atrofia muscular, alteração do número de sarcômeros em série e diminuição da força muscular⁽³⁾.

A intensidade em que estas alterações ocorrem é influenciada pela posição em que o membro é imobilizado. Matheus *et al.*⁽⁴⁾ estudaram o músculo gastrocnêmio de ratos imobilizados em posição de encurtamento e alongamento por período de sete dias. Ambos apresentaram reduções das propriedades biomecânicas, porém os músculos imobilizados em posição de encurtamento tiveram redução maior que os músculos imobilizados em alongamento.

De maneira geral, a posição de encurtamento é a que provoca maiores adaptações do tecido, quando comparada à posição neutra ou de alongamento. Além da posição articular, as adaptações ocorridas após imobilização dependem do músculo envolvido, uma vez que as fibras musculares lentas, tipo I, têm maior vulnerabilidade à atrofia se comparadas às fibras musculares rápidas, tipo II, devido à mudança momentânea do metabolismo, que permanece predominantemente oxidativo durante o período, deixando as fibras susceptíveis à atrofia pela alteração na síntese protéica⁽¹⁾.

O músculo gastrocnêmio apresenta metade de suas fibras de contração rápida (fibras tipo II); dessa forma, a composição mista desse músculo o indica para estudar os efeitos da imobilização⁽¹⁾.

Sabe-se que a partir de seis horas da imobilização ocorre perda de proteínas, sem alteração da quantidade de mioglobina⁽⁵⁾. Após 48 horas de imobilização o músculo desenvolve atrofia e que após 7 dias ocorre redução em 37% de sua massa⁽⁶⁾, reduzindo a área de secção transversa das fibras musculares, a capacidade de alongar e resistir a cargas, tornando-o mais susceptível à lesões.

Em relação ao envelhecimento, sabe-se que este processo é caracterizado por uma diminuição funcional dos tecidos, órgãos e sistemas do organismo, com redução da capacidade de adaptação a estímulos internos e externos⁽⁷⁾.

No músculo esquelético, o envelhecimento provoca uma progressiva diminuição da massa, geração de força e capacidade de regeneração, juntamente com aumento da suscetibilidade à lesão, estresse oxidativo, e processo inflamatório^(8, 9).

Estima-se que, a partir dos 40 anos, ocorra perda de aproximadamente 5% de massa muscular a cada década, com declínio mais rápido após os 65 anos⁽¹⁰⁾, particularmente nos membros inferiores⁽¹¹⁾. As possíveis explicações para esta redução são: a diminuição do volume de cada fibra, a redução do número total de fibras ou a combinação de ambos⁽¹²⁾.

O envelhecimento também está associado com a redução progressiva de motoneurônios, gerando uma inervação deficiente na musculatura. Felizmente, muitas fibras são re-inervadas por outros neurônios motores, minimizando a perda funcional da musculatura esquelética. No entanto, esse processo é insuficiente para

compensar totalmente as alterações ocorridas pela desnervação, resultando atrofia de fibras musculares⁽¹³⁾.

Lexell, Downham e Sjostrom⁽¹⁴⁾ observaram número de fibras musculares 25% menor em idosos em comparação com adultos jovens, estudando o músculo vasto lateral em homens de 30 e 74 anos.

Os efeitos deletérios da imobilização associados às alterações provocadas pelo processo de senescência sobre a musculatura esquelética podem resultar em maior suscetibilidade a lesões, o que torna interessante o estudo de suas respostas frente a estímulos externos.

Na literatura poucos estudos avaliam como se processa a recuperação da resistência do músculo após a imobilização e, principalmente, imobilização seguida de remobilização⁽¹⁵⁻²⁰⁾. Desta forma, avaliação das propriedades mecânicas do tecido muscular torna-se importante, consistindo numa ferramenta de grande utilidade para o estabelecimento de protocolos clínico/cirúrgicos e programas de reabilitação, pois fornece conhecimento relevante sobre as possíveis adaptações e alterações que ocorrem nos músculos frente a estímulos externos⁽⁶⁾. Existe também uma dificuldade de encontrar trabalhos que abordem esses processos no músculo esquelético envelhecido.

Face às considerações supracitadas, este estudo pretende analisar os efeitos da imobilização, remobilização livre e por meio de exercício físico sobre as propriedades mecânicas do tecido muscular de ratos de duas faixas etárias.

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1. Músculo esquelético

O músculo esquelético é responsável por praticamente todos os movimentos voluntários, representando de 40 a 45% da massa corpórea total no corpo humano com aproximadamente 660 músculos com diferentes localizações e funções⁽²¹⁾ sendo considerado o agente do movimento ativo por meio da sua atuação nas alavancas formadas por ossos, tendões, ligamentos e articulações⁽²²⁾.

Os músculos variam em tamanho, forma e tipo, de acordo com sua função⁽²³⁾, e Lieber⁽²⁴⁾ corrobora com tal afirmação, sustentando que o músculo esquelético é a representação clássica da correlação entre estrutura e função, existindo nos níveis macro e microscópicos uma disposição de elementos própria para gerar força e movimento.

Desta forma, a composição estrutural dos músculos exerce importante papel nas suas propriedades mecânicas, sendo necessária uma breve revisão descritiva.

O tecido muscular esquelético é composto por inúmeras fibras que variam de 10 a 100µm de diâmetro no corpo humano, e cada uma dessas fibras é formada por unidades sucessivamente menores⁽²⁵⁾.

As *fibras musculares* estão organizadas em feixes (*fascículos musculares*), sendo que cada fibra é envolvida por uma camada formada pela lâmina basal associada a fibras reticulares, chamada de *endomísio* e cada fascículo é envolvido por tecido conjuntivo o qual recebe o nome de *perimísio*. Vários fascículos juntos são envolvidos pelo *epimísio*, formando o músculo como um todo. Essa rede de tecido conjuntivo cria um esqueleto de suporte para as fibras musculares, mantendo-as unidas e permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro.

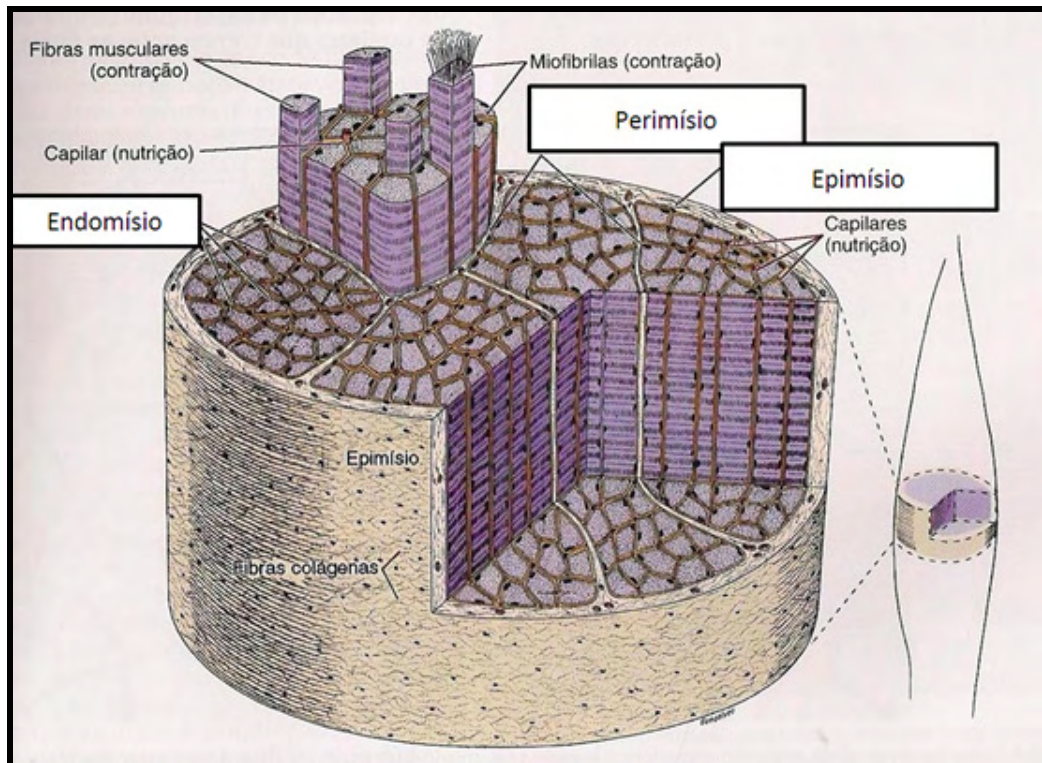


Figura 1: Representação esquemática ilustrando a organização do músculo esquelético. (adaptado)

Fonte: JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008, p.183.

A fibra muscular contém muitos feixes de filamentos, as *miofibrilas*, que medem entre 1 a 2 μ m de diâmetro e estão dispostas longitudinalmente nas fibras⁽²⁵⁾. Cada miofibrila, por sua vez, é formada por cerca de 1500 filamentos de miosina adjacentes e 3000 filamentos de actina, que são responsáveis pela contração muscular⁽²⁶⁾.

Observadas ao microscópio óptico, as fibras musculares mostram estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras. A faixa clara é isotrópica a luz polarizada, e por isso recebe o nome de *banda I*, enquanto a faixa escura é anisotrópica, sendo denominada *banda A*. Na região central de cada banda I, observa-se uma linha transversal escura, a *linha Z*. A banda A apresenta uma zona mais clara no seu centro, a *banda H*.

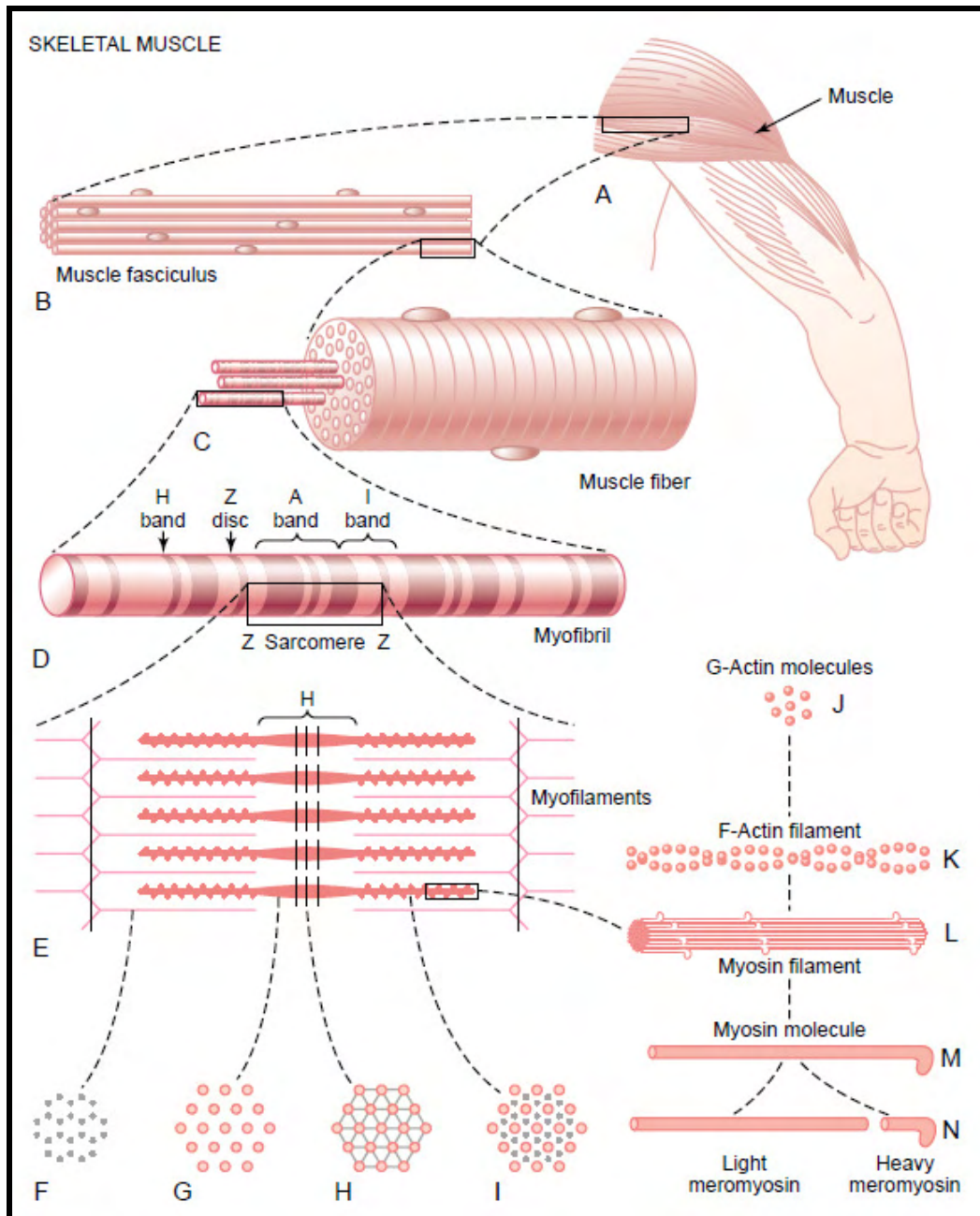


Figura 2: Organização do músculo esquelético, do nível macroscópico ao nível molecular. F, G, H e I são cortes transversais dos níveis indicados.

Fonte: GUYTON e HALL, 2006, p.73.

A estriação da miofibrila é devida à repetição de unidades iguais chamadas *sarcômero* que mede cerca de $2,5\mu\text{m}$ e fica delimitado por duas linhas Z sucessivas, contendo uma banda A separando duas semibandas I.

Ao microscópio eletrônico observam-se filamentos finos de *actina* que partem da linha Z e vão até a borda externa da banda H, e filamentos grossos de *miosina* que ocupam a região central do sarcômero. Esses filamentos juntos representam

55% do total de proteínas do músculo estriado e estão dispostos longitudinalmente nas miofibrilas, sendo organizados numa distribuição simétrica e paralela.

Os filamentos finos são formados por actina, *tropomiosina*, *troponina* e *tropomodulina*⁽²¹⁾.

A actina apresenta-se sob forma de polímeros longos (*actina F*) formada por duas cadeias de monômeros globulares (*actina G*), torcidas uma sobre a outra em dupla hélice.

A tropomiosina é uma molécula fina e longa, medindo cerca de 40nm de comprimento, formada por duas cadeias polipeptídicas com arranjo em dupla hélice, localizada ao longo do sulco entre os filamentos de actina F. Duas isoformas são encontradas, a *tropomiosina α* com variação rápida e lenta, e a *tropomiosina β* .

A troponina é um complexo protéico formado por três subunidades com funções específicas, a *troponina C (TnC)* que tem afinidade pelo íon cálcio, sendo essencial para a ligação com a miosina e possui duas isoformas *TnC rápida*, com quatro ligações para o cálcio, a *TnC lenta*, com uma ligação para o cálcio; a *troponina I (TnI)* que inibe a ação da actina e a atividade da ATPase, e apresenta duas isoformas a *TnI rápida* e a *TnI lenta*; e a *troponina T (TnT)* que faz a ligação com a tropomiosina, também apresentando duas isoformas no músculo esquelético, a *TnT rápida* e *TnT lenta*.

A tropomodulina é uma proteína que mantém os filamentos de actina em seu comprimento, não havendo evidências de isoformas.

O filamento grosso é representado pela miosina e por outras proteínas que se encontram ligadas a ela (proteína C, proteína H, proteína M e miomesina), servindo de apoio e contribuindo para a integridade do sarcômero^(21, 27).

As moléculas de miosina são relativamente grandes (massa molecular de 500 kDa) e apresentam forma de bastão com 20nm de comprimento e 2 a 3 nm de diâmetro, sendo formada por dois peptídios enrolados em hélice. Numa de suas extremidades a miosina apresenta uma saliência globular ou *cabeça* que possui locais específicos para combinação com a ATP, dotada de atividade ATPásica e locais de ligação com a actina⁽²⁵⁾. A molécula de miosina pode ser dividida em dois fragmentos, a *meromiosina leve* que corresponde a maior parte da porção em bastão da molécula e *meromiosina pesada* que contém a saliência globular (cabeça) mais uma parte do bastão⁽²⁶⁾.

As moléculas são dispostas de tal maneira que suas partes em bastão se sobrepõe e as cabeças situam-se para fora, desta forma a parte central do sarcômero que corresponde a banda H, representa uma região de sobreposição da miosina constituída exclusivamente da parte em bastão das moléculas. No centro da banda H encontra-se a *linha M*, que corresponde a ligações laterais entre filamentos grossos adjacentes. A principal proteína da linha M é a creatina cinase. Esta enzima catalisa a transferência de um grupamento fosfato da fosfocreatinina para adenosina difosfato (ADP) fornecendo adenosina trifosfato (ATP) para as contrações musculares⁽²⁵⁾.

O conjunto de miofibrilas é preso à membrana plasmática da célula muscular por meio de diversas proteínas que têm afinidade pelos miofilamentos e por proteínas da membrana plasmática. Uma dessas proteínas, chamada *distrofina*, liga os filamentos de actina a proteínas do sarcolema⁽²⁵⁾.

Existe ainda a desmina, a nebulina e a titina. A desmina está relacionada com a manutenção dos filamentos de actina e miosina, unidos a parede do sarcômero,

fazendo a conexão entre dois sarcômeros e a nebulina está localizada próxima a actina, controlando o número de ligações entre troponina e a tropomiosina⁽²¹⁾.

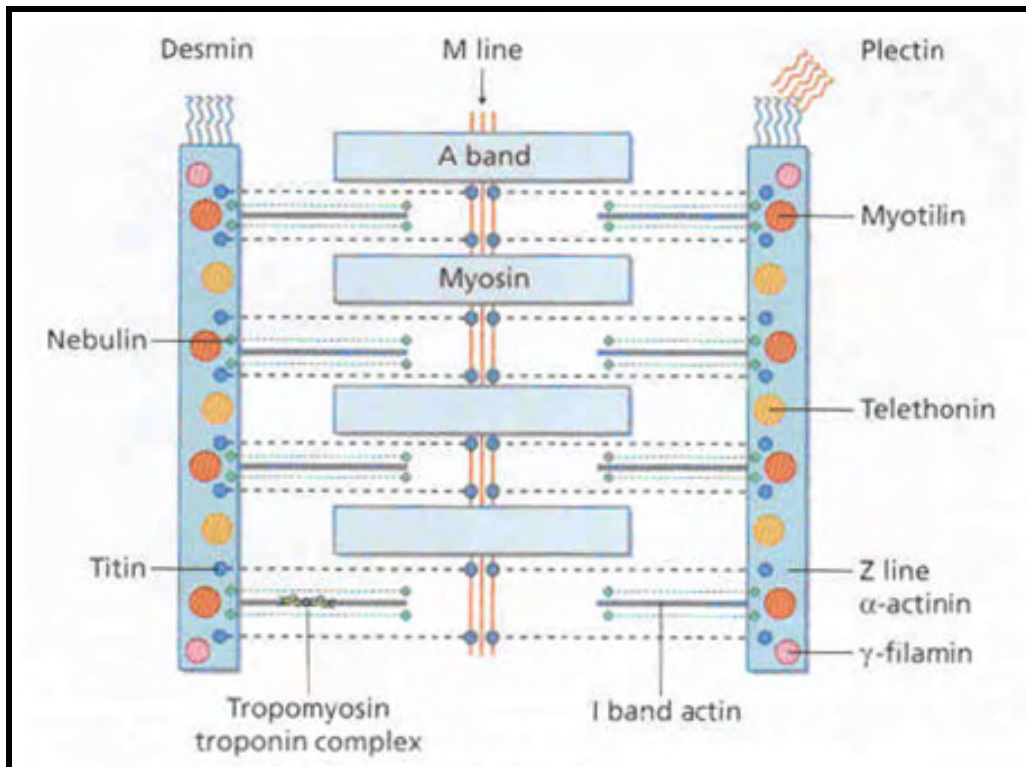


Figura 3: Representação dos componentes proteicos principais de um sarcômero
Fonte: DUBOWITZ e SEWRY, 2007, p.65.

A titina é uma proteína filamentosa elástica que promove a ligação da miosina à extremidade do sarcômero e se estende da linha Z até a linha M. Esta proteína, também conhecida como conectina, é extremamente grande⁽²⁸⁾, sendo que cada molécula de titina tem peso molecular de, aproximadamente 3.000.000, o que a transforma em uma das maiores moléculas protéicas do corpo⁽²⁶⁾. Este miofilamento possui duas porções distintas: a porção associada à banda I que é extensível e a porção associada à zona A que é ancorada ao longo do miofilamento de miosina e é praticamente inextensível⁽²²⁾.

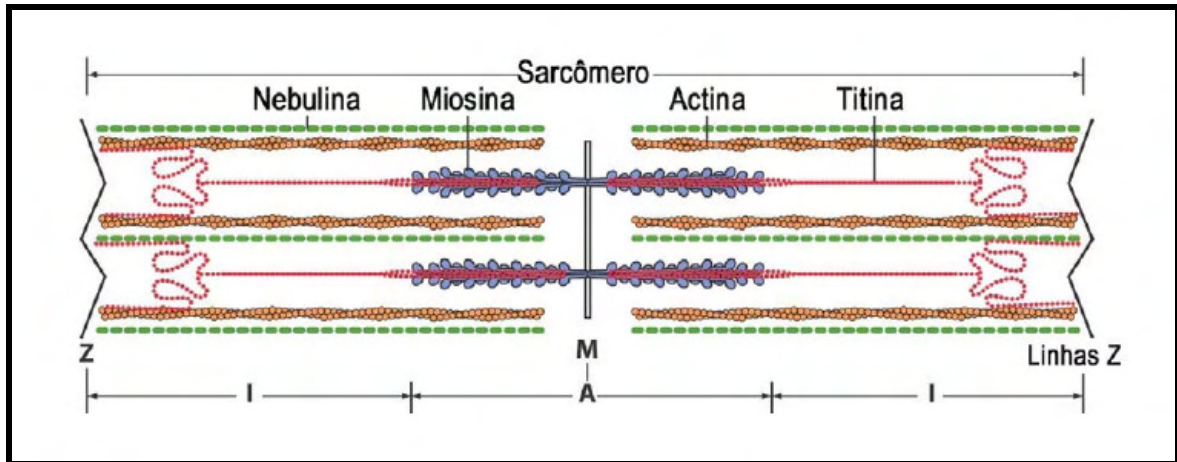


Figura 4: Representação da nebulina e titina e suas respectivas distribuições no sarcômero.
Fonte: ROCHA, 2006

Acredita-se que a titina funcione como um modelo na montagem do sarcômero e para a manutenção de sua integridade. Estes conceitos foram confirmados por trabalhos recentes mostrando que a perda de titina em longo período de desuso do músculo esquelético resultou na desorganização da estrutura do sarcômero⁽²⁸⁾.

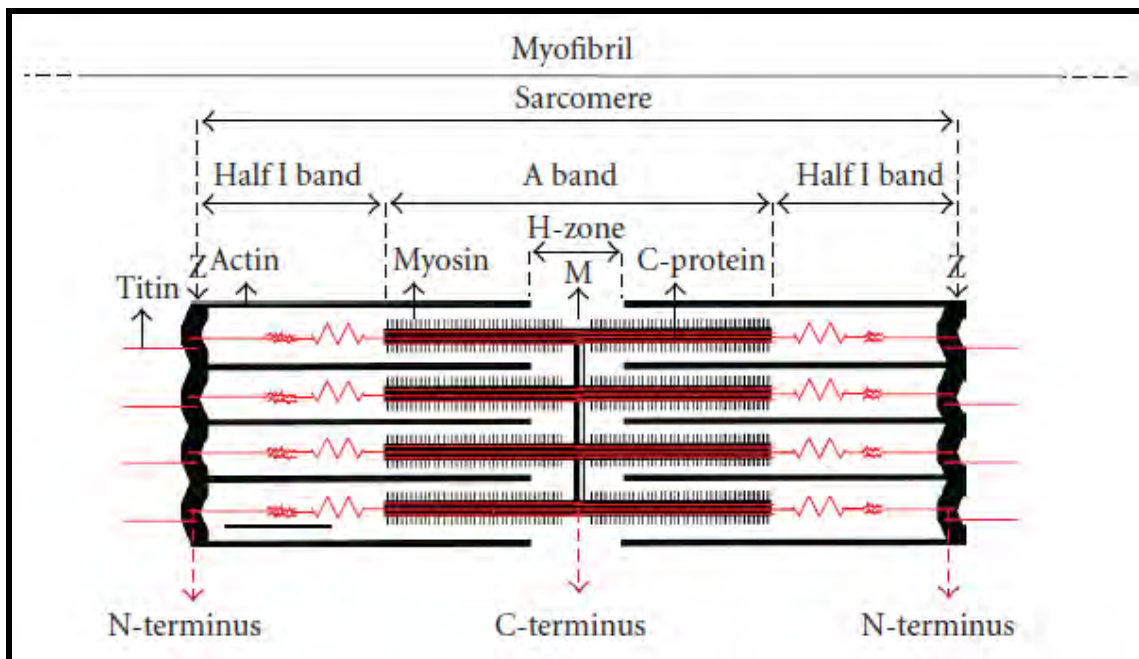


Figura 5: Localização e arranjo da titina.
Fonte: GUO *et al.*, 2010

Desta forma, é atribuída a titina participação na tensão de repouso muscular, bem como participação na produção de força ativa e a responsabilidade na manutenção da estabilidade estrutural do sarcômero. Alterações nas isoformas de

titina podem causar perda da extensibilidade muscular, déficit no desenvolvimento de força e alterações da estrutura da Zona A^(22, 29).

As fibras podem ser classificadas por suas características fisiológicas e bioquímicas.

A classificação principal divide as fibras em rápidas e lentas⁽³⁰⁾. Existe, também, uma designação numérica para identificar os diferentes tipos de fibras. Sendo assim, as fibras lentas são chamadas I, as rápidas II, e aparecem ainda subdivisões das fibras rápidas que são designadas por II, seguidas de letras (a, b, c)^(22, 31).

As fibras lentas (*tipo I*) geram energia utilizando o sistema aeróbio com menor velocidade de propagação do cálcio, e grande número de mitocôndrias, sendo muito resistente à fadiga. Apresentam coloração avermelhada, pois recebe maior vascularização e contém altos níveis de mioglobina. Estas fibras são adaptadas para contrações continuadas e apresenta predomínio das enzimas oxidativas incluindo a citrato sintetase e a succinato desidrogenase⁽²¹⁾.

As *fibras IIa (intermediárias)*, de coloração rosada, têm capacidade de obter ATP tanto por via glicolítica, como oxidativa. Apresentam alta densidade capilar e mitocondrial, além de velocidade de contração rápida e preferência pelas vias aeróbias de obtenção de energia (via oxidativa), similarmente às fibras I, porém com fadigabilidade intermediária entre as fibras I e IIb.

As *fibras rápidas (tipo IIb)* têm predomínio das enzimas glicolíticas incluindo *fosfofrutoquinase* (PFK) e *lactato desidrogenase* (LDH), gerando energia anaeróbia. Apresentam características como alta capacidade de condução do potencial de ação, rápida propagação de cálcio, com alta velocidade de contração e relaxamento, grande capacidade de gerar força, pouca resistência, pouca capilarização, baixo

número de mitocôndrias e reduzida quantidade de mioglobina, tendo alta atividade da ATPase⁽²¹⁾.

A diferenciação das fibras musculares nos tipos vermelha, branca e intermediária é controlada pelos nervos. Em estudos com ratos, quando as fibras brancas e vermelhas são desnervadas e se faz reimplante cruzado, as fibras musculares mudam as características durante a regeneração de acordo com a nova inervação recebida^(22, 32).

Armstrong e Phelps⁽³³⁾ estudaram o músculo gastrocnêmio de ratos e afirmaram que este pode ser dividido em uma camada mais superficial, com predomínio de fibras rápidas (IIb) e uma camada mais profunda, com predomínio de fibras lentas e intermediárias (I e IIa), apresentando desta forma, característica mista.

2.2. Imobilização

A imobilização é um tratamento frequentemente utilizado em distúrbios do sistema musculoesquelético como fraturas e lesões de partes moles, com o intuito de impedir o aumento das lesões dos tecidos e propiciar o restabelecimento mais rápido. No entanto, associadas a essas características terapêuticas, o uso da imobilização resulta também em vários efeitos nocivos, tais como a atrofia, aumento de volume do tecido conjuntivo e fibrose intramuscular^(20, 34).

Os músculos mantidos inativos são mais sensíveis aos sinais catabólicos dos hormônios contrarregulatórios favorecendo a perda em relação ao ganho protéico, com conseqüente redução da massa muscular. Estudos com músculos isolados mostram que a taxa de transporte de aminoácidos está diretamente ligada à atividade contrátil, sendo assim, a diminuição da atividade contrátil que ocorre com o processo de imobilização pode acarretar menor transporte de aminoácidos⁽³⁵⁾.

A perda de massa muscular associada à redução da força é uma das primeiras e mais óbvias modificações que ocorrem como resultado da imobilização, ocorrendo de maneira mais acentuada nas primeiras 72 horas, com índices de 14 a 17%, reduzindo sua velocidade após uma semana de imobilização. Além disso, existe ainda outro fator relevante no processo: a velocidade de síntese proteica, que começa a declinar seis horas após o início da imobilização⁽³⁵⁾.

Outro que interfere na resposta muscular após a imobilização é posição em que o músculo é imobilizado. De maneira geral, a posição de encurtamento é a que provoca maiores adaptações do tecido, quando comparada à posição neutra ou de alongamento⁽³⁾.

No músculo imobilizado em posição encurtada ocorre diminuição no comprimento das fibras pela redução dos sarcômeros em série e aumento do tecido conjuntivo, acarretando uma diminuição da extensibilidade muscular. E os músculos imobilizados com certo estiramento podem ganhar sarcômeros em série, aumentando o comprimento das fibras musculares⁽²²⁾.

Atualmente, para induzir atrofia muscular por desuso dois modelos são considerados mais apropriados: a suspensão e a imobilização.

Os dois modelos produzem reduções significativas na massa do músculo, duração da contração isométrica e pico de tensão tetânica⁽³⁵⁾.

Em relação aos efeitos da imobilização sobre os tipos de fibras, sabe-se que a perda de trofismo ocorre em ambos os tipos (rápidas e lentas), porém os efeitos deletérios da imobilização são mais pronunciados nas fibras de contração lenta em comparação com as rápidas^(3, 32, 36).

Outras alterações decorrentes da imobilização são a redução dos níveis de ATP, ADP, creatina, fosfocreatina, glicogênio, e maiores índices de lactato mediante as solicitações, resultando em uma menor resistência à fadiga⁽²²⁾.

Rocha⁽²²⁾ resume os resultados da imobilização sobre o músculo da seguinte maneira:

1. Diminuição no tamanho das fibras musculares
2. Redução em tamanho e número de mitocôndrias
3. Redução no peso total do músculo
4. Aumento no tempo de contração muscular
5. Redução na tensão muscular produzida
6. Queda nos níveis de repouso de glicogênio e ATP
7. Queda mais rápida no nível de ATP com o exercício
8. Aumento na concentração de lactato com o exercício
9. Redução na síntese protéica

2.3. Exercício físico

O exercício físico é uma conhecida forma de estresse que pode induzir o organismo a responder produzindo várias modificações anatomofisiológicas, dentre as quais se destacam as alterações no sistema musculoesquelético.

As fibras musculares possuem uma alta capacidade de adaptação funcional gerando modificações em suas propriedades fisiológicas e bioquímicas e alterando as características das proteínas musculares⁽²¹⁾.

A prática de exercícios induz alterações que ocorrem de acordo com a especificidade do treinamento. De forma geral, o exercício físico promove mudanças

nas proteínas musculares e nos tipos de fibra, permitindo a transição no sentido lento para rápido, ou rápido para lento⁽²¹⁾.

Exercícios de baixa intensidade e longa duração mostram adaptações relacionadas à resistência muscular, incluindo frações aumentadas de fibras oxidativas, aumento da capacidade oxidativa, maiores níveis de mioglobina, maiores concentrações de mitocôndrias e aumento da capilaridade^(22, 37, 38), além de induzir a conversão de fibras rápidas em fibras lentas. Por outro lado, um treinamento de alta intensidade e curta duração, como treinos de força ou potência, leva a um resultado oposto, ou seja, conversão de fibras lentas em rápidas⁽²¹⁾.

Com relação ao treinamento resistido, observam-se alterações no padrão das fibras musculares, aumentando o conteúdo protéico e o recrutamento de unidades motoras. Fatores estes que induzem a hipertrofia, importante resposta adaptativa do músculo ao treinamento resistido⁽²¹⁾.

A hipertrofia é caracterizada pelo aumento da área de secção transversa, que fornece o potencial para o músculo desenvolver maior força⁽³⁶⁾. Sendo que no corpo humano, a força contrátil máxima varia entre 3 e 4 kg/cm² de área muscular em corte transversal⁽²⁶⁾. No entanto, a hipertrofia não aparenta ocorrer de modo uniforme entre os diversos tipos de fibras. Fibras de contração rápida (IIb) respondem mais à hipertrofia do que fibras de contração lenta (I)⁽³⁷⁾.

De modo geral, o músculo esquelético tem a capacidade de se adaptar às diferentes modalidades de exercícios reagindo de maneiras variadas a cada uma delas, e devido ao fato do exercício físico ser frequentemente considerado como um método terapêutico eficaz em protocolos de reabilitação, no presente estudo será realizado para a remobilização pós-imobilização gessada do segmento corpóreo.

2.4. Ensaio mecânicos

Os ensaios mecânicos têm sido utilizados para determinar as propriedades mecânicas de materiais, principalmente metálicos. No entanto, a utilização dessas técnicas em materiais biológicos se torna importante para auxiliar a compreensão do comportamento desses tecidos frente a estímulos externos.

Os ensaios mecânicos podem ser destrutivos ou não-destrutivos. Os primeiros induzem a uma deformação permanente ou fratura (ruptura) da amostra e constituem os ensaios de tração, compressão, torção, cisalhamento, flexão, entre outros, variando de acordo com as características de direção e sentido da aplicação da carga (Figura 6). Os ensaios não-destrutivos conservam as propriedades dos materiais testados, sendo geralmente utilizados para verificar discontinuidades ou falhas nas estruturas analisadas. Alguns exemplos são ensaios por raios-X, ultrassom, líquidos penetrantes.

Com relação aos ensaios destrutivos, as propriedades mecânicas são verificadas pela execução de experimentos de laboratório cuidadosamente programados, que reproduzem o mais fiel possível as condições em que os materiais analisados são submetidos. Dentre os fatores a serem considerados incluem-se a natureza da carga aplicada e a duração de sua aplicação, bem como as condições ambientais⁽³⁹⁾.

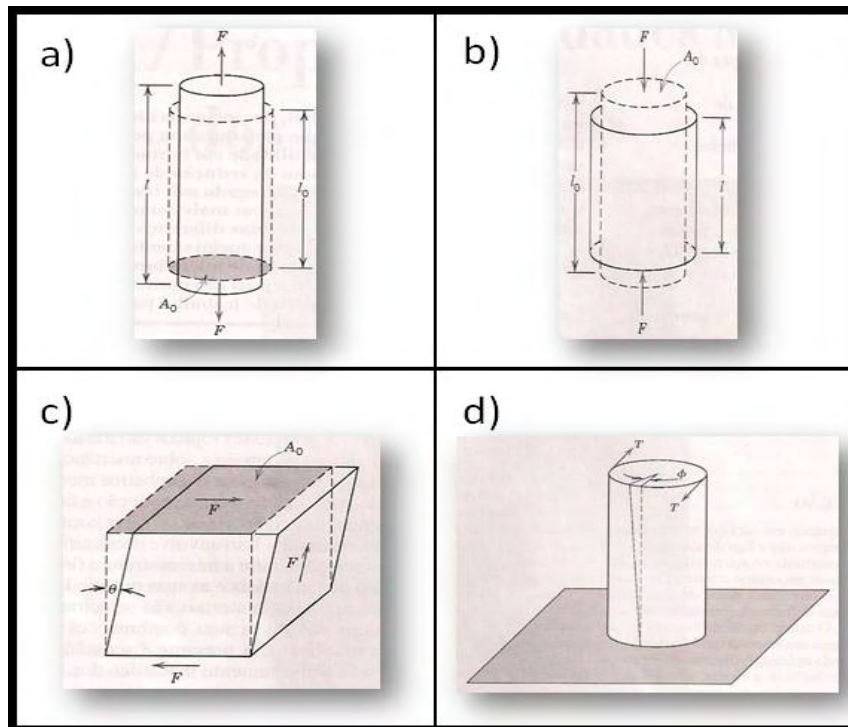


Figura 6: Ilustração esquemática da atuação das cargas ou forças gerando deformações. (a) ensaio de tração. (b) ensaio de compressão. (c) ensaio de cisalhamento. (d) ensaio de torção.
Fonte: CALLISTER, 2002

Em relação à amostra (corpo de prova) a ser testada deve ser considerada a geometria do material, e suas propriedades, uma vez que pode afetar diretamente os resultados do ensaio. Por exemplo, alguns materiais biológicos possuem anisotropia, ou seja, a mesma amostra possui diferentes comportamentos mecânicos dependendo do posicionamento em que é fixada para a realização do ensaio, ou seja, a direção em que o material é testado. Por isso, o tipo de material, sua forma, assim como o tamanho devem sempre objetivar uma padronização para ofertar representatividade e impossibilitar vieses.

2.4.1. Ensaio de tração

O ensaio de tração consiste na aplicação de uma força paralela ao eixo da amostra, tendendo a aumentá-la⁽³⁹⁾.

Para tanto, o corpo de prova é preso pelas suas extremidades nas garras de fixação do dispositivo de testes programado para alongar o corpo de prova a uma taxa constante, além de medir contínua e simultaneamente a carga instantânea aplicada e os alongamentos resultantes por meio de um software que permite interface direta entre a máquina de ensaios e um computador.

A resultante da aplicação do ensaio de tração é registrada como uma relação carga/deformação ou tensão/deformação.

2.4.2. Tensão e Deformação

A tensão é a resistência de um corpo a uma força externa aplicada em função da sua área, sendo definida pela relação:

$$\sigma = F / A$$

Onde σ é a tensão, F é a força aplicada e A é a área de secção transversa.

A deformação (ϵ) resultante da aplicação da tensão sobre o corpo é expressa da seguinte forma:

$$\epsilon = \Delta L / L_0$$

Onde ΔL é a deformação sofrida e L_0 é o comprimento inicial do corpo de prova.

2.4.3. Deformação elástica e Deformação plástica

A parte inicial do gráfico tensão/deformação é uma reta linear definida pela equação:

$$E = \sigma / \varepsilon$$

Essa equação fornece o módulo da elasticidade, cuja constante de proporcionalidade (E) é a expressão da lei de Hooke, ou módulo de Young.

O processo de deformação no qual a tensão e a deformação são proporcionais é chamado de deformação elástica. Um gráfico da tensão em função da deformação (Fig.7) resulta em uma reta linear cuja inclinação (coeficiente angular) corresponde ao módulo da elasticidade E . Esse módulo pode ser considerado como sendo uma rigidez, ou resistência do material à deformação elástica. Quanto maior for esse módulo, mais rígido será o material ou menor será a deformação elástica que resultará da aplicação de uma dada tensão.

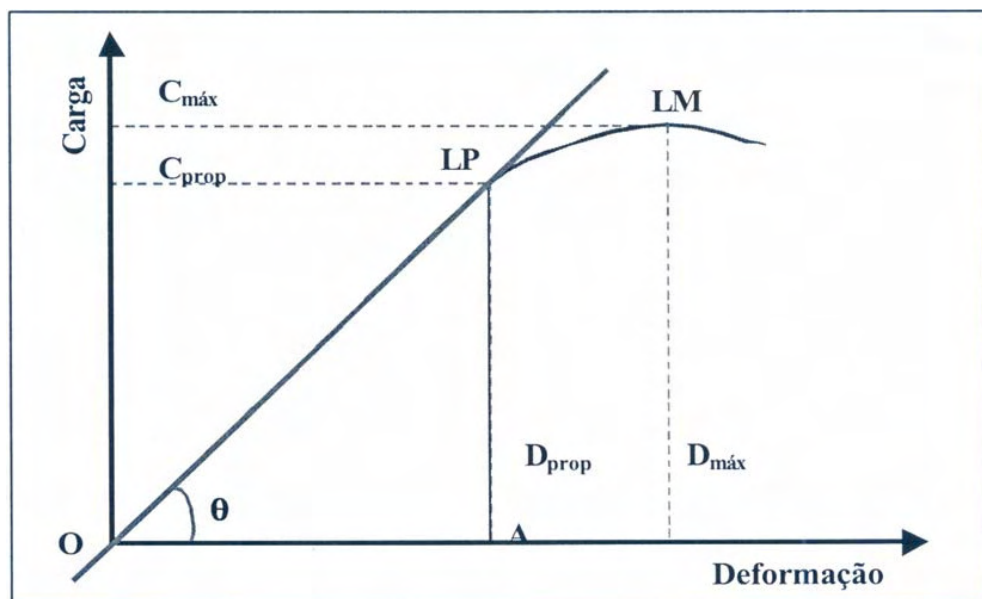


Figura 7: Curva carga x deformação. ($C_{máx}$) carga máxima. (C_{prop}) carga no limite de proporcionalidade. (D_{prop}) deformação no limite de proporcionalidade. ($D_{máx}$) deformação na força máxima. (LM) limite máximo. (LP) limite de proporcionalidade.

Fonte: ROCHA, 2006.

A deformação elástica não é permanente, o que significa que quando a carga aplicada é liberada, a peça retorna a sua forma original. O gráfico

tensão/deformação (Figura 8), mostra a aplicação da carga corresponde a um movimento para cima a partir da origem e ao longo da linha reta. Com a liberação da carga, a linha é percorrida na direção oposta de volta a origem.

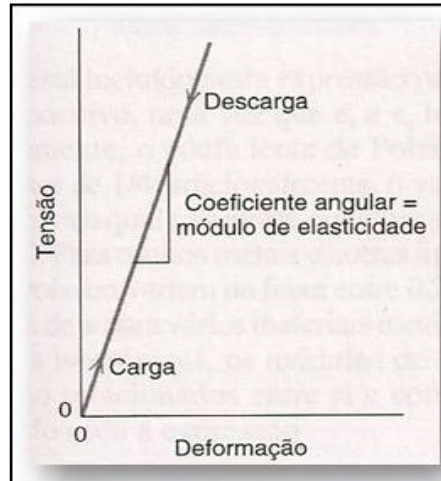


Figura 8: Diagrama esquemático tensão-deformação, mostrando a deformação elástica linear para ciclos de carga e descarga.

Fonte: CALLISTER, 2002

Existem alguns materiais para os quais a porção elástica inicial da curva tensão/deformação não é linear; assim, não é possível determinar um módulo de elasticidade conforme aquele descrito acima. Para este comportamento não linear, utiliza-se normalmente um módulo tangencial ou um módulo secante. O módulo tangencial é tomado como sendo a inclinação da curva tensão/deformação em um nível de tensão específico, enquanto o módulo secante representa a inclinação de uma secante tirada desde a origem até algum ponto específico sobre a curva σ - ϵ .

A partir do ponto crítico A, a linearidade desaparece e o material ultrapassa seu limite elástico, isto é, a partir desse ponto, mesmo retiradas às cargas que atuam sobre o corpo, alguma deformação residual será observada. Esse ponto A é denominado limite elástico.

Na Figura 7 está representada uma curva carga x deformação de um material ideal, onde o trecho do gráfico compreendido entre a origem e o limite elástico é

denominado zona elástica. Enquanto o material estiver nessa fase do gráfico, terá um comportamento elástico e obedecerá à lei de Hooke⁽⁴⁰⁾. Em biomateriais, esta fase representa a extensibilidade tecidual sem desencadeamento de ruptura⁽⁶⁾.

Após a zona de deformação elástica ocorre a zona de deformação plástica, onde o material já não apresenta proporcionalidade entre tensão e deformação e, cessadas as cargas que atuavam no corpo, o material que se encontrar neste estágio apresentará deformação permanente, encontrando-se assim falhas estruturais nos tecidos biológicos⁽⁶⁾.

Em ensaios de tração realizados com materiais biológicos, o limite de proporcionalidade pode não ser identificável. Dessa forma, outros referenciais são adotados como a carga máxima e a deformação máxima⁽²²⁾.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo do presente estudo foi descrever os efeitos dos protocolos de imobilização gessada, da remobilização livre e da remobilização por meio de exercício físico sobre as propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratos de duas faixas de idade.

3.2. Específicos

- Descrever valores das propriedades mecânicas de alongamento e carga no limite máximo e rigidez de ratos adultos e idosos.
- Analisar os efeitos da imobilização, remobilização livre e por meio de exercício físico sobre as propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio realizando comparações com os grupos controle.
- Analisar os efeitos da imobilização, remobilização livre e por meio de exercício físico sobre o aspecto histológico do músculo gastrocnêmio, realizando medidas de menor diâmetro das fibras musculares.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 69 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu-SP, sendo transferidos em duas etapas para o biotério do Laboratório de Histologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - FCT/UNESP. Na primeira etapa foram transferidos 35 animais com 45 dias de idade, permanecendo no biotério deste laboratório por aproximadamente 410 dias a fim de completar a idade de 15 meses. Posteriormente, foram transferidos mais 34 animais com 60 dias de idade, permanecendo neste biotério por aproximadamente 90 dias para completar a idade de cinco meses.

Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas de polipropileno com quatro animais, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19h), com acesso à água e alimentação padrão (MP-77, Primor) *ad libitum*.

Os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente sob o protocolo nº 312/2008 (ANEXO I) seguindo os princípios éticos na experimentação animal (COBEA). Devido a modificações no projeto original e a instituição do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente no ano de 2010, este projeto foi reencaminhado, sendo aprovado sob protocolo nº 05/2010 (ANEXO II).

4.2. Grupos experimentais

Os primeiros animais transferidos compunham o *Grupo Idoso (Grupo B)* que foram mantidos no biotério até completaram a idade de 15 meses⁽⁴¹⁾. O segundo grupo de animais foi denominado *Grupo Adulto (Grupo A)*, mantidos no biotério até completarem cinco meses de idade para início dos experimentos. Imediatamente após a chegada de cada grupo no Biotério do Laboratório de Histologia, estes foram subdivididos em quatro grupos experimentais, utilizando o seguinte processo de aleatoriedade:

Três pessoas foram envolvidas no procedimento. A primeira etiquetou o fundo das gaiolas (referenciando os subgrupos do experimento). A segunda pessoa recebeu as gaiolas com os animais, colocando-as no chão e saindo do ambiente. A terceira entrou no ambiente, pegando um animal aleatoriamente e colocando-o em uma gaiola até as quatro terem um animal cada. Essa pessoa saiu do ambiente. A segunda pessoa retornava e alterava a ordem das oito gaiolas e saía para a entrada da terceira pessoa no ambiente e o processo foi repetido sucessivamente, invertendo-se a ordem das gaiolas e das pessoas, para que a escolha dos animais não tivesse um critério, nem uma rotina, até que todos os animais foram alocados nas gaiolas.

Sendo assim, os subgrupos foram classificados da seguinte maneira:

- *Adulto controle (A1) e Idoso controle (B1)*

Animais que permaneceram no biotério durante o período experimental e foram eutanasiados de forma pareada com os grupos remobilizados.

- *Adulto imobilizado (A2) e Idoso imobilizado (B2)*

Animais que foram submetidos à imobilização gessada, sendo eutanasiados logo após a retirada da mesma.

- *Adulto imobilizado e remobilizado livre (A3) e Idoso imobilizado e remobilizado livre (B3)*

Animais que foram submetidos à imobilização gessada, seguida de remobilização livre, sendo posteriormente eutanasiados.

- *Adulto imobilizado e remobilizado por meio de exercício físico (A4) e Idoso imobilizado e remobilizado por meio de exercício físico (B4)*

Animais que foram submetidos à imobilização gessada seguida de dois dias de remobilização livre e exercício físico de natação por período de cinco dias, sendo posteriormente eutanasiados.

Desta forma, cada subgrupo foi composto com oito animais, sendo os animais restantes distribuídos nos subgrupos experimentais adultos (A2, A3 e A4) e idosos (B2, B3 e B4).

4.3. Técnica de Imobilização

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (80mg/kg) e cloridrato de xilazina (15mg/kg) via intraperitoneal⁽⁴⁾.

Após a efetivação da anestesia, os ratos tiveram os tornozelos envolvidos por uma malha tubular, sendo em seguida utilizada uma atadura gessada de secagem rápida com aproximadamente três cm de largura, aplicada de maneira convencional para a imobilização dos membros posteriores, desde a pelve até o tornozelo (Figura 9). O gesso foi substituído quando necessário, respeitando o mesmo procedimento.

Foi realizada imobilização bilateral, com ambos os membros posteriores (pelve, quadril e joelho) em extensão e o tornozelo em flexão plantar, o que manteve o músculo gastrocnêmio em posição de encurtamento⁽⁴⁾.



Figura 9: Aplicação da técnica de imobilização gessada

Os animais permaneceram imobilizados por sete dias consecutivos^(3, 4, 20, 42) e foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso a água e ração.

4.4. Remobilização livre

Após a retirada da imobilização, os animais dos grupos A3 e B3 foram colocados em gaiolas coletivas para remobilização livre, permanecendo no biotério por período de sete dias, sendo posteriormente eutanasiados.

Os animais dos grupos A4 e B4 também foram submetidos ao mesmo procedimento, porém por período de dois dias, antes da aplicação do protocolo de exercício físico.

4.5. Adaptação ao meio líquido

Anteriormente a aplicação da técnica de imobilização gessada nos animais dos grupos A4 e B4, estes foram submetidos a um processo de adaptação ao meio líquido.

A adaptação ocorreu em um tanque cilíndrico com superfície lisa, medindo 120cm de diâmetro por 75cm de altura, com nível da água em 10 cm, temperatura da água mantida a $31 \pm 1^\circ\text{C}$, com duração de 15 minutos por 10 dias consecutivos. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal sem, entretanto, promover adaptações fisiológicas decorrentes do exercício físico.

4.6. Protocolo de exercício físico

Após dois dias de remobilização livre, os animais dos subgrupos A4 e B4 foram submetidos a cinco sessões (diárias) individuais de natação em um tanque medindo 120cm de diâmetro x 75cm de altura, divididos em oito compartimentos cilíndricos de PVC (30cm de diâmetro x 120cm de altura) contendo água a 70 cm de profundidade com temperatura de $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Não houve adição de carga nos animais e cada sessão teve duração de 25 minutos (Figura 10).

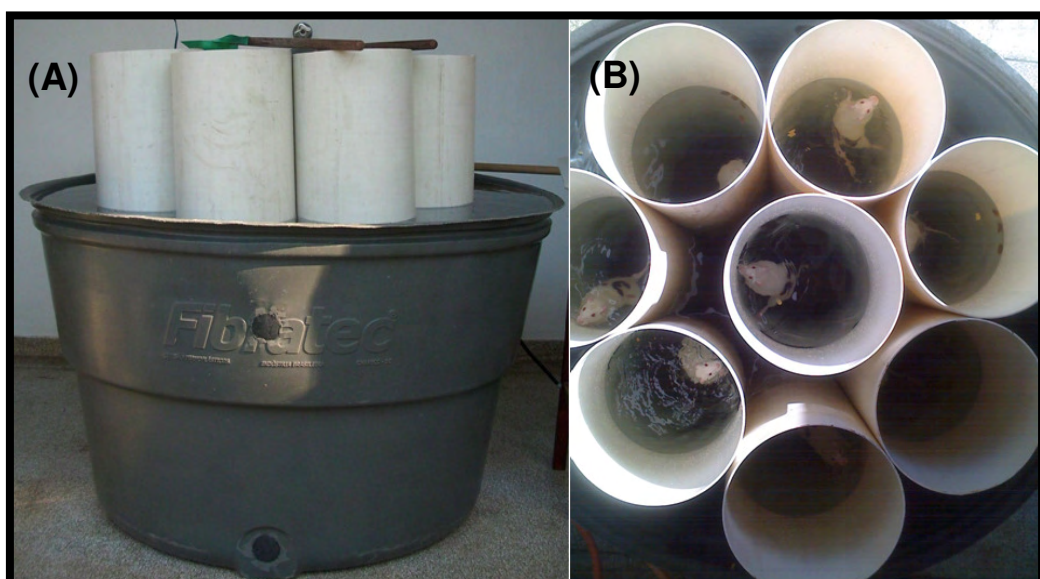


Figura 10: Tanque com compartimentos de PVC utilizados para realização do protocolo de exercício físico. A: vista lateral. B: vista superior.

4.7. Coleta e preparo do material

Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de uma dose excessiva de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina via intraperitoneal, seguindo os princípios éticos em pesquisa animal^(6, 43)

O músculo gastrocnêmio direito de cada animal foi retirado por meio da remoção da pele e de algumas partes moles sendo tomada a precaução para manter sua integridade, preservando a origem no terço distal do fêmur e a inserção no calcâneo para facilitar a fixação da peça à máquina de ensaio.

Após a dissecação, o músculo foi colocado em solução de lactato de Ringer, em temperatura ambiente, até o momento da realização dos ensaios de tração, período este inferior à uma hora⁽⁴⁾.

O músculo gastrocnêmio esquerdo foi congelado por meio do sistema de imersão em N-hexana resfriada a -70°C em nitrogênio pelo *Método de Congelamento de Tecido Não Fixado*.

Para realização deste procedimento foi colocado de 30 a 50 mL de N-hexana em um béquer amarrado a um fio isolante para imersão em nitrogênio. Por meio de um bastão de vidro o líquido intermediário foi agitado até atingir um estado pastoso (-70°C a -80°C), onde foram imersos os blocos de tecido muscular por 20 a 30 segundos. Após tal procedimento, os blocos congelados foram transferidos a câmara do micrótomo criostato "HM 505 E Microm" (-20°C) e mantidos na câmara até que o estabelecimento do equilíbrio térmico (20 a 30 min), sendo posteriormente colocados em cápsulas plásticas identificadas e armazenados em botijão de nitrogênio a -180°C para posterior análise morfométrica.

4.8. Ensaio mecânico de tração muscular

Para o ensaio de tração foi utilizado uma máquina universal de ensaios (marca EMIC®, modelo DL2000) do Departamento de Física, Química e Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente – FCT/UNESP, equipada com célula de carga de capacidade de 50kgf.

A máquina utilizada possui interface direta a um microcomputador, com o software Tesc ®, capaz de gerar um gráfico, carga versus alongamento, para cada ensaio.

Dois conjuntos de acessórios foram confeccionados para a fixação da peça a ser testada, sendo um para fixação do fêmur e outro para fixação do calcâneo, mantendo o joelho e tornozelo com 90° de angulação.

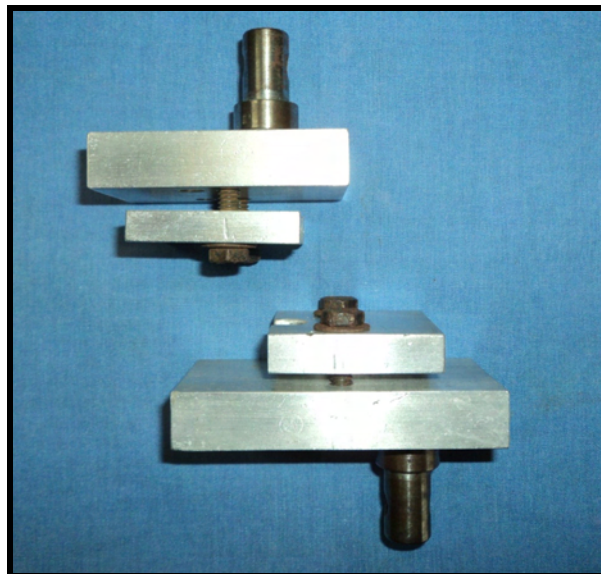


Figura 11: Conjunto de acessórios confeccionados para fixação do fêmur e do calcâneo.

Antes de iniciar o ensaio, o músculo é acoplado à máquina e são realizadas medidas de perímetro do músculo gastrocnêmio e comprimento do complexo fêmur-gastrocnêmio-calcâneo.

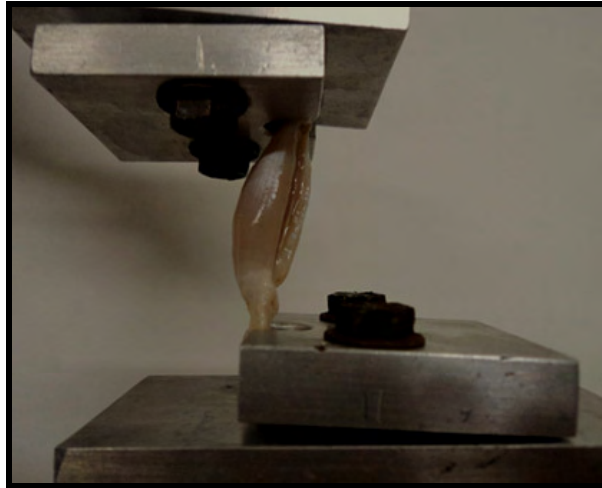


Figura 12: Músculo gastrocnêmio acoplado as peças de fixação.

No momento do ensaio, o músculo é submetido a uma pré-carga de 300g⁽⁶⁾ durante o tempo de 30 segundos, com o intuito de promover a acomodação do sistema.

Após a pré-carga, o ensaio prosseguiu com velocidade preestabelecida de 10 mm/minuto. A carga aplicada foi registrada pelo software em intervalos regulares de alongamento até o momento de ruptura do músculo.

A partir dos gráficos, carga versus alongamento de cada ensaio, foram obtidas e analisadas as seguintes propriedades mecânicas:

- Carga no limite máximo (CLM): corresponde ao ponto gráfico de maior valor de força em Newton (N) obtido pelo músculo no ensaio de tração.

- Alongamento no limite máximo (ALM): é representada pelo valor de deformação em milímetros ($\times 10^{-3}m$) atingido no Limite Máximo.

- Rigidez relativa: representa o quanto o músculo é capaz de deformar sem que seja danificada a arquitetura muscular, corresponde à tangente do ângulo (θ), sendo representada em newtons/metro (N/m).

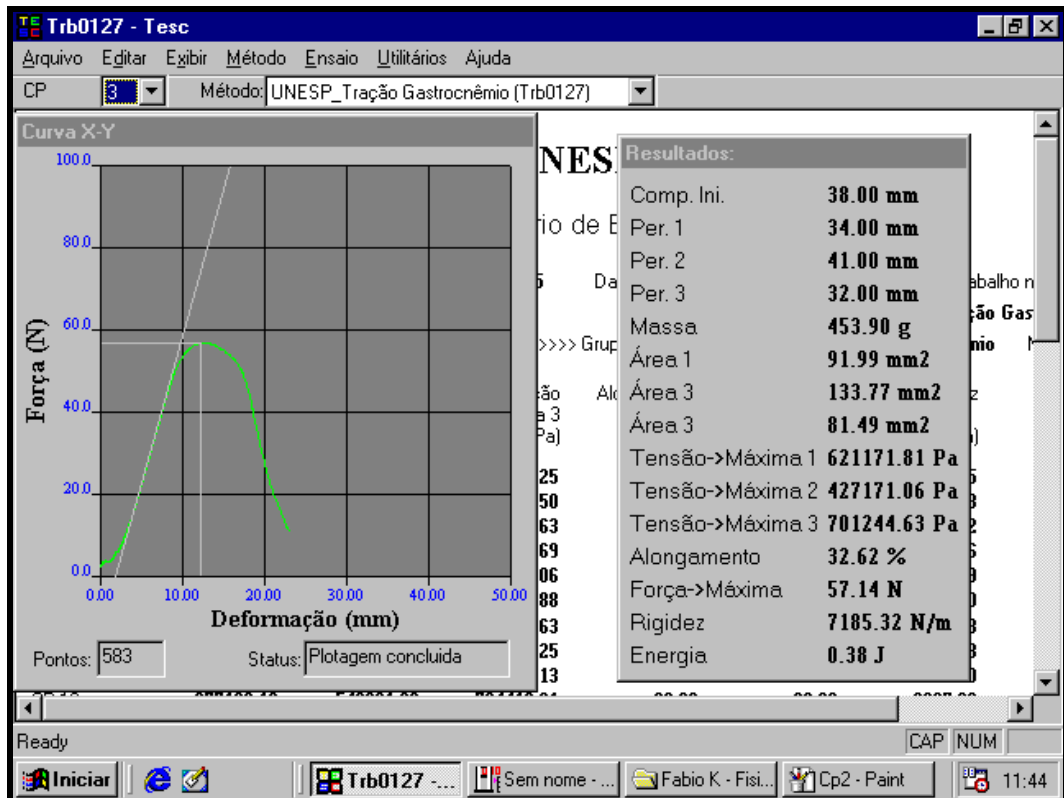


Figura 13: Imagem do Programa Tesc, demonstrando gráfico e resultados do ensaio de tração muscular.

4.9. Análise morfométrica das fibras musculares

Os blocos de tecido muscular foram retirados do botijão de nitrogênio (-180 °C) e transferidos para a câmara do micrótomo criostato (-20 °C), sendo mantidos neste ambiente, para estabelecer-se o equilíbrio térmico, durante 20 a 30 minutos (Figura 14). Posteriormente foram fixados em suportes metálicos do criostato por meio de pequenas quantidades de adesivo (OCT – Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras musculares.



Figura 14: Micrótomo criostato - HM 505 E Microm com blocos de tecido muscular fixados.

A microtomia foi realizada mediante temperatura de -20°C , com espessura de $5\mu\text{m}$, seguindo-se as técnicas e cuidados adequados. Em seguida foram confeccionadas lâminas com os cortes histológicos corados pelo método Hematoxilina e Eosina (HE) ⁽⁴⁴⁾.

Foram capturadas aproximadamente três campos de cada amostra muscular com objetiva 20x por meio do software NIS-Elements D3.0 - SP7 - Nikon®, sendo efetuadas mensurações do menor diâmetro de 120 fibras musculares (μm)⁽²³⁾. Buscou-se evitar que a mesma área fosse fotografada duas vezes.

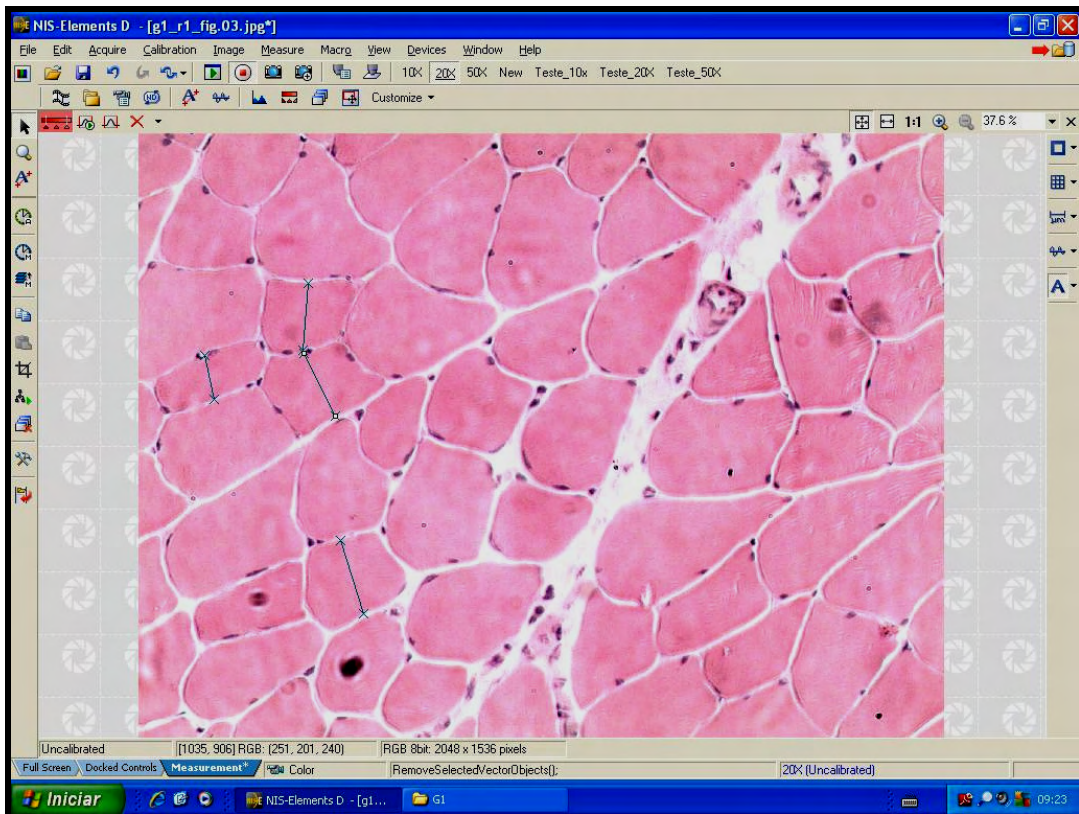


Figura 15: Imagem do software NIS-Elements D3.0 - SP7 (Nikon®) demonstrando medidas de menor diâmetro das fibras musculares.

4.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SPSS 17.0 for Windows, sendo aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, as variáveis foram analisadas considerando os resultados de normalidade e o objetivo da análise.

Os dados de massa corpórea, força no limite máximo, rigidez, comprimento, perímetro, massa do gastrocnêmio e morfometria apresentaram-se normais, sendo assim utilizou-se testes paramétricos. Para comparação entre os subgrupos dentro de cada grupo (A e B) foi utilizada a análise de variância (ANOVA-One-Way), seguido do pós-teste de Tukey realizados por meio do programa estatístico SPSS.

Para estabelecer comparações entre os tempos T_0 , T_1 e T_2 de massa corpórea para os subgrupos adultos A1, A3 e A4 e idosos B1, B3 e B4, realizou-se a

Análise de Variância para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey-Kramer utilizando o programa estatístico InStat Graphpad® (v.3.01). Como a eutanásia dos subgrupos A2 e B2 ocorreu no tempo 1 (T_1), não foram apresentados dados no tempo 2 (T_2), sendo assim foi aplicado o teste t pareado para comparar os tempos T_0 e T_1 .

Os dados de alongamento no limite máximo apresentaram-se não normais tanto no grupo A quanto no grupo B. Sendo assim, para comparar os subgrupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn por meio do programa InStat.

Para todas as análises utilizou-se nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

Treze animais não puderam ser utilizados, dentre esses, sete pertenciam ao Grupo Idoso (B) e seis ao Grupo Adulto (A). No aspecto geral três animais apresentaram uma atitude constante da cabeça em rotação para um lado e dificuldades de deambulação, fato que foi atribuído à ocorrência de transtornos do labirinto. O músculo de um animal apresentou ruptura na origem muscular do gastrocnêmio durante o ensaio mecânico, devido a erro na dissecação da peça; dois animais apresentaram alterações nos gráficos de carga x alongamento gerados por fraturas ósseas; três animais não resistiram à segunda anestesia feita para reparar o aparelho gessado, devido à laceração feita pelo animal; e quatro animais foram encontrados mortos em suas gaiolas sem causa aparente. Sendo assim, cada subgrupo foi composto por sete animais.

5.1. Massa corpórea

Foram realizadas medidas de massa corpórea dos animais antes da imobilização (tempo T_0) e logo após a retirada do aparelho gessado (tempo T_1) para os subgrupos adultos A2, A3, e A4 e idosos B2, B3 e B4. A medida da massa corpórea no tempo T_2 representa a medida logo após o período de remobilização (eutanásia) para os subgrupos adultos A3 e A4 e idosos B3 e B4. Para os subgrupos controle (A1 e B1) todos os tempos (T_0 , T_1 e T_2) representam intervalos de sete dias. Como a eutanásia dos subgrupos A2 e B2 ocorreu no tempo 1 (T_1), não são apresentados dados no tempo 2 (T_2).

A média e desvio padrão das medidas de massa corpórea dos grupos adulto e idoso estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Massa corpórea em gramas dos animais dos grupos adulto e idoso.

Grupos	Massa corpórea (T ₀)	Massa corpórea (T ₁)	Massa corpórea (T ₂)
A1	342,11 ± 30,77	360,71 ± 31,39 ^Δ	372,87 ± 33,63 [○]
A2	399,51 ± 32,26	339,17 ± 20,71 ^Δ	***
A3	408,19 ± 21,39	348,73 ± 34,60 ^Δ	360,13 ± 25,66 [○]
A4	439,33 ± 48,56	404,99 ± 47,18 ^Δ	413,26 ± 48,62 [○]
B1	537,70 ± 53,72	557,91 ± 41,60	578,60 ± 34,05 ^{Δ, ○}
B2	541,60 ± 46,58	450,16 ± 36,55 ^Δ	***
B3	481,93 ± 33,92	414,47 ± 24,66 ^Δ	450,31 ± 22,56 ^{Δ, ○}
B4	541,20 ± 45,78	446,97 ± 61,76 ^Δ	476,19 ± 40,34 ^{Δ, ○}

^ΔDiferença estatisticamente significativa em relação ao tempo anterior. [○]Diferença significativa em relação à T₀. T₀: início do experimento. T₁: para os subgrupos 2, 3 e 4 (A2, B2; A3, B3; A4, B4) representa o efeito de 7 dias de imobilização. T₂: para os subgrupos 3 e 4 (A3, B3; A4, B4) representa o efeito da remobilização.

A comparação dos valores da massa corpórea entre os subgrupos adulto (A) tanto no início do experimento (F = 9,591; p = 0,000) quanto na eutanásia (F = 5,948; p = 0,004) demonstraram diferenças significativas.

Entre os subgrupos idoso (B) não foram encontradas diferenças significantes no início do experimento (F = 2,514; p = 0,082), sendo estas observadas na eutanásia (F = 22,564; p = 0,000).

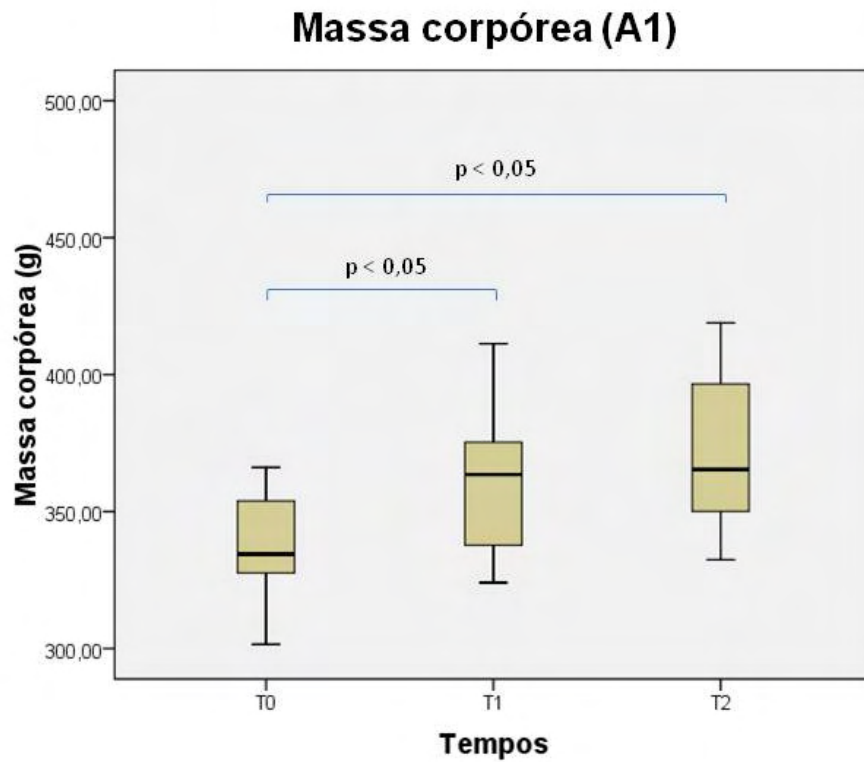


Figura 16: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A1 nos tempos T₀, T₁ e T₂. T₀ = início do experimento. T₁ = 7 dias após o início do experimento. T₂ = 14 dias após o início do experimento.

Foram observadas diferenças significantes entre os tempos T₀ e T₁, para todos os subgrupos A e para os subgrupos B2, B3 e B4, sendo que apenas A1 apresentou aumento significativo em T₁.

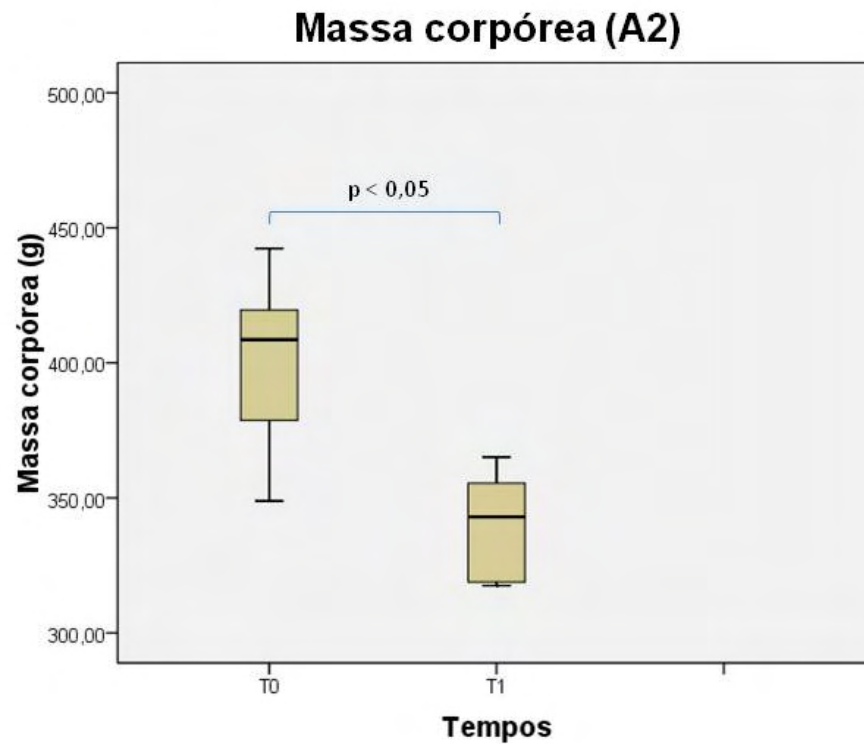


Figura 17: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A2 nos tempos T_0 , T_1 e T_2 . T_0 = início do experimento. T_1 = após 7 dias de imobilização.

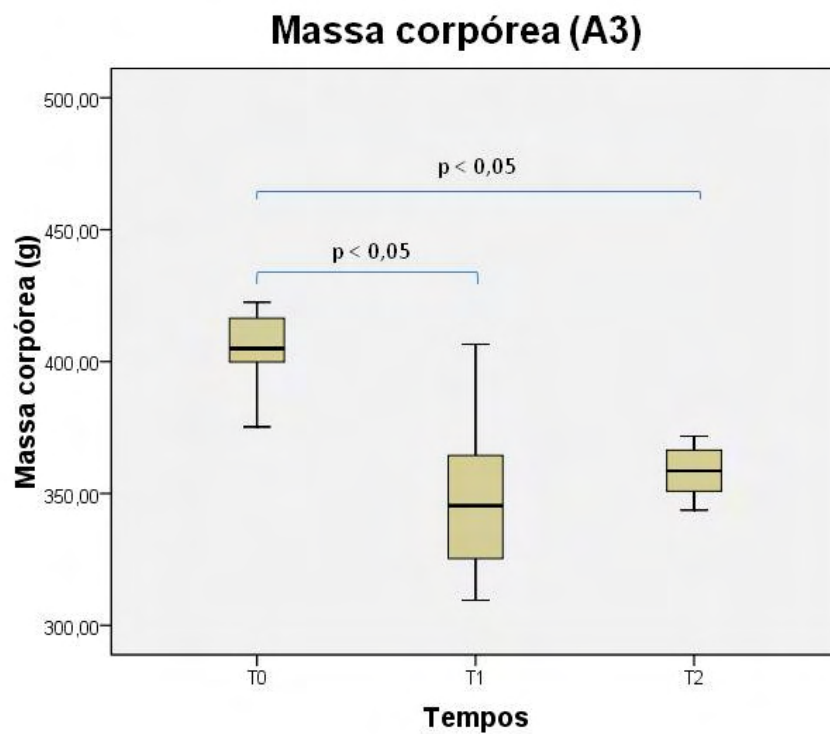


Figura 18: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A3 nos tempos T_0 , T_1 e T_2 . T_0 = início do experimento. T_1 = após 7 dias de imobilização. T_2 = após 7 dias de remobilização livre.

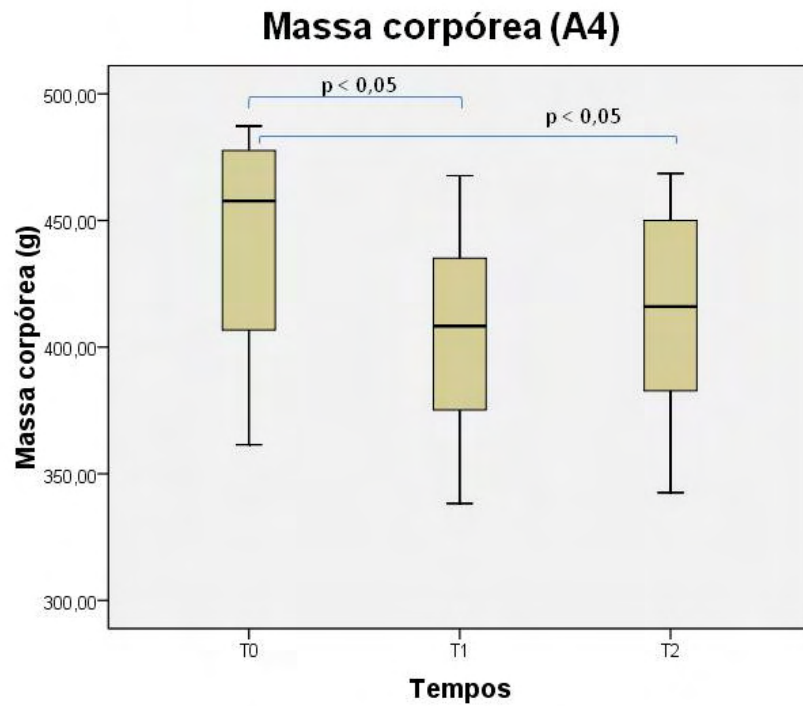


Figura 19: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo A4 nos tempos T_0 , T_1 e T_2 . T_0 = início do experimento. T_1 = após 7 dias de imobilização. T_2 = após período de remobilização por meio de exercício físico.

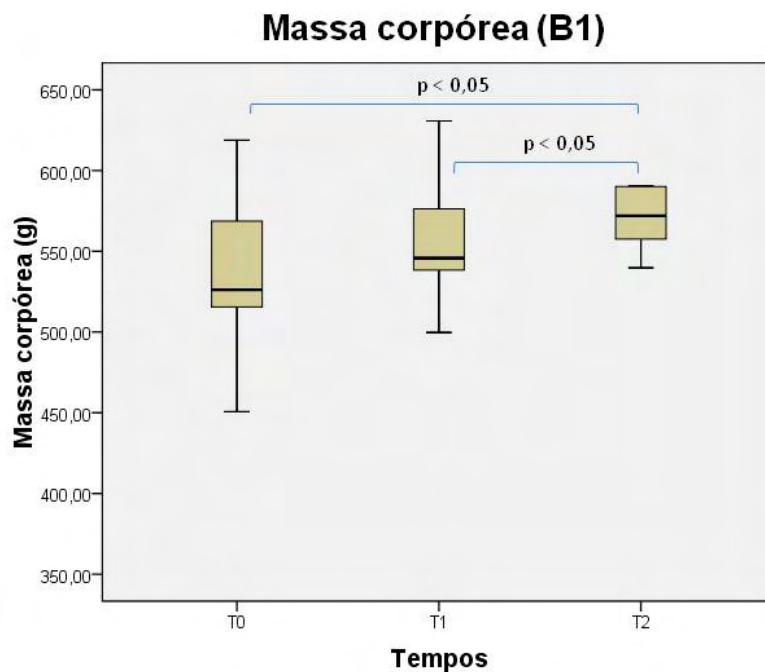


Figura 20: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B1 nos tempos T_0 , T_1 e T_2 . T_0 = início do experimento. T_1 = 7 dias após o início do experimento. T_2 = 14 dias após o início do experimento.

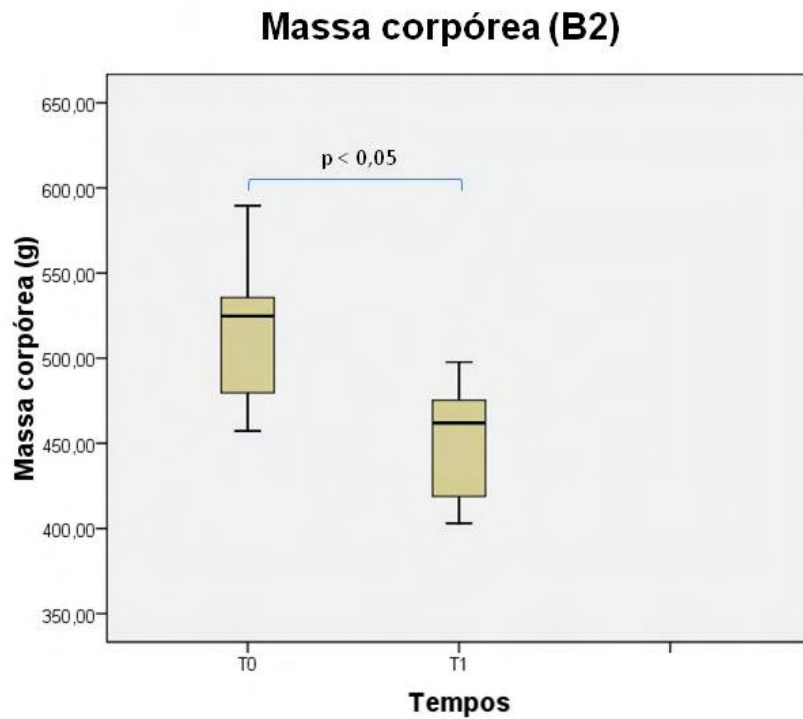


Figura 21: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B2 nos tempos T_0 , T_1 e T_2 . T_0 = início do experimento. T_1 = após 7 dias de imobilização.

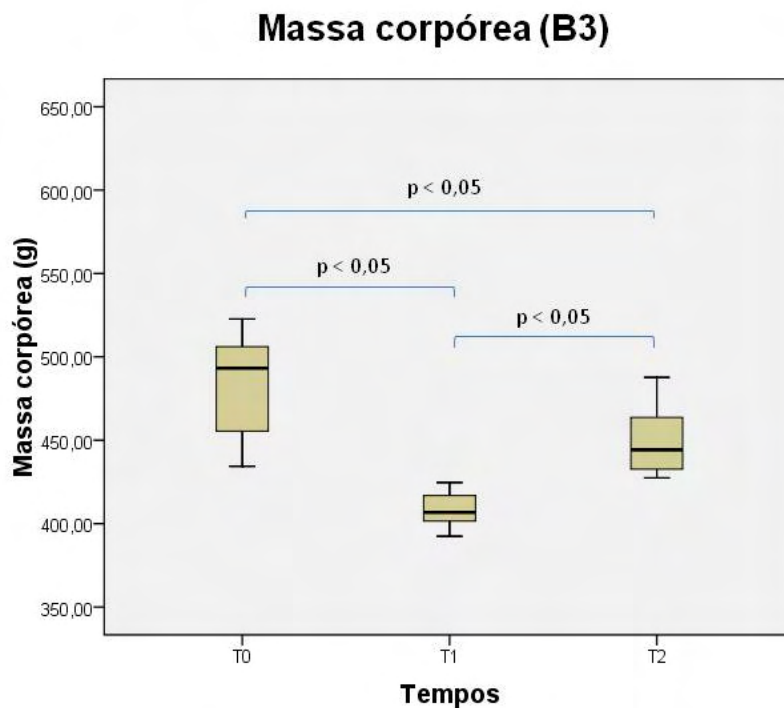


Figura 22: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B3 nos tempos T_0 , T_1 e T_2 . T_0 = início do experimento. T_1 = após 7 dias de imobilização. T_2 = após 7 dias de remobilização livre.

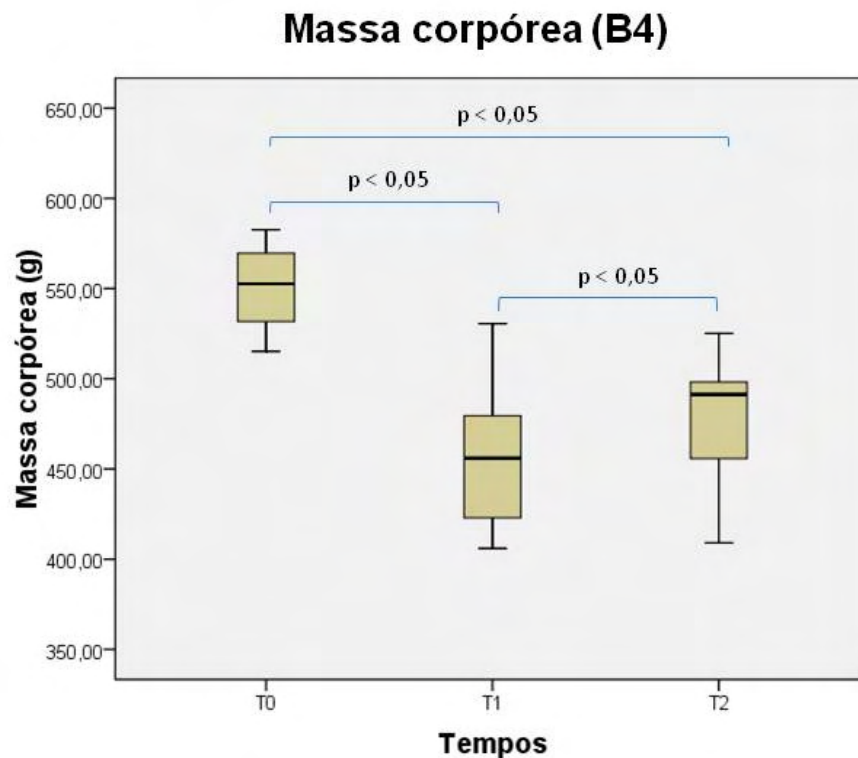


Figura 23: “Box-plot” das medidas de massa corpórea (em gramas) do subgrupo B4 nos tempos T_0 , T_1 e T_2 . T_0 = início do experimento. T_1 = após 7 dias de imobilização. T_2 = após período de remobilização por meio de exercício físico.

5.2. Medidas do músculo gastrocnêmio direito

As medidas de comprimento, perímetro e massa do músculo gastrocnêmio direito estão apresentadas nas tabelas 2 (grupos adultos) e 3 (grupos idosos), sendo os valores demonstrados como média e desvio-padrão. As medidas de comprimento foram realizadas na máquina de ensaios e representam medidas do complexo fêmur-gastrocnêmio-calcâneo.

Tabela 2. Medidas do músculo gastrocnêmio direito. Grupo adulto (A)

Grupos	Comprimento (mm)	Perímetro (mm)	Massa (Gastr Direito)
A1	47,71 ± 1,25	37,14 ± 2,34 ^{b,c}	3,153 ± 0,377 ^{b,c,d}
A2	47,86 ± 2,12	32,71 ± 1,89 ^a	2,601 ± 0,179 ^a
A3	47,86 ± 1,46	33,43 ± 1,81 ^a	2,398 ± 0,171 ^a
A4	48,86 ± 1,86	35,00 ± 1,91	2,609 ± 0,398 ^a

^ap<0,05 (comparado com A1); ^bp<0,05 (comparado com A2); ^cp<0,05 (comparado com A3); ^dp<0,05 (comparado com A4). A1 = Adulto controle; A2 = Adulto imobilizado; A3 = Adulto remobilizado livre e A4 = Adulto remobilizado por meio de exercício físico.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes tanto entre os subgrupos do grupo A como do grupo B em relação ao perímetro e à massa do gastrocnêmio.

Tabela 3. Medidas do músculo gastrocnêmio direito. Grupo idoso (B)

Grupos	Comprimento (mm)	Perímetro (mm)	Massa (Gastr Direito)
B1	48,86 ± 5,27	39,29 ± 1,25 ^{c,d}	4,410 ± 0,399 ^{b,c,d}
B2	49,14 ± 2,97	37,29 ± 3,90 ^c	3,279 ± 0,500 ^a
B3	51,29 ± 2,14	31,14 ± 1,95 ^{a,b}	2,816 ± 0,351 ^a
B4	52,29 ± 1,89	34,00 ± 1,41 ^a	3,067 ± 0,267 ^a

^ap<0,05 (comparado com B1); ^bp<0,05 (comparado com B2); ^cp<0,05 (comparado com B3); ^dp<0,05 (comparado com B4). B1 = Idoso controle; B2 = Idoso imobilizado; B3 = Idoso remobilizado livre e B4 = Idoso remobilizado por meio de exercício físico.

Nas figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18 são apresentadas a distribuição dos dados acima para cada parâmetro considerado. Para o item comprimento inicial foi observado que não houve diferença significante, tanto no grupo A quanto no grupo B.

Comprimento Inicial (Grupo A)

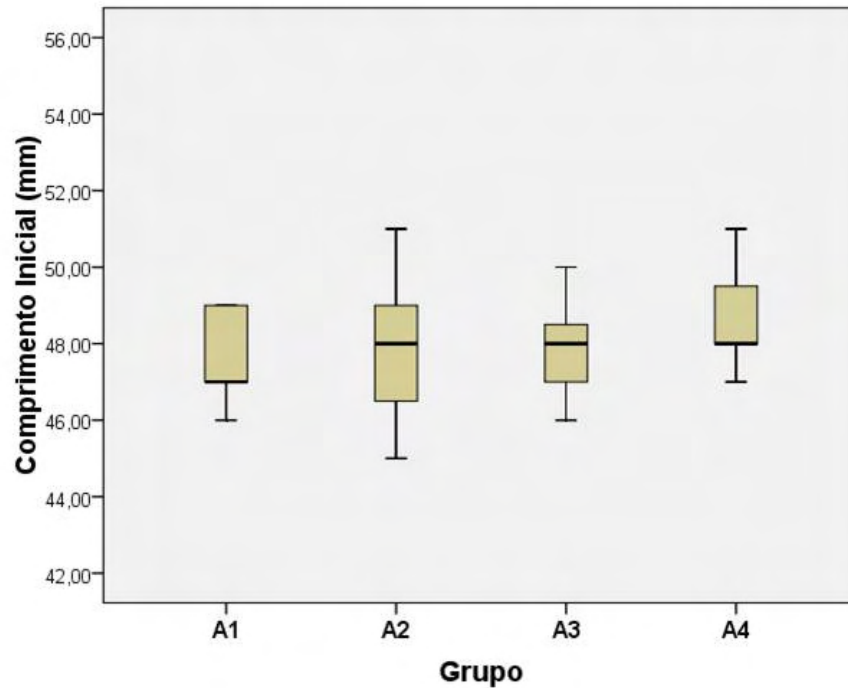


Figura 24: “Box-plot” das medidas de comprimento inicial do complexo fêmur-gastrocnêmio-calcâneo dos subgrupos adultos.

Comprimento Inicial (Grupo B)

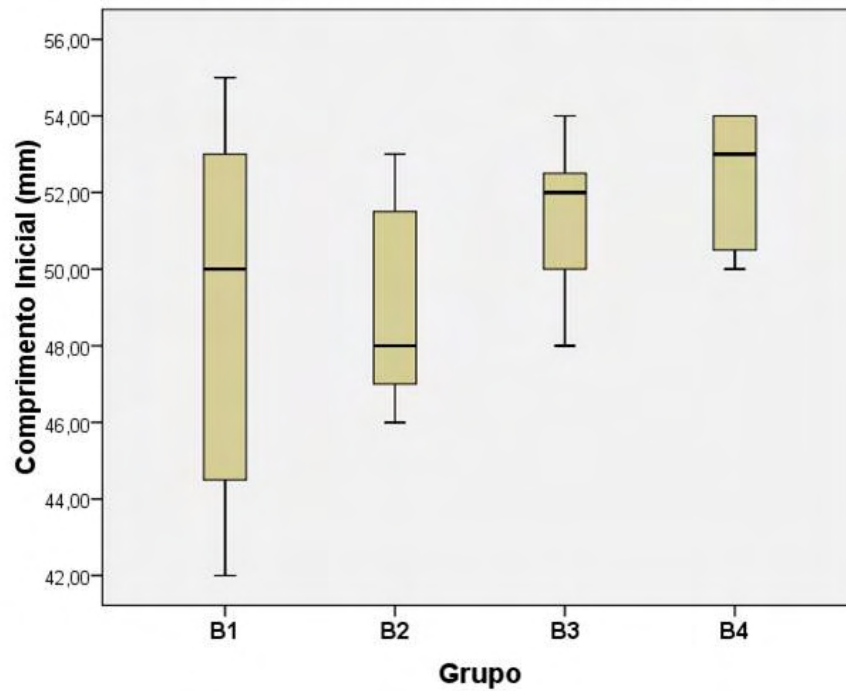


Figura 25: “Box-plot” das medidas de comprimento inicial do complexo fêmur-gastrocnêmio-calcâneo dos subgrupos idosos.

Perímetro (Grupo A)

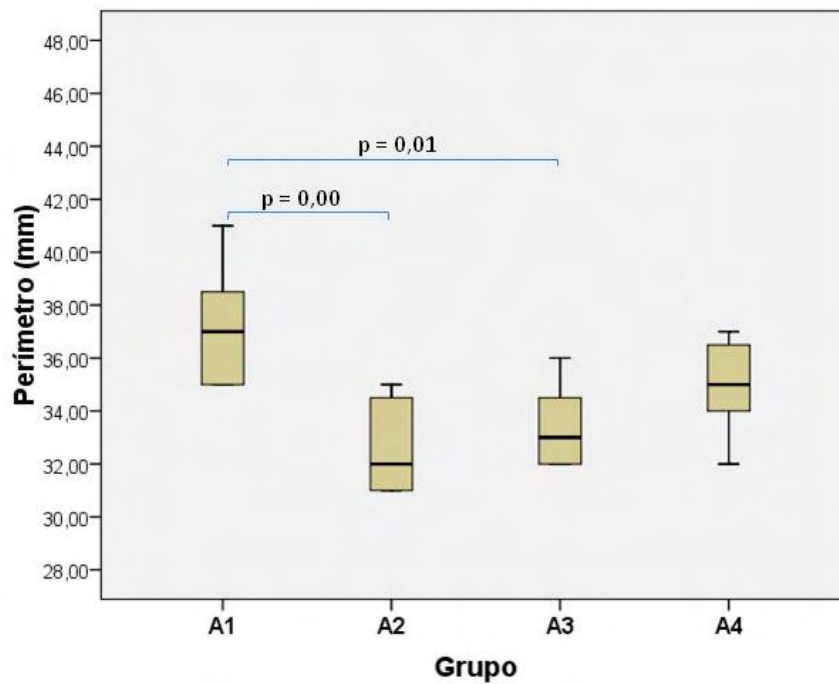


Figura 26: “Box-plot” das medidas de perímetro do músculo gastrocnêmio dos subgrupos adultos.

Perímetro (Grupo B)

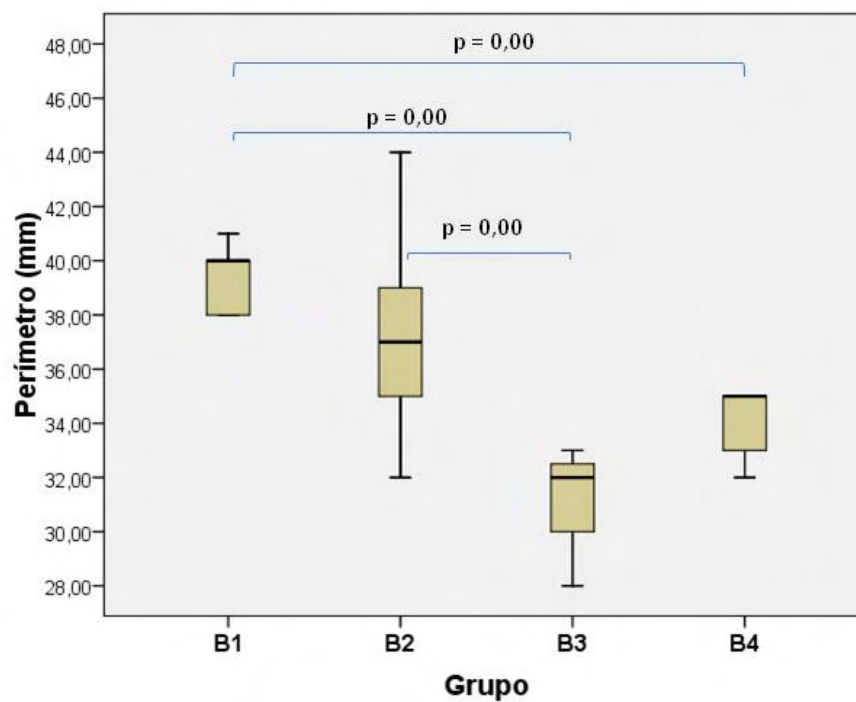


Figura 27: “Box-plot” das medidas de perímetro do músculo gastrocnêmio dos subgrupos adultos.

Massa do Gastrocnêmio Direito (Grupo A)

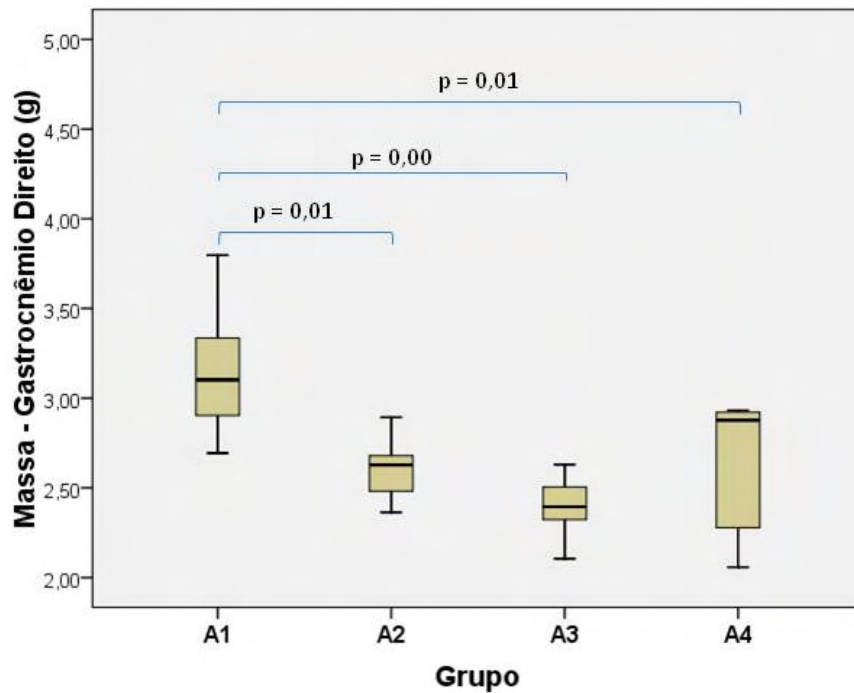


Figura 28: “Box-plot” das medidas de massa do gastrocnêmio dos animais dos subgrupos adultos.

Massa do Gastrocnêmio Direito (Grupo B)

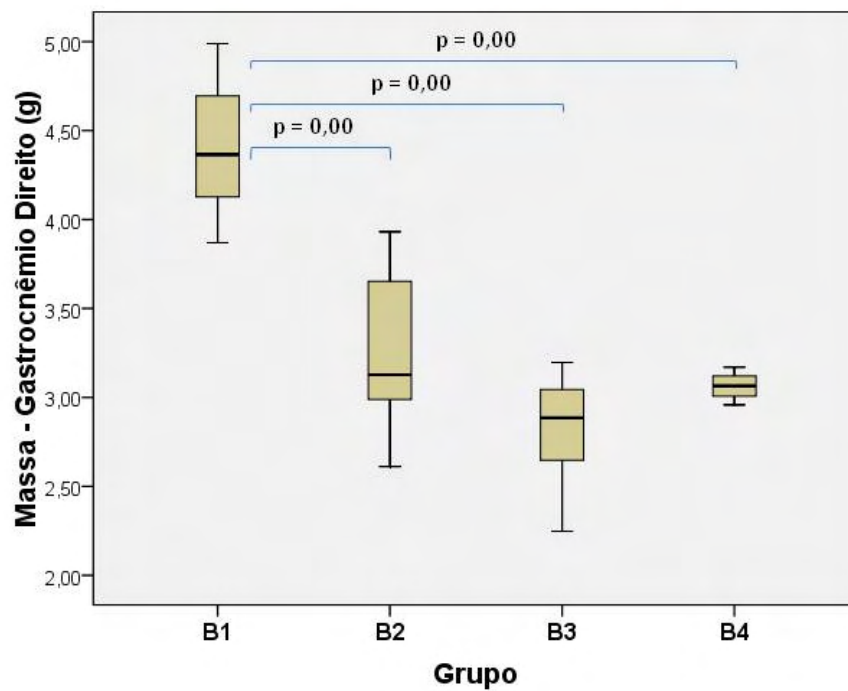


Figura 29: “Box-plot” das medidas de massa do gastrocnêmio dos animais dos subgrupos idosos.

5.3. Propriedades biomecânicas

As propriedades mecânicas de alongamento no limite máximo (ALM), carga no limite máximo (CLM) e rigidez estão apresentadas nas tabelas 5 (grupo A) e 6 (grupo B).

Tabela 4. Propriedades biomecânicas do grupo adulto (A)

Grupos	Alongamento no Limite Máximo ($\times 10^{-3}\text{m}$)	Carga no Limite Máximo (N)	Rigidez ($\times 10^3\text{N/m}$)
A1	16,67 \pm 4,05	53,49 \pm 2,40 ^{b,c,d}	4,88 \pm 0,84
A2	12,22 \pm 2,40	41,99 \pm 3,19 ^a	5,21 \pm 1,42
A3	12,46 \pm 1,43	39,59 \pm 4,25 ^a	4,31 \pm 0,78
A4	13,28 \pm 3,02	45,38 \pm 6,21 ^a	4,64 \pm 1,88

^ap<0,05 (comparado com A1); ^bp<0,05 (comparado com A2); ^cp<0,05 (comparado com A3); ^dp<0,05 (comparado com A4). A1 = Adulto controle; A2 = Adulto imobilizado; A3 = Adulto remobilizado livre e A4 = Adulto remobilizado por meio de exercício físico.

Tabela 5. Propriedades biomecânicas do grupo idoso (B)

Grupos	Alongamento no Limite Máximo ($\times 10^{-3}\text{m}$)	Carga no Limite Máximo (N)	Rigidez ($\times 10^3\text{N/m}$)
B1	15,65 \pm 3,14 ^{c,d}	60,33 \pm 3,96 ^{b,c,d}	5,03 \pm 1,39
B2	13,07 \pm 2,18	43,86 \pm 2,81 ^a	4,43 \pm 1,22
B3	10,92 \pm 2,05 ^a	42,73 \pm 5,78 ^a	5,43 \pm 1,20
B4	10,94 \pm 2,23 ^a	46,60 \pm 4,81 ^a	5,99 \pm 1,02

^ap<0,05 (comparado com B1); ^bp<0,05 (comparado com B2); ^cp<0,05 (comparado com B3); ^dp<0,05 (comparado com B4). B1 = Idoso controle; B2 = Idoso imobilizado; B3 = Idoso remobilizado livre e B4 = Idoso remobilizado por meio de exercício físico.

Os valores das propriedades mecânicas, alongamento e carga no limite máximo e rigidez estão apresentados nas figuras 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

Alongamento no Limite Máximo (Grupo A)

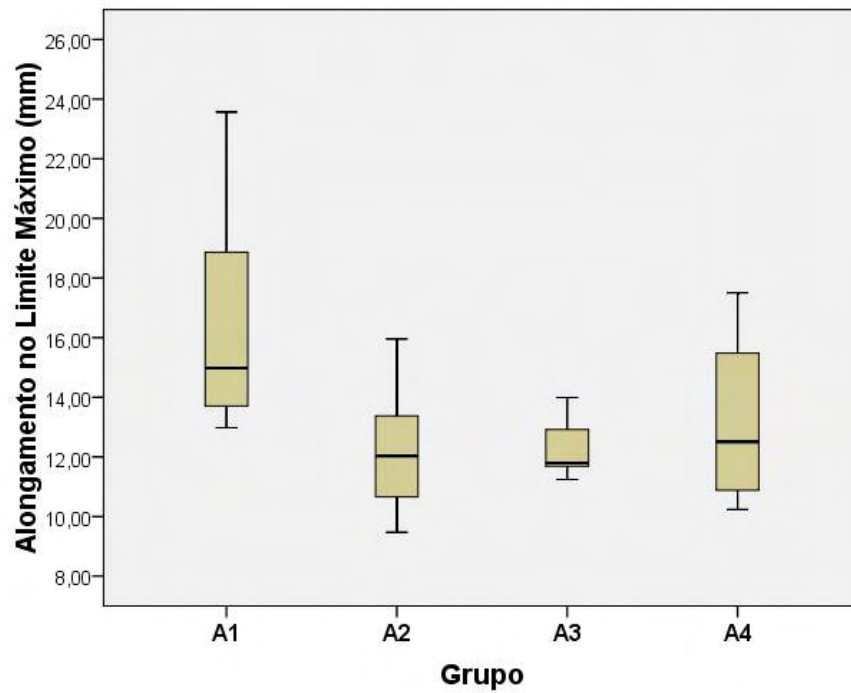


Figura 30: “Box-plot” dos valores de alongamento no limite máximo (ALM) dos subgrupos adultos.

Alongamento no Limite Máximo (Grupo B)

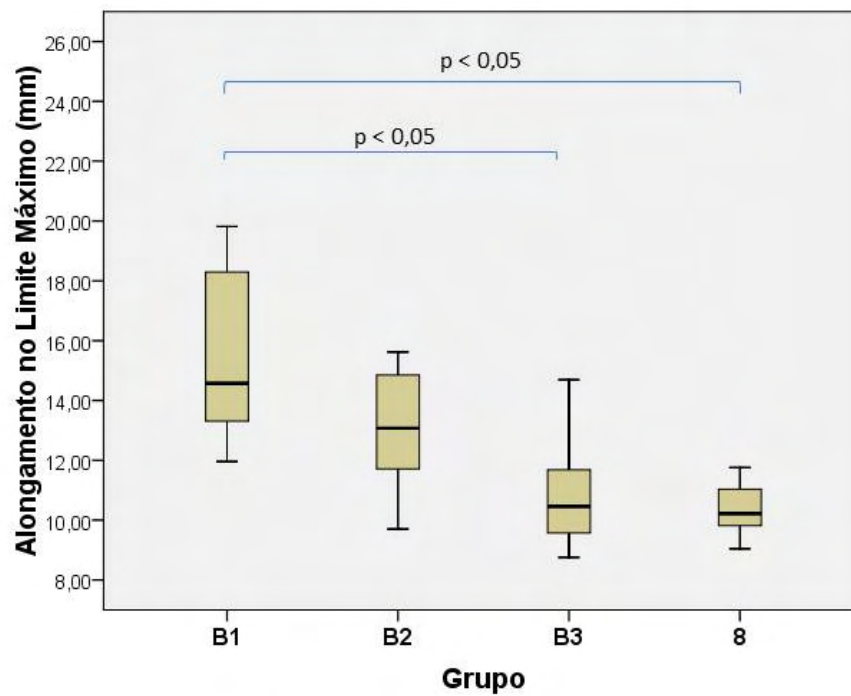


Figura 31: “Box-plot” dos valores de alongamento no limite máximo (ALM) dos subgrupos idosos.

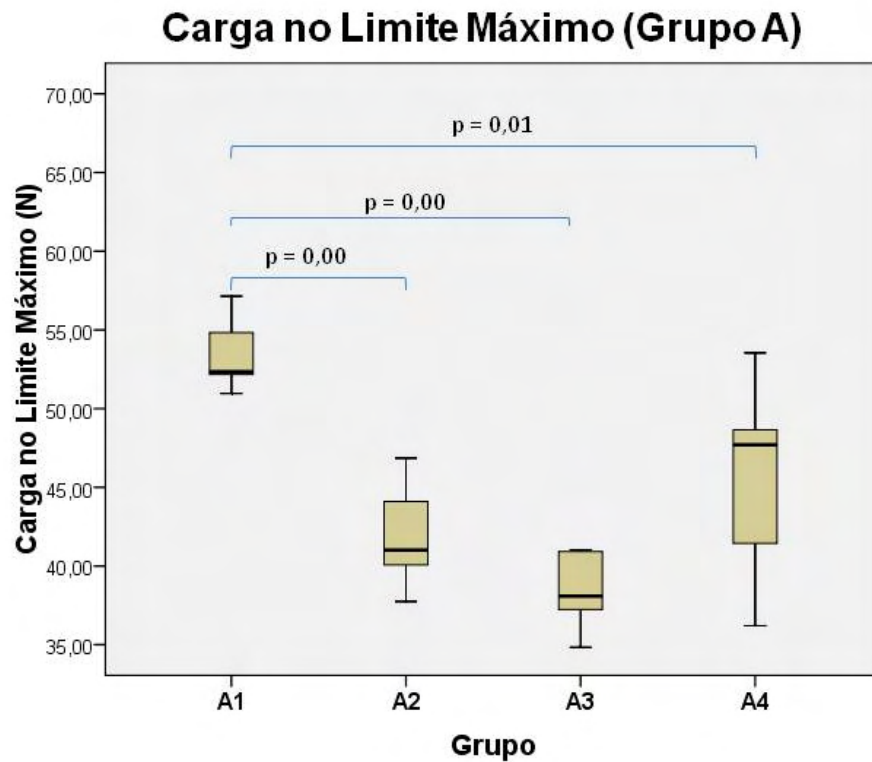


Figura 32: “Box-plot” dos valores de carga no limite máximo (CLM) dos subgrupos adultos.

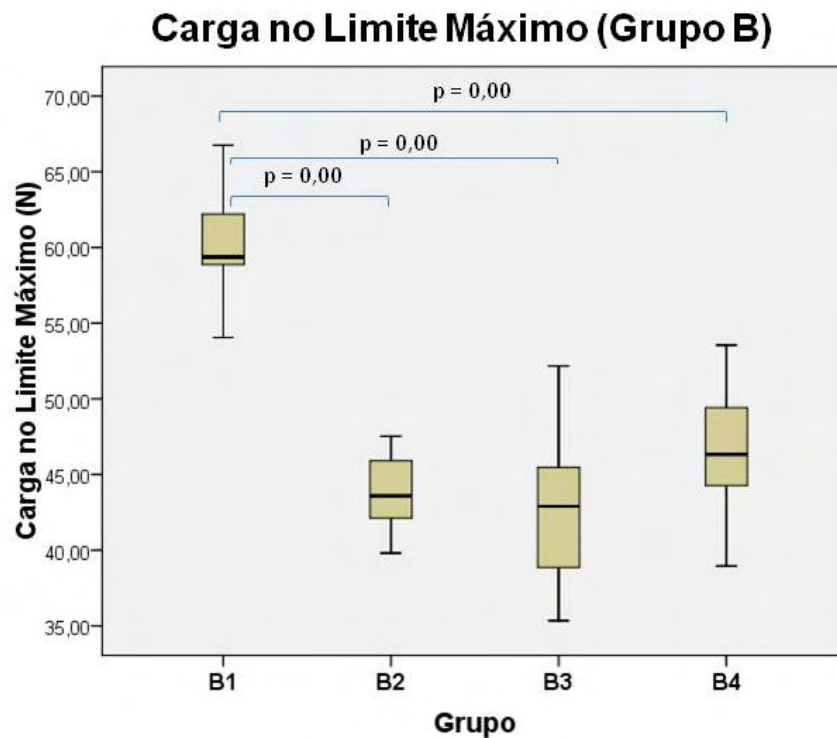


Figura 33: “Box-plot” dos valores de carga no limite máximo (CLM) dos subgrupos idosos.

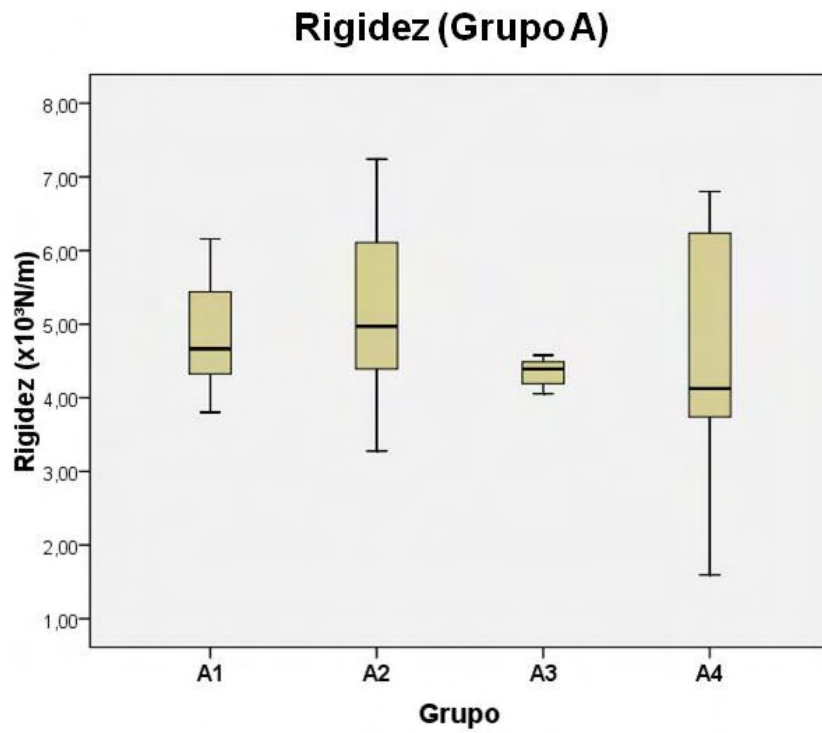


Figura 34: “Box-plot” dos valores de rigidez dos subgrupos adultos.

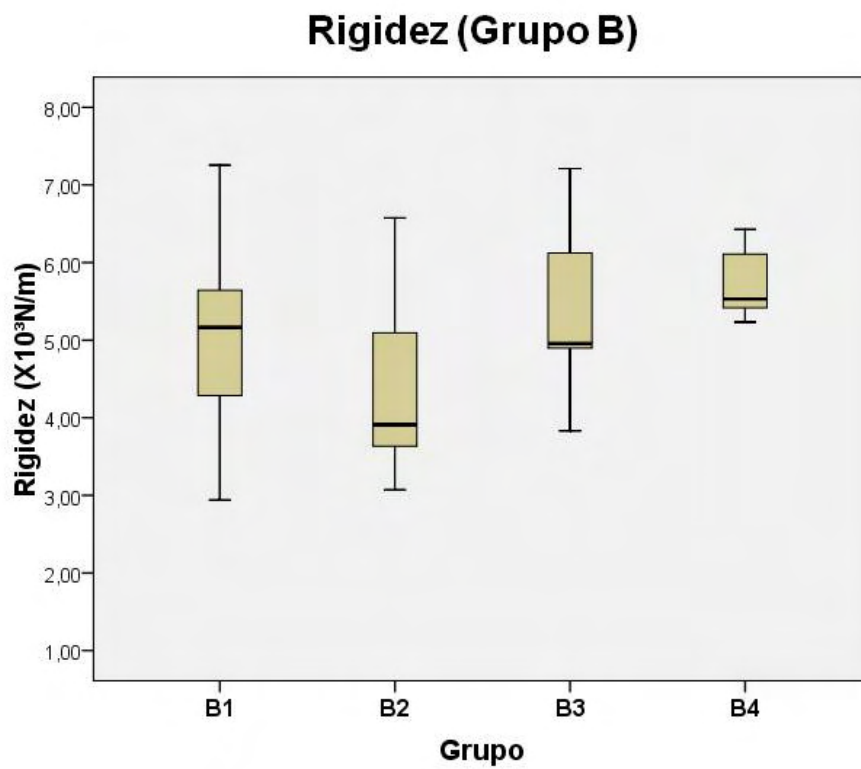


Figura 35: “Box-plot” dos valores de rigidez dos subgrupos idosos.

5.4. Medidas de menor diâmetro das fibras musculares

Os valores de menor diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio esquerdo foram obtidos por meio de análise histológica⁽²³⁾ e são apresentados como média seguida do respectivo desvio-padrão nas tabelas 7 e 8.

Tabela 6. Morfometria do gastrocnêmio esquerdo (Grupos adultos)

Grupos	Morfometria (μm)
A1	45,39 \pm 3,41 ^{b,c}
A2	38,43 \pm 4,20 ^a
A3	36,97 \pm 3,41 ^a
A4	42,01 \pm 4,21

^ap<0,05 (comparado com A1); ^bp<0,05 (comparado com A2); ^cp<0,05 (comparado com A3); ^dp<0,05 (comparado com A4). A1 = Adulto controle; A2 = Adulto imobilizado; A3 = Adulto remobilizado livre e A4 = Adulto remobilizado por meio de exercício físico.

De acordo com os resultados da análise de variância, verificou-se que houve diferença nos valores de menor diâmetro entre os subgrupos (1,2, 3 e 4) do grupo "A" (F = 6,825; p = 0,002) e do grupo "B" (F = 14,852; p = 0,000).

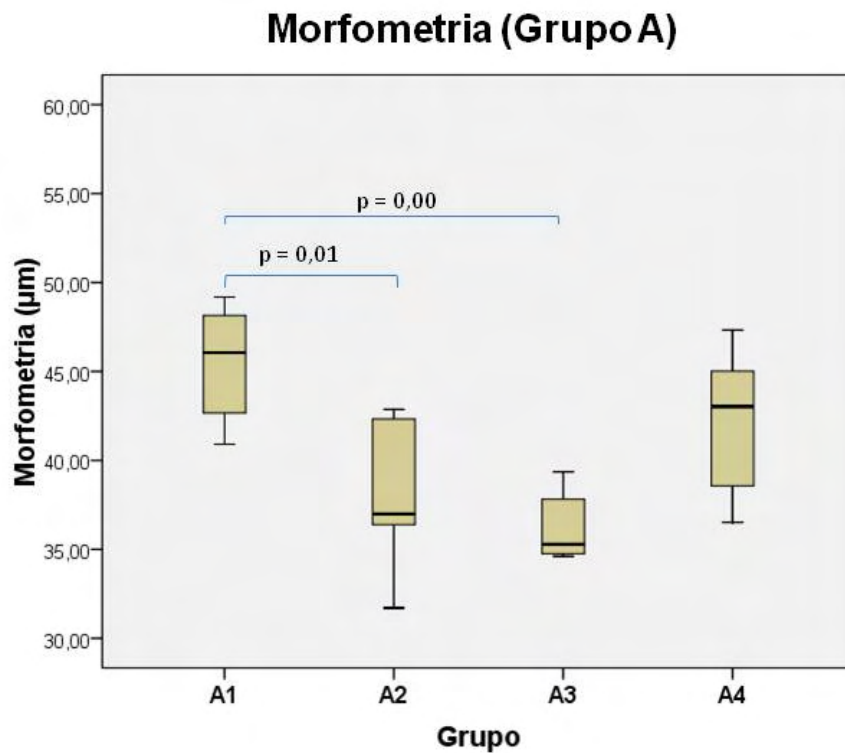


Figura 36: “Box-plot” das medidas de morfometria dos subgrupos adultos.

Tabela 7. Morfometria do gastrocnêmio esquerdo (Grupos idosos)

Grupos	Morfometria (µm)
B1	51,37 ± 3,86 ^{b,c,d}
B2	42,26 ± 4,39 ^a
B3	36,00 ± 4,15 ^a
B4	41,86 ± 4,95 ^a

^ap<0,05 (comparado com B1); ^bp<0,05 (comparado com B2); ^cp<0,05 (comparado com B3); ^dp<0,05 (comparado com B4). B1 = Idoso controle; B2 = Idoso imobilizado; B3 = Idoso remobilizado livre e B4 = Idoso remobilizado por meio de exercício físico.

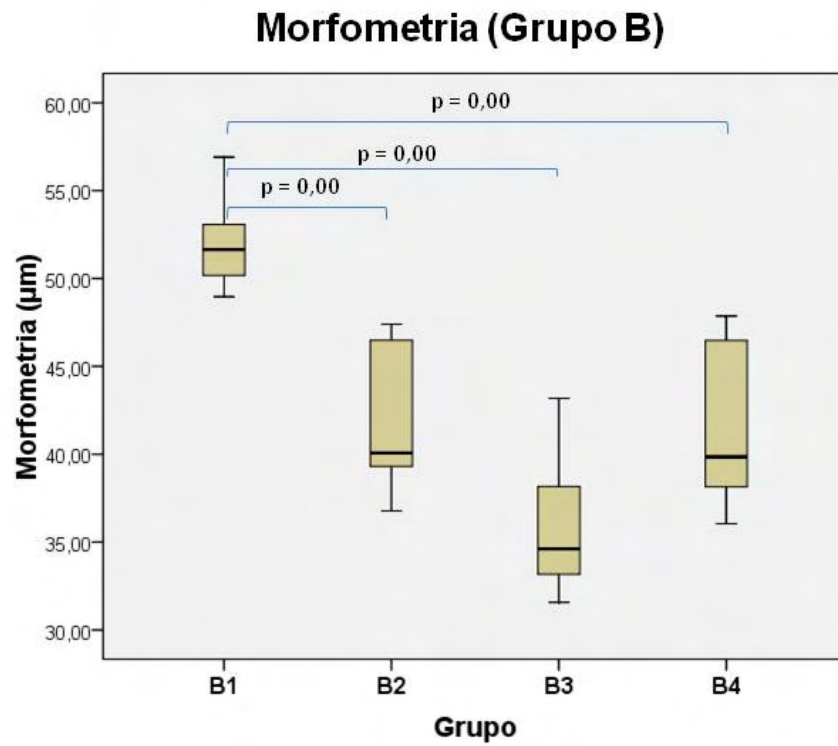


Figura 37: "Box-plot" das medidas de morfometria dos subgrupos idosos.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou verificar os efeitos da imobilização nas propriedades mecânicas do músculo de ratos de duas faixas etárias (cinco meses e 15 meses), assim como as respostas aos protocolos de remobilização livre e por meio de exercício físico.

A avaliação dessas propriedades mecânicas no músculo esquelético fornece conhecimento relevante para o entendimento dos mecanismos adaptativos frente a diferentes demandas funcionais^(43, 45, 46).

Para compreender a biomecânica muscular, vários modelos matemáticos têm sido desenvolvidos, desde que Hill⁽⁴⁷⁾ desenvolveu o primeiro. Porém a utilização destes modelos não permite a compreensão do comportamento biomecânico da musculatura associada a variáveis intervenientes. Sendo assim, a análise por meio do ensaio mecânico de tração se torna interessante, pois permite a avaliação da resposta adaptativa do músculo frente a diferentes estímulos, além de simular cargas impostas à estrutura musculoesquelética, que é constantemente acometida por atuação de forças externas, principalmente sob forma de tensão.

O músculo gastrocnêmio foi utilizado por sua localização que permite preservar as características fisiológicas quanto à origem e inserção musculares após dissecação, possibilitando sua fixação à máquina de tração para realização dos ensaios. Isto é importante, pois a análise do tecido biológico como estrutura inteira reflete melhor a solicitação mecânica fisiológica⁽⁴⁸⁾. Esse músculo trabalha sob condições de atividade física extrema e tem um risco aumentado para lesões e rupturas^(2, 17, 49).

6.1. Técnica de imobilização

Sabe-se que as fibras musculares possuem uma capacidade adaptativa, chamada de plasticidade muscular, para alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas, com resultado refletindo nas proteínas musculares⁽²¹⁾.

São vários os estímulos que atuam sobre o músculo esquelético promovendo alterações fisiológicas e moleculares, dentre os quais temos a imobilização e o exercício físico.

A imobilização geralmente é o método de escolha para o tratamento das lesões musculoesqueléticas, embora possa induzir alterações estruturais não desejáveis como a atrofia, o aumento de tecido conectivo e fibrose⁽²⁾.

As alterações induzidas pela imobilização não se limitam apenas ao músculo, sendo que são frequentes os relatos de transtornos de inervação e circulação, perda de massa óssea, alterações ligamentares, edema e rigidez articular^(1, 50).

Trabalhos prévios mostraram alterações após duas ou três semanas de imobilização^(51, 52), porém há estudos que mostram que algumas dessas adaptações já podem ser observadas em menos de sete dias^(3, 4).

Williams *et al.*⁽⁵⁾ afirmam que a partir de seis horas da imobilização, pode-se observar perda de proteínas, porém sem alteração da quantidade de mioglobina. E existem relatos que após 48 horas de imobilização o músculo desenvolve atrofia e que após sete dias ocorre redução em 37% de sua massa^(5, 6).

A intensidade em que as adaptações musculares ocorrem é diretamente influenciada pela posição em que o membro é imobilizado⁽¹⁷⁾. Herbert e Balnave⁽⁵³⁾ estudaram os efeitos de diferentes posições de imobilização desde a flexão plantar até a dorsiflexão completa e concluíram que a imobilização de um músculo em

alongamento retarda o processo de atrofia por desuso; no entanto, o músculo imobilizado em encurtamento, induz alterações de maneira mais intensa.

Uma vez que a imobilização provoca significativas alterações musculares, o interesse de estudar protocolos que possam minimizar ou reverter tais alterações torna-se importante. Outro ponto que merece análise é a escolha de animais com faixa etária distinta (adultos e idosos). Essa opção se baseou no fato que a idade tanto em humanos, como em animais influencia a força e a medida da secção transversa de um músculo.

Apesar de se conhecer relativamente bem o processo fisiológico muscular, o total de dias de imobilização, a dificuldade dos animais para deslocamento nas caixas de contenção e o tempo de remobilização foram ponderados na escolha do modelo. Diante do exposto a definição do protocolo de imobilização e de remobilização do membro pélvico, parece estar justificada.

6.2. Análise da massa corpórea

Na análise da massa corpórea dos animais observou-se que tanto no grupo adulto como no idoso, houve uma redução dessa, podendo inferir como fator desencadeante a imobilização gessada bilateral, demonstrando assim que o procedimento de imobilização, pode ser um fator predisponente de geração de estresse, pelo fato de restringir parcialmente os movimentos. É importante ressaltar que a imobilização bilateral dos membros pélvico não impediu o acesso dos ratos ao alimento, fato observado diariamente durante o manejo, sendo também evidente que essa imobilização desencadeou um maior esforço dos animais para deslocamento na caixa de contenção que possivelmente levou há um aumento do gasto energético diário.

Analisando os grupos de remobilização livre e por meio de exercício físico observou-se um aumento da massa corpórea, porém sem o alcance dos níveis de controle. Nos dados dos animais do grupo controle, observa-se aumento de massa durante o período experimental fortalecendo assim, o entendimento de que o processo de imobilização reprimiu essa tendência.

A redução da massa corpórea observada neste estudo difere dos resultados obtidos por Abdalla, Bertoncetto e Carvalho⁽¹⁾ que ao realizarem a imobilização por período de 14 dias, não encontraram diferença significativa ao comparar a massa corpórea no início e ao final do experimento. A técnica utilizada envolvia apenas um membro pélvico. Vale ressaltar, que os autores realizaram medidas de massa corpórea no início e no final do experimento de todos os animais, sem considerar os grupos. Deduz-se que o nível de estresse e esforço possam ter sido menores em relação ao nosso experimento.

Santos-Júnior *et al.*⁽³⁵⁾ relataram redução da massa corpórea de ratos jovens submetidos à imobilização de apenas um membro por um período de duas semanas quando comparados ao respectivo grupo controle, no dia do sacrifício.

No presente estudo, quando foram realizadas comparações entre as medidas de massa no dia da eutanásia do subgrupo A, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, pois devido ao sistema de aleatoriedade utilizado para a montagem dos subgrupos, as medidas de massa no início do experimento já apresentavam diferenças. Nesse sentido é importante os estudos experimentais realizados em animais de laboratório, que permitam o entendimento de forma clara dos diversos fatores intervenientes sobre a massa corpórea e musculatura esquelética. Desse modo, uma possível alternativa para analisar o efeito da

imobilização sobre a massa corpórea seria realizar medidas antes e após a imobilização considerando os grupos estudados.

6.3. Análise das propriedades biomecânicas

As propriedades mecânicas do músculo por serem obtidas sem a ação da ativação neural dependem apenas de sua composição estrutural, uma vez que não há variação do número de pontes cruzadas de actina e miosina que iriam interferir nos valores dessas propriedades⁽²²⁾.

No presente estudo, o local de ruptura dos músculos submetidos ao ensaio mecânico de tração foi no ventre muscular. Segundo Järvinen⁽¹⁵⁾, os pontos de ruptura do músculo gastrocnêmio, quando submetido a ensaio de tração, variam muito pouco, sendo que, em seu trabalho, 94% dos músculos, a ruptura ocorreu no ventre muscular. Os resultados encontrados por Lima *et al.*⁽³⁾ e Sene, Shimano e Picado⁽²⁾ corroboram esses achados, uma vez que apresentaram a mesma característica quanto ao local de ruptura muscular.

LIMA *et al.*⁽³⁾ sugerem que o fato da região ventral do músculo apresentar maior concentração de tecido muscular do que de tecido conjuntivo possa torná-la mais susceptível a ruptura.

O fato da impossibilidade de se mensurar adequadamente a área de secção transversa durante a realização dos ensaios fez com que optássemos por avaliar os dados utilizando a *carga* ao invés de *tensão*.

6.3.1. Alongamento no Limite Máximo (ALM)

A avaliação do alongamento no limite máximo (ALM) demonstra que o protocolo de imobilização não induziu alterações estatisticamente significantes no

grupo adulto. Pode-se observar apenas uma tendência à redução verificada por meio dos valores menores de média dos subgrupos que foram submetidos a esse processo quando comparados ao controle.

Carvalho, Shimano e Picado⁽⁵⁴⁾ observaram redução significativa dos valores de alongamento no limite máximo no músculo gastrocnêmio, após 14 dias de imobilização.

No grupo idoso, foram observadas diferenças entre o controle (B1) e os subgrupos remobilizado livre (B3) e remobilizado por meio de exercício físico (B4), demonstrando características semelhantes aos dados de perímetro e morfometria que apresentaram menores valores nos subgrupos B3 e B4. Embora essa tendência de comportamento reincida em algumas variáveis, não foi possível determinar quais fatores poderiam influenciá-la diretamente. No entanto, podemos sugerir que o fator idade possa interferir de maneira negativa na resposta de recuperação do organismo.

6.3.2. Carga no Limite Máximo (CLM)

Os resultados de carga no limite máximo (CLM) demonstraram diminuição significativa nos músculos submetidos à imobilização, tanto no grupo adulto como no idoso. A redução dos valores dessa propriedade indica que o músculo imobilizado suporta menos carga e, portanto torna-se mais susceptível a lesões.

Järvinen *et al.*⁽⁵⁵⁾ demonstrou alterações na organização e nas características estruturais das fibras de colágeno, como aumento do número de fibras orientadas perpendicularmente, fibras mais estreitas, numerosas e menos resistentes à tensão. De um modo geral, as alterações quantitativas e qualitativas no tecido conjuntivo

intramuscular, decorrentes da imobilização, podem contribuir para a redução das propriedades biomecânicas do músculo esquelético imobilizado.

Segundo Abdalla, Bertencello e Carvalho⁽¹⁾, o exercício induz o alinhamento funcional das fibras colágenas e Stone⁽⁵⁶⁾, afirma que o exercício físico pode aumentar a resistência do tecido conjuntivo e a massa muscular, tornando o músculo mais resistente.

No presente estudo, os resultados demonstraram que o protocolo de remobilização por meio exercício físico não foi suficiente para determinar o restabelecimento da carga no limite máximo ao nível do controle, porém podemos observar uma tendência ao aumento, tanto no grupo adulto como no idoso.

Em relação aos subgrupos submetidos à remobilização livre, estes apresentaram valores bastante próximos aos dos subgrupos imobilizados, sendo assim, este protocolo apenas manteve os valores dessa desta propriedade após a imobilização.

6.3.3. Rigidez

A rigidez dos músculos representa uma importante propriedade a ser estudada, pois a redução de seus valores indica que o músculo está se alongando mais na presença de uma carga menor, o que também o torna mais suscetível a lesões^(4, 55).

Considerando a deformação de proteínas estruturais da fibra muscular durante o ensaio mecânico, dentre as estruturas que respondem por esse comportamento de resistência à tração destacam-se a matrix extracelular e a titina⁽⁵⁷⁾, uma proteína estrutural do sarcômero que auxilia na resistência passiva

natural do músculo, sendo estas duas estruturas consideradas responsáveis pela resistência viscoelástica do complexo músculo-tendíneo⁽⁶⁾.

A imobilização reduz a extensibilidade de proteínas sarcoméricas (titina) e suas isoformas (α e β)², além de promover modificações na matrix extracelular⁽⁶⁾.

Entretanto, no presente estudo, o protocolo de imobilização provavelmente não foi suficiente para provocar alterações desta propriedade tanto no grupo adulto como no idoso.

Já Carvalho *et al.*⁽⁶⁾ encontraram redução da rigidez, carga e alongamento no limite máximo decorrentes da imobilização por 14 dias. Sendo que o processo de remobilização livre por período de 10 dias foi suficiente para restabelecer esses valores.

6.4. Medidas do músculo gastrocnêmio

6.4.1. Comprimento muscular

A técnica de imobilização utilizada no presente estudo posicionou os membros posteriores do rato (pelve, quadril e joelho) em extensão e o tornozelo em flexão plantar, o que manteve o músculo gastrocnêmio em posição de encurtamento por período de sete dias, porém não foram encontradas diferenças significantes com relação ao comprimento muscular, tanto no grupo adulto como no idoso.

Apesar do modelo utilizado ter produzido dados do comprimento muscular antagônico ao processo fisiológico da plasticidade muscular, acredita-se que esses valores possam ser justificados pelo fato de que a mensuração do comprimento muscular foi inicialmente realizada a fim de introduzi-la como variável de entrada no programa Tesc, utilizado para realização dos ensaios mecânicos de tração, sendo

esse procedimento realizado com o músculo acoplado à máquina e uma pré-carga tensional de 1 Newton, padronizada para todas as análises.

Lima *et al.*⁽³⁾ também utilizaram ratos adultos como modelo experimental de imobilização em posição de encurtamento por período de sete dias. Nessas condições não observaram diferenças significantes nos resultados das medidas em relação ao comprimento do músculo gastrocnêmio.

6.4.2 Perímetro muscular

Com relação ao perímetro muscular, observa-se no grupo A, diferenças entre o subgrupo controle (A1) e o subgrupo imobilizado (A2) e remobilizado livre (A3), indicando diminuição da secção transversa do músculo inteiro, dados justificados pelo processo de atrofia por desuso. O subgrupo remobilizado por meio de exercício físico (A4) não apresenta diferença significativa com o controle, desta forma, demonstrando que o exercício foi capaz de restabelecer essa perda, As análises histomorfométricas corroboram esta afirmação, uma vez que representam uma medida da secção transversa da fibra muscular, diretamente relacionada com o perímetro do músculo, onde apresentaram o mesmo comportamento descrito com relação às diferenças estatísticas relatadas com as medidas do perímetro.

No grupo B também foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, porém os menores valores de perímetro foram observados no subgrupo remobilizado livre (B3) e remobilizado por meio de exercício físico (B4). Não houve diferença entre o subgrupo controle (B1) e subgrupo imobilizado (B2). Já os dados da análise histomorfométrica demonstraram que a imobilização induziu uma redução da secção transversa da fibra muscular. Nos animais do grupo idoso,

o exercício físico não exerceu influência estatisticamente significativa quanto ao aumento dos valores de perímetro em relação grupo controle idoso.

Essas considerações respaldam com os achados de Rebelato⁽⁵⁸⁾ onde observaram que a maioria das perdas funcionais se acentua com a idade, devido à insuficiente atividade do sistema neuromuscular e ao desuso. Em geral trabalhos que analisam a força muscular em idosos tem demonstrado que a capacidade do músculo gerar tensão tem uma perda crescente paralela à elevação da idade⁽⁵⁹⁾.

6.4.3. Massa muscular

No presente estudo, os resultados de massa do músculo gastrocnêmio direito, demonstraram reduções significantes decorrentes da imobilização, tanto no grupo A como no B. Os protocolos de remobilização livre e por meio de exercício físico não restabeleceram os valores de massa muscular aos níveis de controle.

A atrofia muscular é caracterizada por uma diminuição da área de secção transversa da fibra muscular e da produção de força. Os decréscimos na taxa de síntese proteica e aumento na taxa de proteólise são responsáveis pela perda de massa muscular induzida pelo desuso, no entanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo não estão totalmente elucidados⁽⁶⁰⁾.

6.5. Análise morfométrica.

Os resultados do presente estudo demonstraram redução significativa das medidas de menor diâmetro das fibras musculares⁽²³⁾ decorrente da imobilização, tanto nos grupos adultos como nos idosos.

Durigan *et al.*⁽⁵¹⁾ também observaram redução significativa das fibras musculares devido à imobilização. Os autores realizaram medidas de área da

secção transversa do músculo sóleo de ratos após 15 dias de imobilização em posição neutra, justificando a ocorrência da alteração, pela existência da inter-relação da atividade contrátil com a homeostasia energética e a morfologia da fibra muscular, que neste processo conduziria a musculatura para um quadro de hipotrofia.

Em relação aos protocolos de remobilização, no grupo adulto, a remobilização por meio de exercício físico conseguiu restabelecer as medidas de secção da fibra muscular aos níveis do controle. Sendo que nos ratos idosos, nenhum dos protocolos obteve sucesso quanto a este objetivo.

6.6. Observações

A maior dificuldade encontrada foi referente à técnica de imobilização. Inicialmente a técnica envolvia malha tubular e algodão, porém era frequente o animal escapar do aparelho gessado, já que o mesmo possui grande capacidade de movimentação do corpo, o que facilita sua passagem por locais estreitos. E quando se aumentava a pressão durante o enfaixamento, posteriormente, a imobilização induzia um edema de pata do membro imobilizado, por redução da vascularização local.

Após algumas mudanças na metodologia de confecção, optamos por utilizar somente da malha tubular aplicada na região da articulação do tornozelo. Isso reduziu os índices de edema de pata e evitou a retirada completa do aparelho gessado pelo animal, porém não evitou laceração do gesso, sendo realizados, portanto, procedimentos de reparo quando necessário.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que o protocolo de imobilização induziu alterações na propriedade mecânica de carga no limite máximo, reduzindo a capacidade do músculo de suportar cargas, porém não foi suficiente para causar mudanças quanto ao alongamento e rigidez muscular tanto nos animais adultos como nos idosos. E os protocolos de remobilização livre e remobilização por meio de exercício físico não foram eficientes para restabelecer as propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio aos níveis de normalidade.

Com relação ao aspecto histomorfométrico, a imobilização induziu a atrofia muscular, sendo somente restabelecida no grupo adulto por meio do protocolo de remobilização com exercício físico.

Referências

8. REFERÊNCIAS

1. ABDALLA, D. R.; BERTONCELLO, D.; CARVALHO, L. C. Avaliação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas imobilizado e submetido à corrente russa. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v.16, n.1, p.59-64, 2009.
2. SENE, G. L., SHIMANO, A. C., PICADO, C. H. F. Recuperação mecânica muscular com laser. **Acta Ortop Bras**, 17(2):46-9, 2008.
3. LIMA, S.C.; CAIERÃO, Q. M.; DURIGAN, J. L. Q.; et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfológicas e mecânicas no músculo de rato. **Rev. bras. Fisioter**, São Carlos, v.11, n.4, p.297-302, 2007.
4. MATHEUS, J. P.; GOMIDE, L. B.; OLIVEIRA, J. G. P.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A.C. Efeito da estimulação elétrica neuromuscular durante a imobilização nas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, p. 55-59, 2007.
5. WILLIAMS, P. E.; CATANESE, T.; LUCEY, E. G., GOLDSPINK, G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. **J Anat.** 158:109-14, 1988.
6. CARVALHO, L. C.; POLIZELLO, J. C.; PADULA, N.; FREITAS, F. C.; SHIMANO, A. C.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. **Acta Ortop Bras**. [online]. 2009; 17(5):269-72.
7. FIGUEIREDO P. A., FERREIRA, R. M.; APPELL, H. J.; DUARTE, J. A. Age-Induced Morphological, Biochemical, and Functional Alterations in Isolated Mitochondria From Murine Skeletal Muscle. **Journal of Gerontology: biological sciences**, Vol. 63A, No. 4, 350–359, 2008.
8. KAYANI, A. C.; CLOSE, G. L.; JACKSON, M. J.; MCARDLE, A. Prolonged treadmill training increases HSP70 in skeletal muscle but does not affect age-related functional deficits. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 294: p.568–576, 2008.
9. SONG, W.; KWAK, H.; KIM J.; LAWLER, J. M. Exercise training modulates the nitric oxide synthase profile in skeletal muscle from old rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.64A, n.5, p. 540–549, 2009.
10. FORBES GB, REINA JC: Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. **Metabol** 19: 653-63; 1970.
11. JANSSEN I, HEYMSFIELD SB, WANG ZM, ROSS R: Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. **J Appl Physiol** 89: 81-8, 2000.

12. KIRKENDALL, D. T.; GARRETT Jr, W. E. The Effects of Aging and Training on Skeletal Muscle. **Am. J. Sports Med**, v.26, n.4, p.598-602, 1998.
13. DEGENS, H. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. **J. Musculoskelet Neuronal Interact.** 7 (3): 246-252, 2007.
14. LEXELL, J; DOWNHAM, D; SJOSTROM, M. Distribution of different fibre types in human skeletal muscles: Fibre type arrangement in m. vastus lateralis from three groups of healthy men between 15 and 83 years. **J Neurol Sci** 72: 211–222, 1986.
15. JÄRVINEN, M. Healing of a crush injury in rat striated muscle. **Acta Chir Scand**, v.142, p. 47-56, 1976.
16. JÄRVINEN, M. J. Immobilization effect on the tensile properties of striated muscle: an experimental study in the rat. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago. v.58, n.3, p.123-127, 1977.
17. JÄRVINEN, M. J.; EINOLA, S. A.; VIRTANEN, E. O. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 73, n. 3, p. 253-257, 1992.
18. JÄRVINEN, M. J. The effects of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries”, **Sports Med**, v.15, n .2, p. 78-89, 1993.
19. CARVALHO, C. M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. P. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.65-73, 2002.
20. MILANI, J. G. P. O.; MATHEUS, J. P. C.; GOMIDE, L. B.; VOLPON, J. P.; SHIMANO, A. C. Biomechanical Effects of Immobilization and Rehabilitation on the Skeletal Muscle of Trained and Sedentary Rats. **Annals of Biomedical Engineering**, v.36, n.10, p.1641–1648, 2008.
21. BOFF, S. R. A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo. **Acta Fisiatr.** 15(2): 111-116, 2008
22. ROCHA, M. N. D. Dissertação de mestrado em Bioengenharia. Bioengenharia Interunidades EESC/FMRP/IQSC –USP. **Propriedades mecânicas do músculo esquelético de ratas Wistar pós-imobilização e exercício físico em esteira.** 69f., 2006.
23. DUBOWITZ, V.; SEWRY, C. A. **Muscle Biopsy: a modern approach.** London: Saunders Elsevier, Philadelphia. Capítulo 3. 2007.
24. LIEBER, R. L; Skeletal muscle structure and function. – Implications for rehabilitation and sports medicine. WILLIAMS & WILKINS, 1992.

25. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
26. GUYTON, A. C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: capítulo 6, 2006.
27. SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiol Rev.**76(2):371-423, 1996.
28. GUO, W.; BHARMAL, S. J.; ESBONA, K., GREASER, M. L. Titin diversity: alternative splicing gone wild. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p.1-8, 2010.
29. KASPER, C. E.; XUN, L.; Expression of titin in skeletal muscle varies with hind-limb unloading. **Biological Research for Nursing** (2) 2 107-115, 2000.
30. FAWCETT, D. W.; RAVIOLA, E.; Bloom and fawcett, a textbook of histology-12th ed., Chapman & Hall, 1994.
31. SUWA, M.; NAKAMURA, T.; KATSUTA, S.; Muscle fiber number is a possible determinant of muscle fiber composition in rats. **Acta Physiol. Scand.** 167, 267-272, 1999.
32. FALEMPIN, M.; MOUNIER, Y.; **Muscle atrophy associated with microgravity in rat**: basic data for countermeasures. *Acta Astronautica*. 42, 489-502, 1998.
33. ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R.O.; Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171, 259-272, 1984.
34. APPELL, H. J. Muscular atrophy following immobilization. A review. **Sports Med.** 10:42–58, 1990.
35. SANTOS-JÚNIOR, F. F. U.; ALVES J. S. M.; MACHADO, A. A. N.; *et al.* Alterações Morfométricas em Músculo Respiratório de Ratos Submetidos à Imobilização de Pata. **Rev Bras Med Esporte**. v.16, n.3, 2010.
36. POTTLE, D.; GOSELIN, L. E.; Impact of mechanical load on functional recovery after muscle reloading. **Med. Sci. Sports Exerc.**, (32) 12, 2012-2017, 2000.
37. ISHIHARA, A.; ROY, R. R.; OHIRA, Y.; IBATA, Y.; EDGERTON, V. R.; Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increased loads. **J. Appl. Physiol.** 84 (6), 2183- 2189, 1998.
38. MUÑIZ J.; DEL RIO, J.; HUERTA, M.; MARIN, J. L.; Effects of sprint and endurance training on passive stress-strain relation of fast- and slow-twitch skeletal muscle in wistar rat. **Acta Physiol. Scand.** 173, 207 – 212, 2001.
39. CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução**. 5ed. LTC, São Paulo, 2002.

40. SOUZA, S. A.; Ensaios mecânicos de materiais metálicos. Ed. Edgard Blücher. 1974.
41. CUNHA, V.; CUNHA, R. R.; RUSSO, P.; MOREIRA, S. R.; SIMÕES, H. G. Treinamento de Natação na Intensidade do Limiar Anaeróbio Melhora a Aptidão Funcional de Ratos Idosos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 14, p. 538-543, 2008.
42. BOSI, P. L.; DELFINO, G. B.; DURIGAN J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; POLACOW, M. L. O.; SILVA, C. A. Metformina minimiza as alterações morfométricas no músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização articular. **Rev Bras Med Esporte**, v.14, n.5, 2008.
43. POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C.; FREITAS, F. C.; et al. Propriedades Mecanicas do Musculo Gastrocnemio de Ratas, Imobilizado e Posteriormente Submetido a Diferentes Protocolos de Alongamento. **Rev Bras Med Esporte**, v.15, n.3, 2009.
44. McMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining methods: histologic and histochemical medical division**. Harper e Brother, New York, p.283-310, 1960.
45. CAIOZZO, V. J. Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences. **Muscle Nerve**. 26:740-68.15. 2002
46. OLIVEIRA, F. B.; SHIMANO, A. C.; PICADO, C. H. F. Ultra-som terapêutico e imobilização na reparação do trauma muscular. **Acta Ortop Bras**. 17(3), 167-170, 2009.
47. HILL, A.V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proceedings of the Royal Society, London B* 126, 136–195, 1938.
48. MATHEUS, J. P. C.; MILANI, J. G. P. O.; GOMIDE, L. B.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Análise biomecânica dos efeitos da crioterapiano tratamento da lesão muscular aguda. **Rev Bras Med Esporte** – Vol. 14, No 4 – Jul/Ago, 2008.
49. MATHEUS, J. P. C.; OLIVEIRA, F. B.; GOMIDE, L. B.; MILANI, J. G. P. O.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C. Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculoesquelético após contusão. **Rev Bras Fisioter**, 12(3):241-7, 2008.
50. BOOTH, F. W. Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. **J Appl Physiol**, 43:656-61, 1977.
51. DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. K. N.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: análises metabólicas e morfométricas. **Rev. bras. fisioter.**, São Carlos, v.10, n.3, p. 297-302, 2006

52. MENON, T.; CASAROLLI, L. M.; CUNHA, N. B.; et al. Influência do alongamento passivo em três repetições de 30 segundos a cada 48 horas em músculo sóleo imobilizado de ratos. **Rev Bras Med Esporte**, v.13, n.6, 2007.
53. HERBERT, R. D.; BALNAVE, R. J. The effect of position of immobilization on resting length, resting stiffness, and weight of the soleus muscle of the rabbit. **J Orthop Res**. 11(3):358-66, 1993.
54. CARVALHO, L.C.; SHIMANO, A. C.; PICADO, C.H.F. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado. *Acta Ortop Bras*. 2008. 16(3):161-164.
55. JÄRVINEN TA, JÓZSA L, KANNUS P, JÄRVINEN TL, JÄRVINEN M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **J Muscle Res Cell Motil**. 23(3):245-54, 2002.
56. STONE MH. Implications for connective tissue and bonealterations resulting from resistance exercise training. **Med Sci Sports Exerc**. 20(5):162-8, 1988
57. GOTO, K.; OKUYAMA, R.; HONDA, M.; UCHIDA, H.; AKEMA, T.; OHIRA , Y.; YOSHIOKA, T. Profiles of connectin (titin) in atrophied soleusmuscle induced by unloading of rats. **J Appl Physiol** 94: 897–902, 2003.
58. REBELATTO, J. R.; CALVO, J. I; OREJUELA, J.R.; PORTILLO, J. C. Influência de um programa de atividade física de longa duração sobre a força muscular manual e a flexibilidade corporal de mulheres idosas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 10, n. Nº 1, p. 127-132, 2006.
59. CHARETTE, S. L.; McEVOY, L.; PIKA, A. G.; SHOW-HARTERC, G. D; WISWELLA, M.R. Muscle hypertrophy response resistance training in older women. **J. Appl Physiol**, 70, 1912-16, 1991.
60. MACHADO, J.; KRINSKI, K., ELSANGEDY, H. M.; CIESLAK, F.; LOPES, G.; GOMES, A. R. S. Vias de sinalização intracelular na atrofiamuscular e no treinamento resistido. **Fisioter Mov**. 22(3):383-393, 2009.

Anexo I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

Presidente Prudente, 12 de dezembro 2008.

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho

Ref. Projeto intitulado: "Efeitos do treinamento físico realizado em esteira rolante sobre os tecidos ósseos, muscular e cartilaginoso de ratos adultos e envelhecidos", a ser desenvolvido pelos pesquisadores, Oswaldo Heitor Nallin Júnior e Fábio Yoshikazu Kodama, sob orientação do Prof. Dr. **José Carlos Silva Camargo Filho**.

Processo no. 312/2008

Recebemos o seu projeto, o qual foi examinado pelo assessor, tendo recebido o parecer anexo.

Decorrente do exposto, este Comitê, em concordância com o parecerista, considera o projeto **APROVADO**.

Informamos, ainda, que ao final do desenvolvimento da pesquisa, deverá ser encaminhado ao CEP um **relatório final** sucinto (vide modelo na página da FCT), sendo que os TCLE assinados deverão permanecer em poder do orientador da pesquisa pelo período mínimo de 5 anos após o encerramento do estudo, para eventual fiscalização da CONEP.

Atenciosamente.



Prof. Dra. Edna Maria do Carmo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCT - Unesp - Presidente Prudente

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Comitê de Ética em Pesquisa
Rua Roberto Simonsen, 305 CEP 19060-900 Presidente Prudente SP
Tel 18 3729-5388/r 5466 e-mail conet@fct.unesp.br

Anexo II

PARECER DO CEP – FCT-UNESP

Processo nº 05/2010

Título do Projeto de Pesquisa: “Efeitos da remobilização por meio de exercício físico sobre os tecidos osseo, muscular e cartilaginoso de ratos adultos e idosos após imobilização”

Interessados : Prof. Dr. Jose Carlos Silva Camargo Filho

Fabio Yoshikazu Kodama (aluno do programa de pós-graduação)

Análise do relator (com resumo do projeto):

Justificativa e Objetivos : A imobilização resulta em redução da síntese de proteínas, da massa muscular, perda do número de sarcômeros, diminuição da capacidade de gerar força, de extensibilidade, velocidade de contração e da resistência muscular provocando modificações nos tecidos ósseo, muscular e cartilaginoso. Estas alterações associadas aos processos de senescência geram maior suscetibilidade a lesões. O envelhecimento provoca alterações progressivas de condrócitos das cartilagens articulares, redução do seu conteúdo de água e aumento das substâncias não colagenosas elevando o risco de fraturas. Desta forma o objetivo deste projeto será analisar os efeitos da remobilização por meio de exercício físico sobre o tecido muscular de ratos adultos e idosos após imobilização, comparando propriedades mecânicas obtidas em ensaio de tração axial, alterações das características histológicas e morfológicas.

Metodologia : O trabalho experimental utilizará 80 ratos wistar machos provenientes do Biotério Central de Botucatu e alojados no Biotério da FCT/UNESP, seguindo regularmente as normas de iluminação, temperatura, alimentação e acondicionamento em caixas. Os grupos de animais serão divididos em adultos (4 meses) e idosos (15 meses) e subdivididos em função das variáveis: controle, imobilizado, imobilizado e remobilizado livre e imobilizado e remobilizado por meio de exercício físico. Para os procedimentos de imobilização as técnicas estão devidamente descritas, não permitindo sofrimento aos animais. Os protocolos de exercícios são claramente descritos, indicando que os procedimentos já foram utilizados por outros pesquisadores, assegurando a proteção dos animais. Todas as avaliações e testes, assim como seus protocolos estão contidos no capítulo da metodologia, rigorosamente descritos e acompanhados das respectivas referências.

Parecer do relator: O trabalho possui relevância científica, com utilidade prática. O pesquisador orientador mostra conhecimento na área de estudo, os objetivos são claros e o cronograma de execução se apresenta de acordo com as exigências deste comitê. O protocolo para uso de animais encontra-se detalhadamente redigido informando sobre todos os procedimentos a ser aplicado. Estão presentes e devidamente assinados: a folha de rosto, termo de compromisso do orientador, declaração de ausência de ônus financeiro para a instituição, autorização para utilização do Laboratório de Histologia assinada pelo responsável e os dados dos pesquisadores. O projeto encontra-se dentro das normas éticas de pesquisa que envolve animais. Sendo assim, considero o projeto **APROVADO**.

Aprovado em 10/05/2010.

