



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**  
**ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA – ESEF**

**Características mecânicas e histológicas do músculo sóleo de  
ratos submetidos a treinamento de esteira em aclave e declive**

*Gláucia Andreza Kronbauer*

Porto Alegre, novembro de 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**  
**ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA – ESEF**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO HUMANO -**  
**PPGCMH**

**Características mecânicas e histológicas do músculo sóleo de  
ratos submetidos a treinamento de esteira em aclave e declive**

Dissertação apresentada pela aluna Gláucia Andreza Kronbauer, sob orientação do Prof. Dr. Jefferson Fagundes Loss e co-orientação da Prof. Dra. Matilde Achaval Elena como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, novembro de 2009.

Ao meu pai e à minha mãe;  
Aos meus avôs. Onde quer que estejam,  
certamente vibram comigo.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional, por sonharem comigo, por toda amor, partilha, amizade e confiança. A minha família pela torcida e em especial aos meus avôs por cultivarem o valor do estudo.

Pessoas indispensáveis

Meu Orientador Dr. Jefferson Loss por confiar em minha capacidade e instigar a vontade de chegar mais longe;

Minha Co-Orientadora Dra. Matilde Achaval por todo o auxílio e empenho em me ensinar técnicas que até então eu desconhecia;

Professoras Dra. Luciana Hirakata e Dra. Rosemary Shinkai, da PUC por abrirem as portas do laboratório de Materiais Dentários e doarem seu tempo;

Professor Dr. Paulo Ivo, por sua paciência e atenção quando nada mais funcionava;

Aos colegas e, mais do que tudo, amigos Jocemar, Daniela, Mônica, Camila, Maurício, Núbia, Thiago e Dani por sua paciência, por dedicar grande parte do seu tempo ao meu trabalho, por todas as horas de desespero, por aceitarem a minha teimosia como persistência e, junto comigo, não desistirem;

Aos amigos de longa data Martha, Fabi, Sheila, Diego, Tamáris, Guto, Taci, Ziza, Xande, Luana, Vivi, pela torcida e parceria sempre. Aos novos amigos Gabi, Geórgia, Beta, Lara, Mônica, Fabi, Débora, Josi, Nati, Cla, Gus, Rê; meus grandes irmãos, os três mosqueteiros Artur Anão, Maicon (o garoto enxaqueca) e Marcelo La Torre; a galera da Neuro Joce, Pati, Gi, Núbia, Lígia, Marcelo, Sica, Felipe, Márcio pelas festas, parcerias, horas de laboratório, trabalhos em grupo, estudos para as provas e todos os Xis Bacon...

Aos mestres:

Meus tios Clóvis e Gilberto pelo exemplo;

Profes Zelia, Hildegard e Ingrid que guiaram meus primeiros passos no caminho da pesquisa, sempre me incentivando, me aconselhando, e de braços abertos para me receber quando eu não acreditava mais;

Professores Dr. Marco Aurélio Vaz e Dr. Leonardo Tartaruga que despertaram em mim o interesse pelos conteúdos desse trabalho, se mostrando sempre disponíveis para me auxiliar;

Professor Dr. Flávio Castro, aquele que percebeu em mim, lá na graduação, um diferencial que nem eu mesma era capaz de enxergar, que me deu a mão e me conduziu até aqui, ombro amigo para todas as horas;

Ao Duda, meu amor, por todo o tempo de espera, por jamais desistir;

A família que eu escolhi tia Cleres e tia Béti, minhas mães de coração, e minhas manas Júlia, Môm, Poli e Pri pela presença, nem sempre, física, que enche meu coração de alegria.

## SUMÁRIO

### ÍNDICE DE FIGURAS

### ÍNDICE DE TABELAS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 O Problema e sua Importância .....	12
1.2 Objetivos .....	17
1.2.1 Objetivo geral .....	17
1.2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Músculo Esquelético: estrutura e função .....	18
2.2 Propriedades Temporais .....	21
2.3 Estruturas Passiva .....	24
2.3.1 Titina .....	26
2.4 Locomoção X Tipo de Contração .....	32
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
4.1 Delineamento Experimental .....	38
4.2 Programa de Treinamento .....	40
4.3 Procedimentos Cirúrgicos .....	42
4.4 Ensaio de Tração .....	44
4.5 Sarcômeros em Série .....	45
4.6 Expressão da Titina por Western Blot .....	46
4.7 Análise .....	48
4.7.1 Ensaio Mecânicos .....	48
4.7.2 Sarcômeros em Série .....	50
4.7.3 Titina .....	51
4.8 Tratamento Estatístico .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53

5.1 Características Gerais .....	53
5.2 Características Mecânicas .....	54
5.3 Sarcômeros .....	61
5.4 Titina .....	67
5.5 Adaptações estruturais e funcionais: considerações .....	69
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Relação força X comprimento e representação do sarcômero (GORDON, HUXLEY & JULIAN, 1966). **(p. 20)**

Figura 2 – Relação força ativa X comprimento e força passiva X comprimento do sarcômero. Adaptada: GORDON, HUXLEY & JULIAN, 1966. **(p. 24)**

Figura 3 – Relação tensão passiva X comprimento de sarcômero para fibras lentas e fibras rápidas. Fonte: MUTUNGI, TRINICK & RANATUNGA, 2003. **(p. 25)**

Figura 4 – Sarcômero do músculo estriado esquelético. Fonte: ALBERTS ET AL., 2002. **(p. 27)**

Figura 5 – Regiões da titina em relação as regiões do sarcômero. Fonte: LINKE ET AL., 1998. **(p. 28)**

Figura 6 – Relações tensão passiva X comprimento. A) filamentos de titina de músculo cardíaco (○) e músculo esquelético (●); b) fibras isoladas (0) e depois da extração da miosina (1), extração da actina (2), tratamento com solução alcalina por 10 min (3) e tratamento com solução alcalina por 30 min (4); c) fibras isoladas após extração de miosina e tratamento com pH 7,0 (○); pH 11,0 (●); pH 13,0 (Δ) e pH 14,0 (x); d) fibras isoladas tratadas ou não com tripsina controle (○); 2 min com tripsina (●); 5 min com tripsina (x). Fonte: Maruyama et al., 1977. **(p. 30)**

Figura 7 – Gasto energético caminhando na velocidade mais econômica (W) e correndo (R) em relação à inclinação. Fonte: MARGARIA, 1968. **(p. 34)**

Figura 8 – Propriedades do músculo esquelético de vertebrados a partir de equações empíricas. a) relação força x velocidade de contração do músculo; b) relação do custo metabólico pela velocidade de contração do músculo. Fonte: ALEXANDER, 1997. **(p. 35)**

Figura 9 – Caixa onde os ratos foram mantidos **(p. 39)**

Figura 10 – Esteira com compartimentos individuais ventilados; a) animais correndo em declive; b) animais correndo em aclave. **(p. 40)**

Figura 11 – Músculo sóleo fresco com a origem (a) e a inserção distal (b) logo após a retirada. **(p. 43)**

Figura 12 – a) Garra utilizada para fixar o material durante os ensaios de tração; b) músculo sóleo fixado às garras. **(p. 44)**

Figura 13 – Curva força passiva x comprimento de um ensaio de tração do músculo sóleo de ratos na máquina EMIC. **(p. 45)**

Figura 14 – Régua de calibração para cálculo do comprimento do campo. **(p. 46)**

Figura 15 – Exemplos de imagens de fibras musculares e o desenho do campo; a) fibra lateral do rato A5; b) fibra lateral do rato C9 e c) fibra medial do rato C9. **(p. 46)**

Figura 16 – Revelação com anticorpo das bandas de titina corridas em 6% de gel poliacrilamida-SDS. **(p. 47)**

Figura 17 – Revelação com anticorpo das bandas de titina corridas em 4-10% de gel gradiente poliacrilamida-SDS. **(p. 48)**

Figura 18 – Exemplo de curvas Tensão ( $\text{kN.m}^{-2}$ ) x Deformação Relativa para os animais 3 e 10 do grupo declive. a) curva original; b) curva recortada a partir do valor mínimo de  $10 \text{ kN.m}^{-2}$ . **(p. 50)**

Figura 19 – Curvas  $\sigma$  X  $\epsilon$  a partir do valor mínimo de tensão de  $10 \text{ kN.m}^{-2}$  para cada animal. a) controle; b) aclone; c) declive. **(p. 55)**

Figura 20 – Integral das curvas  $\sigma$  X  $\epsilon$  normalizadas para cada animal. a) controle; b) aclone; c) declive. **(p. 57)**

Figura 21 – Curvas  $\sigma$  X  $\epsilon$  médias para cada grupo com desvios padrão dos valores de tensão passiva. **(p. 60)**

Figura 22 – Média e desvio padrão do comprimento de sarcômero por grupo. \*  $p < 0,01$  **(p. 63)**

Figura 23 – Média e desvio padrão da densidade de sarcômeros por mm de fibra por grupo. \*  $p < 0,01$  **(p. 64)**

Figura 24 – Média e desvio padrão do número de sarcômeros em série por grupo. \*  $p = 0,033$ . **(p. 66)**

Figura 25 – Imagem corada com Red Ponceau e fotografada para a quantificação das bandas de titina e miosina. Ratos A9, C5 e D10. **(p. 68)**

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de média e desvio padrão da massa corporal por grupo nos períodos pré e pós-treinamento **(p. 39)**

Tabela 2 – Média das velocidades (m/min) por grupo de treinamento **(p. 41)**

Tabela 3 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para a massa do sóleo, a relação massa do sóleo/ massa corporal total e o comprimento muscular. **(p. 53)**

Tabela 4 – Coeficientes de Correlação Intraclasse (ICC) e Coeficientes Alpha de Cronbach para as variáveis mecânicas por grupo. **(p. 58)**

Tabela 5 – Média e desvio padrão (DP) de tensão passiva, deformação relativa, integral da curva  $\sigma \times \epsilon$  e rigidez para cada grupo. **(p. 59)**

Tabela 6 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) do comprimento de sarcômero e da densidade para cada animal. **(p. 61)**

Tabela 7 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para comprimento de sarcômero, densidade e número de sarcômeros em série por grupo. **(p. 62)**

Tabela 8 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos dados brutos e normalizados da expressão da titina e da razão titina/miosina por grupo. **(p. 68)**

## RESUMO

A literatura refere que os estímulos produzidos pelos diferentes tipos de contração no sistema músculo-esquelético geram adaptações específicas. A locomoção em aclave e declive vem sendo utilizada como modelo de treinamento concêntrico e excêntrico para estudos dessas adaptações em animais. Sendo assim este estudo teve o objetivo de avaliar características mecânicas e histológicas do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento em aclave ou declive. Foram avaliados 36 ratos Wistar machos (90 dias de idade no início do treinamento) divididos igualmente em três grupos: aclave (A), declive (D) e controle (C). Os treinamentos foram realizados em uma esteira adaptada com raias individuais e inclinação de + 16° (aclave) ou - 16° (declive). Os animais passaram por um período de adaptação de uma semana na esteira com a inclinação específica e, em seguida, foram avaliados quanto à velocidade máxima suportada. Os treinamentos aconteceram com velocidade (relativa à máxima avaliada) e tempo progressivos ao longo de oito semanas (29 sessões). Dois dias após o último treino os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico ( $\pm 5$  ml), os músculos sóleos direitos e esquerdos foram removidos e os animais decapitados. Os músculos sóleos da pata direita ( $n = 7C, 8A, 9D$ ) foram submetidos a ensaios de tração em uma máquina EMIC DL2000, com célula de carga de 50 N a velocidade de  $1,66 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Durante o ensaio, as amostras foram borrifadas com solução salina a cada um minuto. Os músculos sóleos esquerdos foram retirados para contagem de sarcômeros ( $n = 4A, 4C$  e  $5D$ ) e análise na proteína titina por Western Blot ( $n = 4$  por grupo). Foi verificada a normalidade e homogeneidade dos dados e a confiabilidade das medidas foi avaliada pelo coeficiente Alpha de Cronbach. Comportamentos individuais foram analisados pelo Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC); ANOVA *one way* e *post hoc* de Bonferroni e teste não paramétrico Kruskal-Wallis foram aplicados para identificação das diferenças entre os grupos. Dos 36 animais, três morreram antes do final do experimento. Os coeficientes Alpha de Cronbach indicaram confiabilidade das medidas com valores próximos a um para todas as variáveis. Os dados mecânicos dos animais que treinaram em declive apresentaram menores valores de ICC, mesmo assim significativos. As comparações entre os grupos indicaram aumento significativo da rigidez da curva tensão X deformação para os animais treinados em aclave e declive, e maior deformação da curva para os animais controle. Foi encontrado aumento da média da tensão passiva dos músculos dos animais treinados ( $57 \pm 5$  e  $56 \pm 11$  para A e D;  $51,6 \pm 7,7$  para C), contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa, possivelmente devido a grande variabilidade dos dados mecânicos. Em relação ao número de sarcômeros em série os animais que treinaram em declive apresentaram menores comprimentos de sarcômero ( $2,806 \pm 0,059 \mu\text{m}$ ) e maior número de sarcômeros em série ( $8170 \pm 510$ ) quando comparados aos grupos controle ( $3,06 \pm 0,054 \mu\text{m}$  e  $7510 \pm 240$ ) e aclave ( $2,990 \pm 0,023 \mu\text{m}$  e  $7390 \pm 270$ ). As demais variáveis analisadas não apresentaram diferenças entre os grupos. É possível concluir com este estudo que adaptações estruturais nem sempre acontecem em paralelo às adaptações funcionais, que o treinamento em declive parece produzir resultados com maiores variações e que os diferentes estímulos provocam diferentes adaptações no músculo sóleo de ratos.

**Palavras-chave:** Propriedades Mecânicas, Sarcômeros, Titina, Treinamento em Inclinação

## ABSTRACT

The literature states that the stimulus produced by different types of contraction in skeletal muscle generates specific adaptations. Downhill and uphill locomotion have been used as a model of concentric and eccentric training in studies that verify the different adaptations in animals. Therefore this study intended to evaluate mechanical and histological properties of rats' soleus muscle submitted to uphill or downhill running. We evaluated 36 male Wistar rats (90 days old at the start of training). They were divided equally into three groups: uphill (A), downhill (D) and control (C). Training was performed on a treadmill adapted to individual lanes and +16° (uphill) or -16° (downhill) incline. The animals went through a one week adjustment period on the treadmill with the specific inclines, and then there were evaluated the maximal speeds they reached. The training took place with progressive speed (relative to the maximum tested) and time over 8 weeks (29 sessions). Two days after the last training the animals were anesthetized with sodium thiopental ( $\pm 5$  ml), the right and left soleus muscles were removed and the animals were decapitated. The right soleus muscles (n = 7C, 8A, 9D) were subjected to tensile tests on one machine EMIC DL2000, with a load cell of 50 N, speed of  $1,66 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . During the test, the samples were sprayed with saline solution every one minute. The left soleus muscles were removed for counting of sarcomeres (n = 4A, 4C, 5D) and the titin Western blot analysis (n = 4 per group). Data normality and homogeneity were verified and reliability of the measures was assessed by Cronbach's Alpha coefficient. Individual behaviors were analyzed by Intraclass Correlation Coefficient (ICC); one-way ANOVA and post hoc Bonferroni test and nonparametric Kruskal-Wallis were applied to identify the differences between the groups. Three out of the 36 animals died before the end of the experiment. The Cronbach's Alpha coefficients indicated reliability of the measures with values close to one for all the analyzed variables. The mechanical data of downhill trained animals had significantly lower ICC, even though significant. Comparisons between groups showed increased rigidity of the muscles of trained animals and greater deformation of the muscles of control animals. It has been found greater passive tension mean for both training groups ( $57 \pm 5$  and  $56 \pm 11$  for A and D;  $51.6 \pm 7.7$  for C), but it was not statistically significant probably due to the high mechanical data variability. Regarding the number of sarcomeres in series the downhill trained animals showed smaller sarcomere lengths ( $2.806 \pm 0.059 \mu\text{m}$ ) and greater serial sarcomere number ( $8170 \pm 510$ ) when compared to control ( $3.06 \pm 0.054 \mu\text{m}$  and  $7510 \pm 240$ ) and uphill ( $2.990 \pm 0.023 \mu\text{m}$  e  $7390 \pm 270$ ) groups. The remaining variables did not differ between groups. It can be concluded from this study that structural adaptations do not happen in parallel with functional adaptations, downhill running appear to produce more variable results and that different stimuli generate different adaptations in rats' soleus muscle.

**Keywords:** Mechanical Properties, Sarcomeres, Titin, Incline Running

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 O Problema e sua Importância**

O movimento é responsável por todas as nossas interações com o ambiente (BROMAN ET AL., 1985, DE LUCA & ERIM, 1994), portanto é de fundamental importância entender os mecanismos de controle de movimento e sua influência nas respostas mecânicas aos mesmos. O movimento é o produto do altamente organizado sistema neuromuscular, o qual possui um mecanismo de controle complexo que envolve diferentes respostas a diferentes estímulos para cada estrutura do sistema. As características mecânicas são específicas para cada uma destas estruturas, bem como para cada movimento que for executado (HERBERT ET AL., 2002).

A fibra muscular possui uma capacidade única entre os tecidos biológicos: responde a estímulos elétricos, se contrai e gera força. Diversas proposições foram formuladas para esclarecer esses mecanismos no músculo esquelético (Fenn, 1923; Hill, 1938; Huxley, 1957; Iwazumi, 1970; Ter Keurs, Iwazumi & Pollack, 1978), mas a teoria mais aceita hoje foi escrita inicialmente por dois pesquisadores Andrew Huxley e Hugh Huxley (HUXLEY & HANSON, 1954; HUXLEY & NIEDERGERKE, 1954; 1958). Com base nos conhecimentos da época e observando as alterações estruturais no sarcômero durante a contração eles descreveram a contração

muscular por meio do mecanismo de filamentos deslizantes. Seus estudos foram publicados na revista *Nature* no início dos anos 50, e posteriormente aprofundados formulando a teoria das “pontes cruzadas” (HUXLEY, 1957).

Na teoria das “pontes cruzadas” uma característica funcional importante é a dependência do comprimento da fibra muscular para a geração de força. Já descrita em 1894 por Blix, essa propriedade foi incorporada à teoria e publicada em 1966 por Gordon, Huxley e Julian. Neste trabalho os autores produziram contrações isométricas em diferentes comprimentos de sarcômero e encontraram uma fase ascendente, na qual a força e o comprimento de sarcômero aumentam, uma fase de platô e uma fase descendente, com aumentos extremos de comprimento e redução da força (GORDON, HUXLEY & JULIAN, 1966). A explicação mais plausível para esse fenômeno seria a quantidade de filamentos de actina e miosina sobrepostos, conforme havia proposto Huxley (1957).

Alguns estudos mostram que no músculo ou em fascículos essa relação é um pouco diferente, com um comportamento ascendente-descendente não linear, mas curvilíneo (HERZOG & TER KEURS, 1988). Investigações como as de Maganaris (2001) e Kulig, Andrews e Hay (1984) e modelos como o de Woittiez e colaboradores (1984) e do próprio Gordon (1966) consideram a força muscular total composta por força ativa dos elementos contráteis, sendo a soma da força produzida por cada sítio de ligação actina/miosina; e força passiva dos elementos não-contráteis relacionados a fibras de colágeno presentes no tecido conjuntivo denso modelado que envolve as fibras musculares.

Entretanto Natori, ainda em 1954, demonstrou claramente a presença de um comportamento elástico em fibras com a membrana celular removida, resultados apresentados também por Kawai e Brandt (1973), indicando a existência de uma membrana ou estrutura elástica interna da fibra muscular. Então, em 1977, o grupo de pesquisadores japoneses do qual Natori fazia parte publicou a primeira grande seqüência de estudos a respeito da estrutura e função da grande proteína elástica do músculo, a titina (conectina  $\beta$ ) (MARUYAMA, MATSUBARA & NATORI, 1977; MARUYAMA, MURAKAMI & OHASHI, 1977; MARUYAMA, KIMURA & KURODA, 1977).

Estranhamente no ocidente apenas pesquisas mais recentes supõem que, além da função estrutural, a titina poderia estar relacionada a propriedades elásticas do sarcômero (LINKE ET AL., 1998; TSKHOVREBOVA & TRINICK, 2004; PINNIGER, RANATUNGA & OFFER, 2006). Herzog e Leonard (2000) descrevem a titina como uma mola capaz de armazenar energia elástica durante alongamento. Acredita-se também que suas características de comprimento e rigidez se modificam quando, por exemplo, o seu ambiente bioquímico altera – aumento de  $[Ca^{2+}]$  durante a ativação muscular; diminuição da possibilidade de quebra de ligações moleculares terciárias, que mantém a proteína em sua forma espiralada, ou seja, sua forma conformacional de equilíbrio.

Diversos estudos indicam que esses elementos não-contráteis, tanto fora quanto dentro da fibra muscular, são os principais responsáveis pelas chamadas “propriedades temporais” do músculo, especificamente pelo aumento de força após alongamento ativo – evidências de que a força isométrica restabelecida após alongamento é superior à força isométrica máxima (ABBOT & AUBERT, 1952; EDMAN, ELZINGA & NOBLE., 1978; 1982; HERZOG & LEONARD, 2000; RASSIER ET AL., 2003a e b; PINNIGER, RANATUNGA & OFFER., 2006).

Dadas às características estruturais e funcionais dos componentes contráteis e não-contráteis do músculo, existe ainda a capacidade de adaptação das mesmas, ou seja, estas estruturas e, conseqüentemente seu comportamento, podem mudar de acordo com as demandas funcionais. Modificações como adição de sarcômeros em série, aumento da quantidade de proteína intramuscular e no tecido conjuntivo, aumento de mitocôndrias e hipertrofia são respostas estruturais a sobrecargas para melhorar o desempenho de uma tarefa (WATERMAN-STORER, 1991; ADAMS ET AL, 2004; TOIGO & BOUTELLIER, 2006).

Características da tarefa como intensidade, freqüência, velocidade, amplitude de movimento e tipo de contração predominante são alguns exemplos de diferentes demandas que geram conseqüentemente, diferentes adaptações. Estudos indicam alterações estruturais como mudanças na área de secção transversa das fibras (sarcômeros em paralelo), no comprimento muscular (sarcômeros em série) e nas quantidades de proteínas contráteis e não contráteis (TOIGO & BOUTELLIER, 2006). Como efeitos funcionais podemos citar aumento na produção de força ativa e passiva, mudanças na relação força x velocidade (Caiozzo, Perrine & Edgerton,

1981) e na relação força x comprimento (HERZOG ET AL., 1991).

Assim também o tipo de contração influencia de maneira diferente as adaptações musculares. As contrações excêntricas, por exemplo, causam maior estresse mecânico ao músculo e, conseqüentemente, maior quantidade de microlesões. Parece haver então a instalação de um processo inflamatório no músculo relacionado à maior sinalização das células satélites para a recuperação do tecido, ou seja, maior adaptação (JASPERS ET AL., 2004). Outro fenômeno descrito é o aumento do número de sarcômeros em série em resposta ao treinamento excêntrico (LYNN & MORGAN, 1994; BUTTERFIELD, LEONARD & HERZOG, 2005).

Para análises das estruturas do músculo em resposta a diferentes demandas, o uso de animais tem permitido a identificação das adaptações internas com avaliações diretas de quantidade de proteína, estrutura microscópica da fibra muscular e dos sarcômeros e características mecânicas como a curva tensão passiva x deformação, curva força x comprimento e curvas força x velocidade para músculos isolados, fibras musculares, sarcômeros e até mesmo filamentos isolados de actina, miosina e titina.

Como modelo de diferentes demandas, a locomoção de animais em auge ou declive é aceita e amplamente utilizada para treinamento concêntrico ou excêntrico, respectivamente (LYNN & MORGAN, 1994; GORDON ET AL., 1996; LYNN, TALBOT & MORGAN, 1998; BUTTERFIELD & HERZOG, 2005; SOTIRIADOU ET AL., 2006; CHEN ET AL., 2007). Quando andamos no plano o corpo está sujeito a trocas de energia potencial e cinética e estas trocas acontecem de forma bastante equilibrada, sendo a soma das duas um valor muito próximo de zero (MARGARIA, 1968; CAVAGNA, 1977). Mais especificamente, produzimos trabalho positivo e logo em seguida a mesma quantidade de trabalho negativo, e os dois se equilibram durante o passo (MARGARIA, 1968). Ao descrever as variações de energia como compostas por trabalhos positivos e negativos, Cavagna e colaboradores (1963; 1968) relacionam o trabalho positivo com a contração concêntrica – dependente unicamente de energia metabólica – e o trabalho negativo com a contração excêntrica – colaboração das estruturas elásticas.

Quando andamos em inclinações as relações entre trabalho positivo e trabalho negativo se alteram: o primeiro é maior em auge e o segundo é maior em

declive. Ademais, ao caminhar em declive o trabalho negativo se soma à força da gravidade. Em aclive a força necessária para deslocar o centro de massa e a aceleração da gravidade tem vetores em direções opostas que se subtraem, conseqüentemente a força necessária deve ser maior; já em declive a força necessária para mover o centro de massa e a aceleração da gravidade têm vetores na mesma direção e se somam, diminuindo a força necessária. Assim, a impulsão dependente da força muscular não é mais a única força a atuar para mover o corpo para frente. A força muscular necessária diminui em até 60% (MARGARIA, 1968). A aceleração da gravidade, entretanto, exige que o corpo desenvolva mecanismos de desaceleração, gerando conservação de energia elástica nas estruturas passivas, a qual é transmitida na impulsão. Assim, há trabalho negativo aumentado pela desaceleração e trabalho positivo diminuído pela transmissão de energia elástica.

Ensaio mecânico de músculos em atividade ou não, que forneçam informações força X comprimento ou tensão X deformação, podem apresentar dados inerentes a contração muscular como força ativa, força passiva, rigidez muscular, rigidez das estruturas elásticas em situações de locomoção em plano inclinado, bem como as adaptações do tecido muscular às mesmas (EDMAN ET AL., 1978; 1982; HERZOG & LEONARD, 2002; PLANT, BEITZEL & LYNCH, 2005; MACINTOSH & MACNAUGHTON, 2005). Gosselin e colaboradores (1998), por exemplo, avaliaram rigidez muscular passiva em ratos após treinamento em esteira com +15% de inclinação, encontrando aumento em animais treinados.

Em fibras isoladas Tournel e colaboradores (2002) encontraram diminuição dos valores de tensão da curva tensão X deformação de fibras pela imobilização dos membros inferiores, especialmente em fibras de contração rápida. Da mesma forma Muniz e colaboradores (2001) citam diferenças na magnitude de adaptação da tensão passiva ao treinamento para músculo com predominância de fibras lentas (sóleo) e com predominância de fibras rápidas (plantaris) em ratos.

Até mesmo curvas de tensão X deformação ou força X comprimento de filamentos isolados de titina podem ser encontradas na literatura (MARUYAMA ET AL., 1977; NEAGOE ET AL., 2003; LEAKE ET AL., 2004). Contudo, pouco se sabe sobre suas adaptações, bem como adaptações estruturais e funcionais do componente passivo ao treinamento, especialmente às diferentes demandas impostas pela locomoção em aclive ou em declive.

Considerando então as características estruturais e funcionais do músculo esquelético, sua capacidade de adaptação e as diferentes demandas da locomoção em aclone e declive, o problema gerador desta pesquisa foi formulado da seguinte forma:

Quais as modificações histológicas e mecânicas do músculo sóleo de ratos em resposta ao treinamento em aclone versus declive em esteira?

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Analisar as modificações histológicas e mecânicas do músculo sóleo de ratos em resposta ao treinamento em aclone e declive em esteira.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Descrever o comportamento da curva “tensão passiva x deformação relativa” do músculo sóleo de ratos após treinamentos em aclone e declive: tensão passiva, deformação, rigidez e trabalho;
- Verificar a quantidade de titina intramuscular após treinamentos em aclone e declive;
- Investigar a estrutura do sarcômero e da fibra muscular de ratos após treinamentos em aclone e declive: comprimento, número de sarcômeros em série e densidade de sarcômeros;

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Músculo Esquelético: estrutura e função**

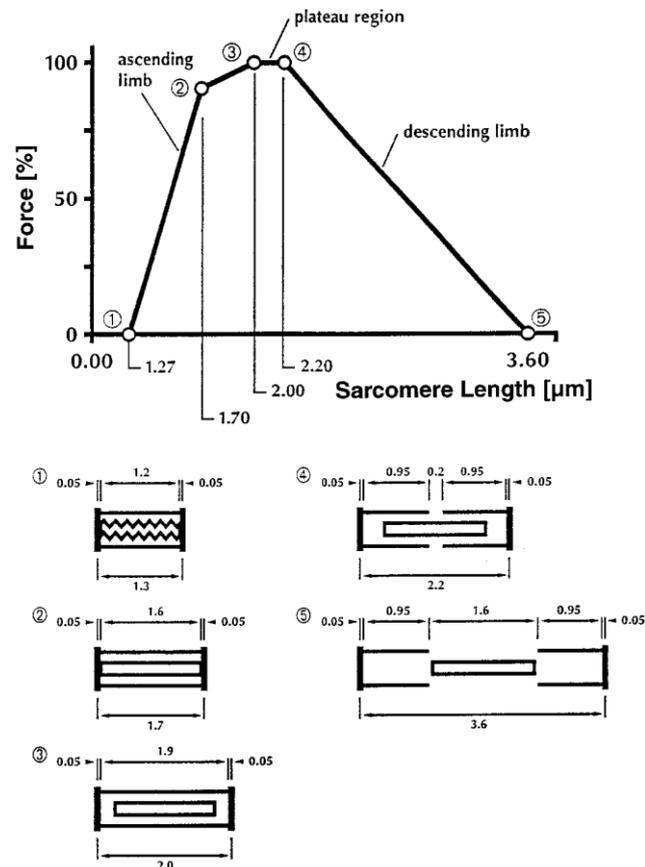
O movimento humano, como expressão das relações com o ambiente, é produto de um organizado sistema. Suas características vêm intrigando pensadores e cientistas desde os tempos antigos. Começando por Aristóteles, com suas idéias de movimento e conceitos iniciais da mecânica, e Galeno com a primeira grande obra sobre os músculos, passando por Da Vinci e Vesalius com suas representações da anatomia humana (Rash, 1991) e chegando aos conceitos estabelecidos hoje, ainda restam dúvidas sobre os mistérios da contração muscular, da produção de força e do movimento.

Sabe-se que o músculo esquelético é composto por fascículos de fibras musculares e que dentro destas fibras musculares existem organizações estruturais em série e em paralelo, denominadas sarcômeros. Talvez uma das primeiras descrições dos sarcômeros tenha sido de Huxley e Hanson. Segundo os autores os sarcômeros são separados longitudinalmente por linhas Z e na posição medial, denominada linha M, encontra-se uma região mais densa, a zona H. Das linhas Z partem filamentos finos de uma proteína isotrópica denominada actina, da linha M partem filamentos grossos de uma proteína anisotrópica denominada miosina (HUXLEY & HANSON, 1953).

A partir do conhecimento da estrutura do sarcômero e observando seu comportamento durante a contração surgiu a teoria mais aceita hoje como explicação para o mecanismo da contração muscular. Simultaneamente os pesquisadores Huxley e Niedergerke, na Universidade de Cambridge e Huxley e Hanson, do Instituto de Tecnologia de Massachusetts observaram a diminuição da região de actina, denominada banda I, e o aumento da densidade da região de miosina, denominada banda A, durante a contração muscular (HUXLEY & HANSON, 1954; HUXLEY & NIEDERGERKE, 1954). Assim surgiu a hipótese de que a contração muscular se daria por um mecanismo de filamentos deslizantes, ou pontes cruzadas.

Por fim, em 1957, Huxley propõe que os miofilamentos de actina deslizam sobre os miofilamentos de miosina devido a pontes cruzadas estabelecidas entre a cabeça da miosina e os sítios de ligação da actina. Há então ciclos de acoplamento/desacoplamento encurtando os diversos sarcômeros que compõe a fibra muscular e produzindo força por meio da contração, descrevendo a “Teoria das Pontes Cruzadas” (HUXLEY, 1957).

A partir da teoria, então, conforme o sarcômero fosse encurtado e aumentassem as pontes cruzadas estabelecidas, haveria aumento da força de contração. Sendo assim foi determinada a dependência do comprimento do sarcômero na produção de força. Descrita por Gordon, Huxley e Julian em 1966, a relação força X comprimento descreve um comportamento ascendente com a diminuição do comprimento do sarcômero, uma região de platô, onde a força máxima é atingida, e uma região descendente com encurtamentos extremos. A Figura 1 apresenta o esquema original de Gordon, Huxley e Julian (1966), com a relação força X comprimento e abaixo a representação do sarcômero nos respectivos comprimentos.



**Figura 1 – Relação força X comprimento e representação do sarcômero. Fonte: GORDON, HUXLEY & JULIAN, 1966.**

Depois de estabelecida a teoria, entretanto, surgiram várias críticas e novas hipóteses para o fenômeno, destacando trabalhos de Tatsuo Iwazumi e Gerard Pollack (TER KEURS, IWAZUMI & POLLACK, 1978; IWAZUMI, 1979; POLLACK, 1990). Mesmo pesquisadores adeptos à teoria passam a encontrar evidência de que a mesma não é completa. O próprio Huxley, recentemente, publicou um estudo com complementos e lacunas da teoria citando, por exemplo, modificações no comportamento das pontes cruzadas ao longo da contração (HUXLEY, 2000).

Um dos primeiros complementos é a consideração da força passiva dos tecidos conjuntivos externos à fibra muscular quando considerada a relação força X comprimento em músculos. O modelo proposto por Woittiez e colaboradores (1984), por exemplo, passa a incluir a força das estruturas passivas na relação força X comprimento. Da mesma forma Herzog e colaboradores (1992) avaliam as propriedades da relação força X comprimento em músculos de gatos e separam a força total em força passiva e força ativa.

Os componentes de produção de força passam a ser divididos em: a) componentes ativos, relacionados principalmente com a parcela de sobreposição de miosina e actina (HUXLEY, 1957; GORDON ET AL., 1966; MACINTOSH & MACNAUGHTON, 2005; RASSIER ET AL., 1999;); e b) estruturas passivas como a membrana celular, tecido conjuntivo intersticial e componentes do citoesqueleto (GORDON ET AL., 1966; ALEXANDER, 2002; HERZOG & LEONARD, 2002; MACINTOSH & MACNAUGHTON, 2005; PINNIGER ET AL., 2006).

Contudo, o comportamento que a teoria não explica e que intriga os pesquisadores até hoje é anterior à própria teoria. Abbott e Aubert da Universidade College, Londres, em 1951 observaram modificações na capacidade de produção de força em músculos isolados durante e depois de modificarem seu comprimento (ABBOTT & AUBERT, 1952). Mais tarde, em 1978 e 1982 Edman, Elzinga e Noble publicaram dois estudos sobre o mesmo fenômeno e o termo “History length-dependence” – Propriedades Temporais – passou a ser utilizado. Contudo, essas observações levam a questionamentos sobre a Teoria das Pontes Cruzadas (Huxley, 19757): se a força muscular é a soma do número de pontes cruzadas estabelecidas; e se o número de pontes cruzadas estabelecidas é proporcional ao comprimento do sarcômero; como o mesmo músculo em um mesmo comprimento pode produzir contrações isométricas máximas com forças diferentes?

## **2.2 Propriedades Temporais**

Até a metade do século XX muitas idéias já surgiam sobre a capacidade do músculo de se contrair. Experimentos em animais eram desenvolvidos isolando-se músculos e fibras para verificar a capacidade de produção de força em resposta estímulos elétricos em comprimentos fixos – contrações isométricas (ABBOTT & AUBERT, 1952).

O estudo de Abbott e Aubert (1952), no entanto, é o primeiro estudo encontrado que utilizou contrações com variação de comprimento. Os pesquisadores estimularam eletricamente músculos isolados de peixes em contração isométrica; após aproximadamente três segundos os músculos eram alongados de 4 a 5 mm, mantendo o estímulo elétrico, e novamente a força

isométrica era medida. Da mesma forma o experimento foi realizado medindo a força isométrica em certo comprimento, encurtando o músculo mantendo o estímulo e medindo a força isométrica novamente.

Os resultados encontrados foram grande novidade para a época. Durante o alongamento ativo do músculo havia o desenvolvimento de um pico de força que diminuía no mesmo segundo e a força isométrica reestabelacida no comprimento final, após aproximadamente 4 segundos, era maior do que a força isométrica produzida no mesmo comprimento muscular sem o alongamento. Já a força isométrica medida no mesmo comprimento final depois do encurtamento ativo era menor do que a força isométrica naquele comprimento sem o encurtamento (ABBOTT & AUBERT, 1952).

Aprofundando um pouco mais seus estudos, os autores realizaram ainda o encurtamento e o alongamento em diferentes velocidades. Aparentemente o pico de força e a força reestabelecida após alongamento ativo não variam com a velocidade. Já no encurtamento, parece que o pico inferior é menor em maiores velocidades, já a força reestabelecida é menor em velocidades mais lentas de encurtamento (ABBOTT & AUBERT, 1952).

Edman, Elzinga e Noble (1978; 1982) realizaram experimentos semelhantes em fibras isoladas com auxílio de um transdutor de tensão e ativação elétrica. As fibras eram mantidas em solução fisiológica com temperatura controlada e ativadas para alcançarem a tetania. Observaram pico de força após alongamento ativo independente do comprimento final, mas dependente da velocidade, com maior pico de força em maiores velocidades de alongamento; tal comportamento estaria relacionado a propriedades viscosas das pontes cruzadas. A força reestabelecida foi maior apenas em comprimentos finais de sarcômeros acima de 2,3  $\mu\text{m}$ ; parece também haver um deslocamento da relação força X velocidade para maiores valores de força em uma mesma velocidade.

Além disso, foi observado que durante o alongamento ativo as bandas I de cada sarcômero também se alongam, diminuindo o contato entre os filamentos de actina e miosina o que, segundo a teoria das “pontes cruzadas”, deveria diminuir a força (GORDON, HUXLEY & JULIAN, 1966; HUXLEY & SIMMONS, 1971; EDMAN, ELZINGA & NOBLE, 1978). Para os autores este comportamento de aumento de força em comprimento de sarcômero acima de 2,3  $\mu\text{m}$  poderia ser explicado por

duas hipóteses: 1) força adicional de um novo elemento em paralelo com comportamento de uma mola capaz de absorver energia elástica durante alongamento e liberá-la para a contração; 2) o alongamento durante a contração ativaria as estruturas contráteis a produzirem pontes cruzadas mais fortes (EDMAN, ELZINGA & NOBLE, 1978).

Outra hipótese também considerada recentemente é a não uniformidade dos sarcômeros durante a contração, possibilitando aumento das pontes cruzadas durante o alongamento (RASSIER, HERZOG & POLLACK, 2003).

Resultados semelhantes foram encontrados novamente em 1982 e a explicação da adição de uma força elástica vinda dos elementos passivos se torna a explicação mais plausível devido a dependência da amplitude do alongamento, bem como o deslocamento da relação força X velocidade (EDMAN, ELZINGA & NOBLE, 1982).

Outros estudos confirmam o comportamento da força em resposta a ciclos de encurtamento/ alongamento com diminuição de força após encurtamento e aumento de força após alongamento (HERZOG & LEONARD, 2000; HERZOG, LEONARD & WU, 2000; LEE, HERZOG & LEONARD, 2001; LEE & HERZOG, 2002).

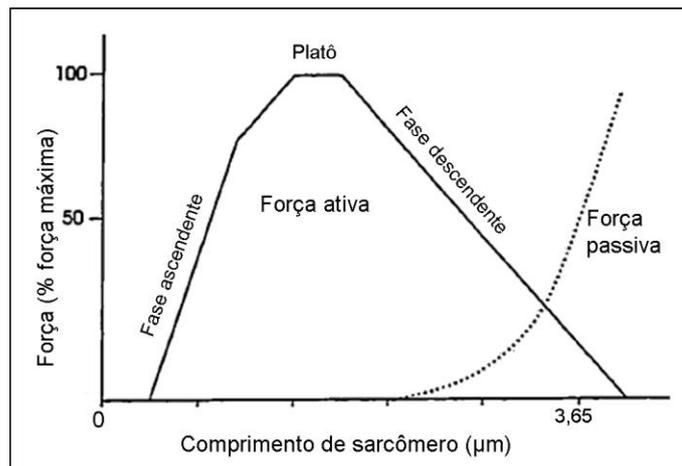
Considerando que esse comportamento é encontrado tanto em músculos, quanto em fibras isoladas, a explicação da força elástica das estruturas passivas como responsável pelo aumento de força após alongamento ativo só poderia ser aplicada se houvessem estruturas passivas no sarcômero.

Aliando então os vários estudos sobre a proteína gigante do sarcômero, a titina (Maruyama ET AL., 1977; Linke ET AL., 1998; Trombitás ET AL., 1998; Minajeva ET AL., 2001; Tournel ET AL., 2002; Tskhovrebova & Trinick, 2003), e suas propriedades elásticas, parece que esta seria a responsável pela conservação de energia elástica durante o alongamento e sua liberação para contração muscular.

Evidências ainda indicam a colaboração da titina na força muscular apenas em alongamentos ativos e uma relação cálcio-dependente da rigidez da titina (JOUmaa ET AL., 2007; LEE, JOUmaa & HERZOG, 2007).

### 2.3 Estruturas passivas: produção de força além das pontes cruzadas

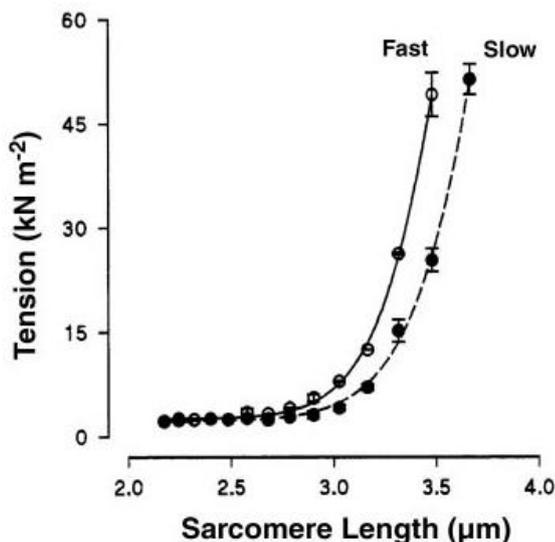
Além das estruturas contráteis, as pontes cruzadas de actina e miosina, o músculo esquelético possui também estruturas não contráteis responsáveis pela resistência passiva, ou seja, resistência oferecida sem gasto de energia. Segundo Wottiez e colaboradores (1984) a força passiva de uma fibra muscular em seu comprimento ótimo de produção de força é de aproximadamente 6,5% da força ativa máxima em um abalo. Já em uma fibra alongada a 130% do seu comprimento ótimo, a força passiva é de aproximadamente 87% da força ativa máxima, sendo o aumento de força exponencial ao alongamento. A Figura 2 apresenta a relação força X comprimento do sarcômero com suas componentes: força ativa e força passiva.



**Figura 2 – Relação força ativa X comprimento e força passiva X comprimento do sarcômero.**

**Adaptada: GORDON, HUXLEY & JULIAN, 1966.**

As estruturas passivas do sistema muscular têm a propriedade de conservar energia mecânica elástica durante o alongamento. A tensão gerada pela energia acumulada é responsável pela retração espontânea do músculo para o comprimento de repouso pela liberação da energia elástica acumulada (ALEXANDER, 2002; GOSSELIN, 1998). Por isso o termo “propriedades elásticas” tem sido utilizado no estudo da função muscular (MACINTOSH & MACNAUGHTON, 2005; SANDERCOCK, 2000). A Figura 3 apresenta a relação da tensão passiva X comprimento de sarcômero para fibras rápidas e lentas.



**Figura 3 – Relação tensão passiva X comprimento de sarcômero para fibras lentas e fibras rápidas.**

**Fonte: MUTUNGI, TRINICK & RANATUNGA, 2003.**

Mais especificamente, segundo Mutungi (2003), as estruturas passivas apresentam um comportamento visco-elástico. Quando o alongamento ativo acontece a tensão pode aumentar proporcional ao aumento da velocidade (viscoso), pode alcançar um platô (visco-elástico) ou pode ser independente da velocidade (elástico). Em situações de velocidades baixas de alongamento ativo predomina a tensão viscoelástica e elástica.

Joumaa, Leonard e Herzog (2007) citam que entre as estruturas envolvidas na força passiva estão pontes cruzadas enfraquecidas, tecido conectivo (endomísio, perimísio e epimísio), filamentos intermediários, sarcolema e titina. Isso significa capacidade de gerar força passiva em cada sarcômero, nas fibras e no músculo. Hoje, inclusive, já se assume que cada ponte cruzada possui um elemento elástico, mas não se sabe ainda ao certo sua localização (HUXLEY, 2000). Já se tem evidências também de diminuição da força passiva em músculos isolados e com a remoção da actina, ou seja, parece que a própria actina tem função na força passiva (GRANZIER & WANG, 1993).

O tecido conectivo que envolve as fibras, os fascículos e o músculo todo é composto por teias de fibras de colágeno que formam endomísio, perimísio e epimísio. Análises microscópicas têm demonstrado que essas fibras, principalmente no perimísio, mudam sua organização durante alongamentos, desfazendo sua

formação ondulada e se organizando em paralelo. Esse processo de mudança seria responsável por oferecer resistência ao alongamento muscular (BORG & CAULFIELD, 1980; WILLIAMS & GOLSPINK, 1984; PURSLOW, 1989). Considerando essa especial propriedade do perimísio, está sendo estudada inclusive hipótese de que o tecido conectivo possa se contrair ativamente aumentando a rigidez muscular durante alongamento (SCHLEIP ET AL., 2006).

Quanto aos filamentos intermediários, Waterman-Storer (1991) explica que estes se localizam nos discos Z e na periferia de miofibrilas, paralelos e perpendiculares às fibras musculares com função de manter a estrutura das miofibrilas e evitar mudanças muito grandes no comprimento de sarcômeros vizinhos.

Sandercock (2000) apresenta ainda resultados de somação de força não-linear nas fibras musculares. Segundo o autor cadeias de proteínas capazes de transmitir força lateral (filamentos intermediários) são responsáveis por manter certa homogeneidade de sarcômeros entre fibras vizinhas prevenindo lesões e a diminuição da força (SANDERCOCK, 2000).

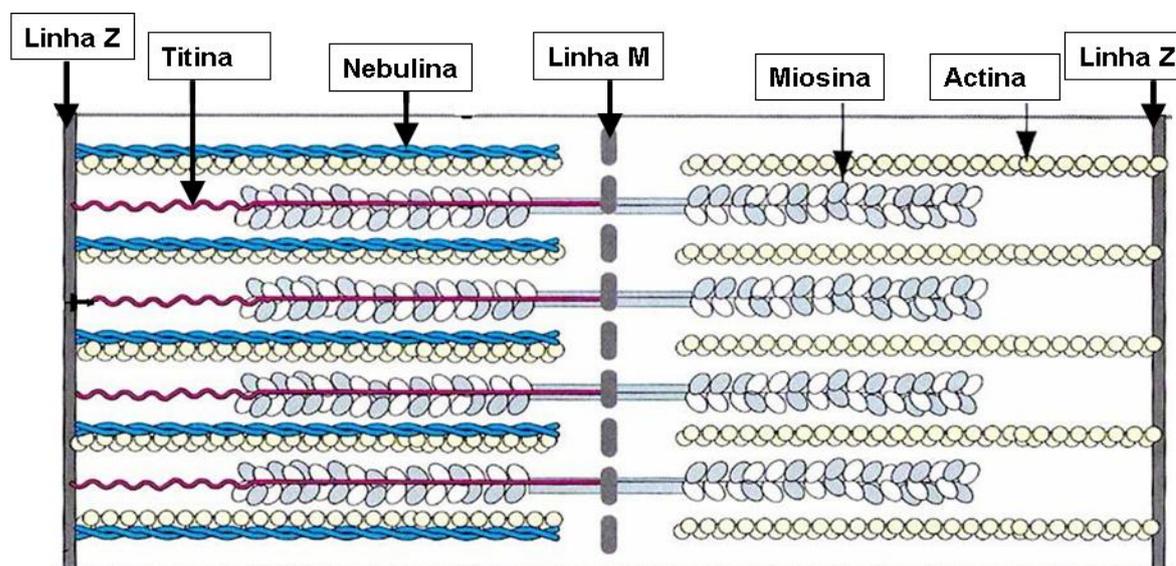
Outra importante cadeia protéica responsável pela força passiva é a titina. Conhecida também como a molécula gigante do sarcômero, além da função estrutural nos discos Z e na ligação da miosina ao disco Z a titina é capaz de aumentar sua rigidez durante o alongamento do músculo. Joumaa e colaboradores (2007), ao testarem miofibrilas isoladas (sarcômeros em série), observaram aumento força passiva depois de alongamento ativo. Concluíram que a titina como estrutura passiva do sarcômero deve ser responsável pelo aumento de força; e que o aumento só acontece em alongamento ativo, ou seja, parece haver um aumento na rigidez da titina induzido pela ativação muscular (JOUMAA ET AL., 2007).

### **2.3.1 Titina**

A titina (também conhecida como conectina- $\beta$ ) é uma cadeia de proteínas simples dentro do músculo (3,0 -3,5 Mega Daltons) e um dos maiores constituintes do músculo estriado de vertebrados (DI COLA ET AL., 2005). Estruturalmente, ela é considerada como o maior polipeptídeo encontrado na natureza (TSKHOVREBOVA & TRINICK, 2004).

Em fragmentos de fibras e miofibrilas do músculo psoas de coelhos a titina representa de 5-7% do peso total de proteínas. Contém 5% da sua composição de lipídios e 1% de açúcares em miofibrilas. É composta ainda por 18 aminoácidos também presentes na elastina e no colágeno, que se distribuem diferentemente em proteínas do músculo cardíaco e do músculo esquelético (MARUYAMA ET AL., 1977).

A molécula de titina tem mais de 1  $\mu\text{m}$  de comprimento e liga as linhas Z e M do sarcômero (Figura 4). Faz parte do citoesqueleto com função estrutural na linha Z e na parte que acompanha a miosina; possui propriedades elásticas na banda I (TROMBITÁS ET AL., 1998; MINAJEVA ET AL., 2001; TOURSEL ET AL., 2002).



**Figura 4 – Sarcômero do músculo estriado esquelético. Fonte: ALBERTS ET AL., 2002.**

Está envolvida em vários mecanismos regulatórios importantes do músculo, relacionados ao seu desenvolvimento, organização estrutural, elasticidade e como sinalizador intracelular (TSKHOVREBOVA & TRINICK, 2003). Segundo Granzier e Labeit (2006) a titina responde ao estresse mecânico sinalizando e regulando a expressão gênica.

Evidências recentes demonstram que além de sua função elástica em alongamentos ativos, a titina também estaria ligada ao mecanismo de pontes cruzadas. Sua forte ligação com  $\alpha$ -actinina no disco Z e com os filamentos de miosina seria a responsável por manter a estrutura do sarcômero durante a

contração, além de facilitar a interação entre actina e miosina no músculo cardíaco e esquelético (NIEDERLÄNDER ET AL., 2004; LINKE, 2008). Resultados de Minajeva e colaboradores (2002) sugerem ainda diminuição da velocidade de contração em fibras tratadas com tripsina, enzima que desintegra a estrutura da titina, evidenciando a participação da titina nos mecanismos da contração muscular.

A região localizada na banda I é funcionalmente extensível. Possui um domínio PEVK, constituído por prolina (P), glutamato (E), valina (V) e lisina (K) e regiões poly-Ig formadas por cadeias protéicas de imunoglobulina. A região localizada na banda I é funcionalmente extensível, a região localizada na Banda A é rígida devido à forte ligação com a miosina (TROMBITÁS ET AL., 1998; LINKE ET AL., 1998; TSKHOVREBOVA & TRINICK, 2005). A estensibilidade da titina e sua relação com a tensão passiva foi também demonstrada por imuno-fluorescência e imuno-eletrônica in situ, e por medições mecânicas nas fibras e miofibrilas (LINKE ET AL., 1998; DI COLA ET AL., 2005; NAGY ET AL., 2005).

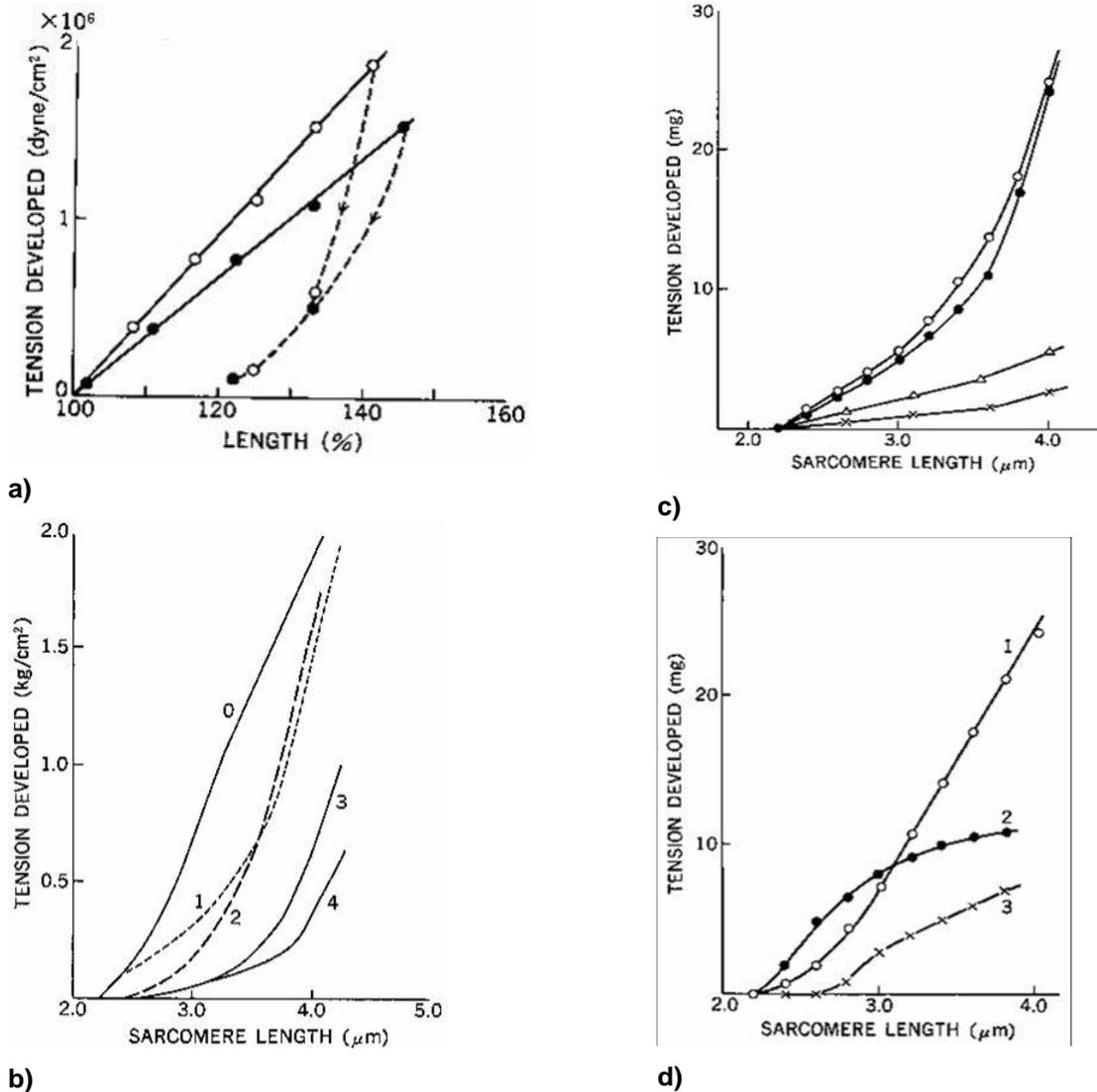
A Figura 5 apresenta a estrutura da titina em cada região do sarcômero. De acordo com Linke et al. (1998) a região Ig longa e resiste a menores comprimentos de sarcômero, enquanto que o domínio PEVK alonga e resiste a maiores comprimentos de sarcômero. Ou seja, possivelmente os achados de aumento de força após alongamento ativo, como um comportamento dependente do comprimento inicial (EDMAN, ELZINGA & NOBLE, 1978), indicam maior envolvimento na região PEVK nesse fenômeno.



**Figura 5 – Regiões da titina em relação as regiões do sarcômero. Fonte: LINKE ET AL., 1998.**

Quando o sarcômero realiza contração ou alonga a região extensível se encurta ou estende na mesma proporção. Os gráficos apresentados na Figura 6 demonstram o comportamento de um grupo de fibras musculares em diferentes

situações observadas no experimento de Maruyama e colaboradores em 1977. A Figura 6a representam filamentos de titina isolados e a tensão ao longo do alongamento. Segundo os autores, com pequenas deformações a titina se comporta como um elástico perfeito retornando ao seu estado inicial; já em deformações próxima a 40% do comprimento inicial existe uma deformação plástica. A Figura 6b mostra que a tensão passiva do músculo se desloca para maiores alongamentos sem a miosina, mas a tensão máxima não se altera; já com a remoção da actina há também redução da tensão máxima. Contudo, o que se destaca tanto na Figura 6b quanto na Figura 6c é a redução de tensão em fibras tratadas com soluções alcalina, que dissolveram as moléculas de titina. Por fim, novamente há grande redução na tensão passiva em fibras tratadas com tripsina, uma enzima protease capaz de degradar moléculas de titina ocasionando redução da concentração da mesma nas fibras analisadas (MARUYAMA ET AL., 1977).



**Figura 6 – Relações tensão passiva X comprimento. A) filamentos de titina de músculo cardíaco (○) e músculo esquelético (●); b) fibras isoladas (0) e depois da extração da miosina (1), extração da actina (2), tratamento com solução alcalina por 10 min (3) e tratamento com solução alcalina por 30 min (4); c) fibras isoladas após extração de miosina e tratamento com pH 7,0 (○); pH 11,0 (●); pH 13,0 (Δ) e pH 14,0 (x); d) fibras isoladas tratadas ou não com tripsina controle (○); 2 min com tripsina (●); 5 min com tripsina (x). Fonte: MARUYAMA ET AL., 1977.**

Complementando os resultados até então apresentados, Tskhovrebova & Trinick (2001) afirmam que, devido ao espaço de conformação, a tração e compressão da molécula dentro do sarcômero ocorrem de um modo mais organizado ou com maior viscosidade e forças maiores do que as que são observadas em estudos em solução de proteínas isoladas. Segundo os autores acima citados, estas diferenças podem ser encontradas nos experimentos *in vitro* e *in situ*.

Em contrapartida, a colaboração da titina nas propriedades elásticas do músculo, foi questionada recentemente por Lee, Joumaa e Herzog (2007). Perceberam em seu estudo que o aumento da força passiva se dá com alongamento ativo do músculo, e não com alongamento passivo, o que leva a conclusão de que a titina isoladamente não teria influências na força total do músculo, e dificilmente sofreria adaptações características dos tipos de treinamentos aplicados.

Parece inclusive que a rigidez da titina aumenta durante o alongamento ativo. A hipótese mais aceita é que o aumento nas concentrações sarcoplasmáticas de cálcio durante a ativação muscular poderiam estar influenciando e que a tensão produzida pela titina seja cálcio-dependente (LBEIT, 2003).

Ainda concentradas na função da titina como estrutura elástica e participante da contração ativa do sarcômero, pesquisas sobre as adaptações crônicas da titina intramuscular ao treinamento ou ao desuso são escassas na literatura. Estudo descrito por Goto e colaboradores (2003) investigou as adaptações desta proteína ao desuso, por meio da suspensão das patas traseiras de ratos. Encontrou adaptações na expressão da titina, com redução ao longo do tempo, seguida de recuperação depois de um período de remobilização. Da mesma forma Tatsumi e colaboradores (2001) demonstraram que estruturas secundárias da parte elástica da titina foram modificadas pelas ligações de  $Ca^{2+}$ .

Estudo de Pinniger, Ranatuga e Offer (2006) apresentam aumento de força residual pós-alongamento em fibras musculares mesmo após a supressão da atividade da miosina, ou seja, esse aumento se daria devido a outras estruturas que não as pontes cruzadas, supostamente a titina.

Já Horowitz e colaboradores (1986) afirmam que as propriedades elásticas da titina não são alteradas pelo exercício, pelo aumento de  $[Ca^{2+}]$  e atividade das pontes cruzadas, apesar das propriedades elásticas não terem sido ainda bem determinadas.

Entretanto não existem evidências suficientes para afirmar ou negar a capacidade de adaptação da titina ao treinamento e determinar sua função na força muscular.

## 2.4 Locomoção X Tipo de Contração

Estudos com seres humanos e animais propõem que a locomoção se dá através do mecanismo do pêndulo invertido: os membros agem de forma simultânea e oposta (CAVAGNA ET AL., 1977; GRIFFIN ET AL., 2004). Durante esse processo o centro de massa se desloca e há trocas constantes de energia. A energia potencial gravitacional e a energia cinética flutuam de forma inversa (CAVAGNA ET AL., 1977).

Mais especificamente, quando o centro de massa atinge sua posição mais alta durante a fase de apoio há valores máximo de energia potencial, enquanto que a energia cinética está no seu valor mais baixo; entre a posição mais alta e a posição mais baixa há transição das energias de forma inversa, a energia cinética aumenta e a energia potencial diminui; a soma das energias é um valor constante. A variação do centro de massa e, conseqüentemente, das energias é descrita como trabalho mecânico externo (CAVAGNA ET AL., 1963, 1977; CAVAGNA & MARGARIA, 1966).

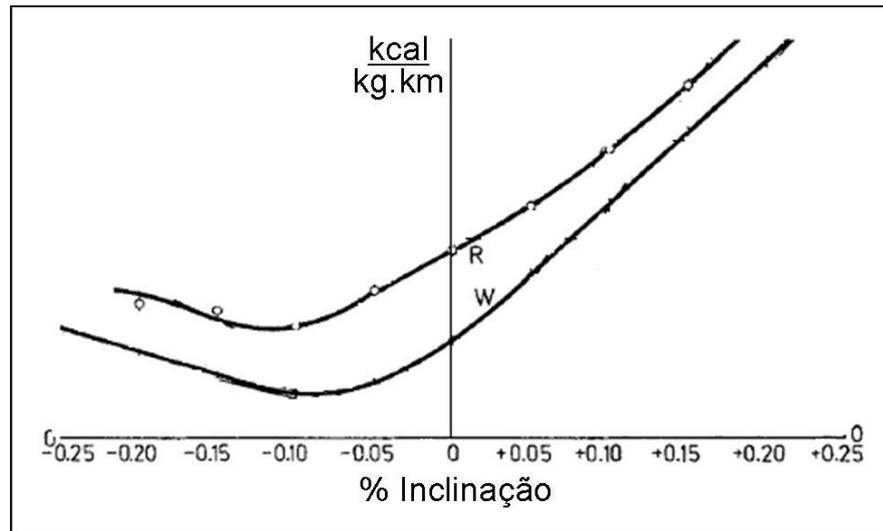
Da mesma forma Heglund e colaboradores (1982) relacionaram a energia do centro de massa dos membros e a energia total (cinética e potencial). Para os autores a energia mecânica total de um animal correndo pode ser descrita em qualquer instante particular como o somatório das energias potencial gravitacional e cinética do centro de massa, mais a energia cinética dos segmentos do corpo relativa ao centro de massa e mais a energia potencial elástica do sistema.

Para quadrúpedes esse mecanismo se assemelha a dois pêndulos invertidos: um deles nas patas da frente e o outro nas patas de trás. No entanto, esse mecanismo ainda não está muito bem esclarecido, pois, aparentemente, as energias não variam como nos bípedes e, por contar com quatro apoios e não somente dois, há maior oscilação do centro de massa durante a locomoção em quadrúpedes (GRIFFIN ET AL., 2004).

A capacidade de se locomover deslocando o centro de massa é consequência da contração de vários grupos musculares, da força passiva dos tecidos, da energia metabólica despendida, enfim, de todos os processos que acontecem no organismo e permitem a produção de força (CAVAGNA ET AL., 1977; GRIFFIN ET AL., 2004; BIEWNER, 2006).

Diversos estudos citam então uma relação entre o trabalho mecânico total e os fenômenos internos. Quando o trabalho externo é negativo, em declive de, no mínimo, 16°, há predominância de trabalho muscular excêntrico, em parte pela intenção constante de desacelerar o deslocamento do centro de massa; quando o trabalho externo é positivo, em aclave de, no mínimo, 15°, há predominância de trabalho muscular concêntrico, em parte pela intenção constante de acelerar o centro de massa (CAVAGNA ET AL., 1963; 1968; CAVAGNA, HEGLUND & TAYLOR, 1977; MINETTI ET AL., 1993). Além disso, o trabalho positivo depende unicamente de energia metabólica, enquanto que o trabalho negativo conta com a colaboração das estruturas passivas (CAVAGNA ET AL., 1963; 1968)

A Figura 7 reflete a consequência do maior trabalho positivo em aclave e do maior trabalho negativo em declive, nas situações caminhando e correndo. Observa-se maior gasto de energia metabólica em aclave (trabalho positivo) e menor gasto de energia metabólica em declive (trabalho negativo) e, segundo Margaria (1968) esse aumento por km em aclave em relação ao plano é de 25%, enquanto que em declive há diminuição de 20% de gasto de energia. Outros estudos encontram ainda maior ativação muscular concomitante ao aumento do trabalho positivo em aclave (GILLIS & BIEWENER, 2002; DALEY & BIEWENER, 2003).



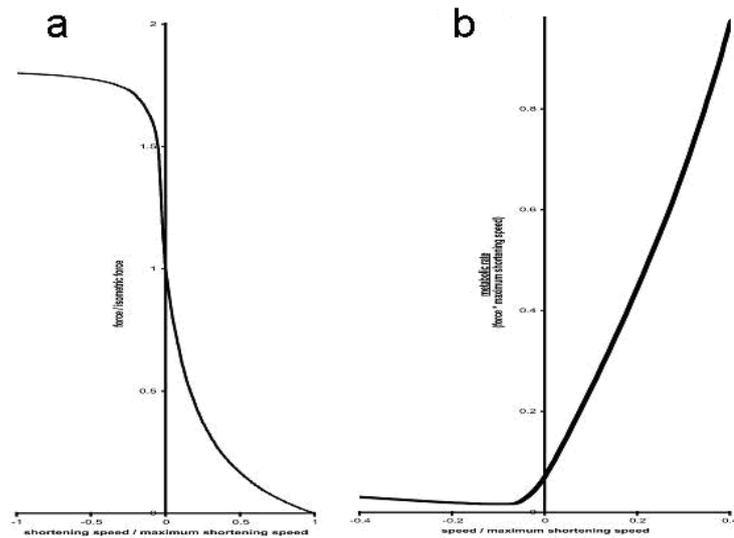
**Figura 7 – Gasto energético caminhando na velocidade mais econômica (W) e correndo (R) em relação à inclinação. Fonte: MARGARIA, 1968.**

Lee e colaboradores (2008) afirmam que as pernas dos animais encurtam quando sustentam uma carga – neste caso o peso do corpo – e alongam produzindo força assim que a carga é retirada. Essa relação inversa reflete o funcionamento de uma mola composta por todas as estruturas passivas do sistema músculo-esquelético, um mecanismo capaz de conservar e dissipar/transmitir energia. Esse comportamento elástico é considerado, junto com a força da gravidade, um dos principais fatores minimizadores do gasto de energia metabólica na locomoção em declive (LEE ET AL., 2008).

Butterfield, Leonard e Herzog (2005) aplicaram o conceito em situações semelhantes a proposta do presente estudo, treinando ratos Wistar em esteira com inclinações de +16 graus e -16 graus. Encontraram aumento do número de sarcômeros em série no músculo Vasto Intermédio de ratos que treinaram em declive por 10 dias, mas sem diferenças no músculo Vasto Lateral.

Aceitando que as estruturas passivas absorvem energia durante o alongamento e a adaptação funcional se dá pelo recrutamento das estruturas, então, o tipo de contração seria primordial no tipo de adaptação ao treinamento. A contração excêntrica, por exigir desempenho durante o alongamento, deveria resultar em maior adaptação das estruturas passivas do que a contração concêntrica.

Segundo equações desenvolvidas por Alexander em 1997, em velocidades negativas, ou seja, contração excêntrica, as propriedades do tendão seriam evidenciadas e, conseqüentemente, o trabalho metabólico seria reduzido sem prejudicar o desempenho. Esse comportamento está ilustrado na Figura 8.



**Figura 8 – Propriedades do músculo esquelético de vertebrados a partir de equações empíricas. a) relação força x velocidade de contração do músculo; b) relação do custo metabólico pela velocidade de contração do músculo. Fonte: ALEXANDER, 1997.**

Assim, com a aplicação de um treinamento em acentado ou declive como estímulo concêntrico ou excêntrico, respectivamente, espera-se que ocorram diferentes adaptações na tensão e nas estruturas passivas.

### 3 HIPÓTESES

As hipóteses a seguir foram formuladas: a) considerando o músculo esquelético como um tecido adaptável a demandas funcionais e; b) considerando que na locomoção em aclone o músculo sóleo de ratos realiza contrações concêntricas e que na locomoção em declive o músculo sóleo de ratos realiza contrações excêntricas;

1. Pela capacidade das estruturas passivas de adaptar ao exercício (Muñiz ET AL, 2001; Gosselin ET AL, 1998) e a maior utilização das estruturas passivas em contrações excêntricas (Alexander, 2002), espera-se que:

- o A tensão passiva seja maior nos animais que treinaram em declive, intermediária nos animais que treinaram em aclone e menor nos animais controle;
- o A rigidez do tecido seja maior nos animais que treinaram em declive, intermediária nos animais que treinaram em aclone e menor nos animais controle;
- o A integral da curva tensão x deformação, representando o trabalho, seja maior nos animais que treinaram em declive, intermediária nos animais que treinaram em aclone e menor nos animais controle;
- o A expressão da titina seja maior nos animais que treinaram em declive e semelhante nos animais que treinaram em aclone e nos animais controle.

2. Pela adaptação do número de sarcômeros em série ao treinamento excêntrico (Lynn & Morgan, 1994; Lynn, Talbot & Morgan, 1998; Butterfield, Leonard & Herzog, 2005), espera-se que:

- o O número de sarcômeros em série seja maior nos animais que treinaram em declive e semelhante nos animais que treinaram em aclave e nos animais controle;
- o O comprimento médio dos sarcômeros seja menor nos animais que treinaram em declive e semelhante nos animais que treinaram em aclave e nos animais controle;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

O estudo tem um caráter descritivo comparativo do tipo *ex post facto* (CAMPBELL & STANLEY, 1979). Para a realização do cálculo amostral foram utilizados dados de ensaios mecânicos apresentados por Muñiz e colaboradores (2001) em estudo que avaliou efeitos de treinos de resistência em velocidade na tensão passiva de ratos Wistar. O cálculo foi realizado no software WinPipe. Considerando nível de significância  $p = 0,05$ , poder de 80% e diferenças mínimas de 10% foi indicado número de nove animais por grupo. Este tamanho amostral é compatível também com trabalhos similares que avaliaram as demais variáveis deste estudo (LYNN & MORGAN, 1994; ADAMS ET AL, 2004; SOTIRIADOU ET AL, 2006).

Prevendo possíveis perdas o estudo foi iniciado com 12 animais por grupo. Foram utilizados ratos Wistar (total de 36 ratos machos adultos), com idade no início do treinamento de 90 dias, massa corporal  $291,22 \pm 29,39$  g. Os animais foram mantidos em caixas cobertas por grades (5 animais por caixa – Figura 9) no Biotério da Farmacologia – ICBS, com água e comida a vontade e ciclos de 12 h claro/ 12 h escuro.



**Figura 9 – Caixa onde os ratos foram mantidos**

Três animais morreram antes do fim dos experimentos. Assim o grupo controle (C) foi composto por 11 animais; o grupo Experimental em Declive (D) por 10 animais e o Grupo Experimental em Aclive (A) por 12 animais. A Tabela 1 apresenta a massa corporal média por grupo nos períodos pré-treinamento e pós-treinamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos no período pré-treinamento ( $F(2, 32) = 0,115$ ;  $p = 0,892$ ) e no período pós-treinamento ( $F(2, 32) = 1,473$ ;  $p = 0,245$ ), o que indica homogeneidade dos animais.

**Tabela 1 – Valores de média e desvio padrão da massa corporal por grupo nos períodos pré e pós-treinamento.**

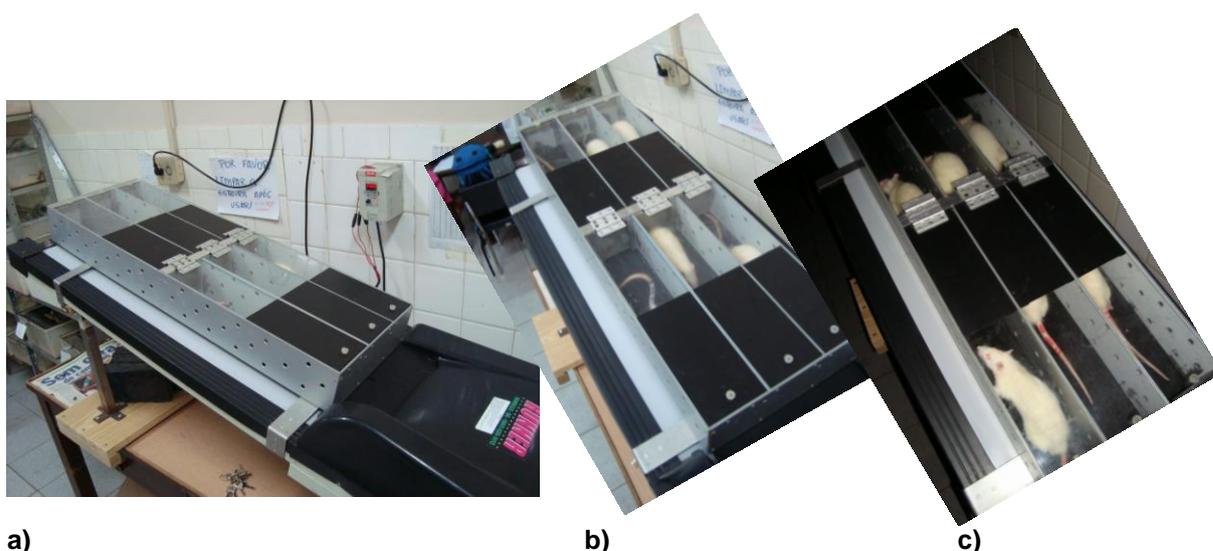
Grupo	Massa Corporal (g)			
	Pré-treinamento		Pós-treinamento	
	Média	DP	Média	DP
Controle	294	31	321	38
Aclive	293	23	324	33
Declive	288	35	301	28

Devido à necessidade de rapidez entre o sacrifício dos animais e a execução dos ensaios de tração tais experimentos foram realizados em seis dias (6 animais/dia). Assim, o início dos treinamentos também aconteceu em dias diferentes, organizando o cronograma para que os animais fossem sacrificados dois dias depois de 30 dias de treinamento.

Os treinamentos, sacrifício dos animais e procedimentos histológicos foram realizados no Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); os procedimentos bioquímicos foram realizados no Departamento de Bioquímica da UFRGS; os ensaios de tração dos músculos foram realizados no Laboratório de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). O estudo foi submetido ao Comitê de Ética da UFRGS e ao Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUC-RS e aprovado sob protocolos 2007725 (31/08/2007 - UFRGS) e 08/00028 (23/07/2008 - CEUA, PUC-RS), respectivamente.

#### 4.2 Programa de Treinamento

O treinamento consistiu do modelo de aclave e declive adaptado a partir dos estudos de Gosselin (1998), Butterfield ET AL. (2005) e Pereira ET AL. (2006), e com referências do estudo piloto desenvolvido em 2008 (KRONBAUER ET AL, 2008). Foi utilizada uma esteira caseira adaptada com compartimentos individuais ventilados e a cobertura escurecida na parte anterior do compartimento (Figura 10).



**Figura 10 – Esteira com compartimentos individuais ventilados; a) esteira inclinada com raia individuais; b) animais correndo em declive; c) animais correndo em aclave.**

O grupo experimental aclone treinou em inclinação de +16° e o grupo experimental declive treinou em inclinação de -16° (GOSSELIN, 1998; BUTTERFIELD ET AL., 2005). Foram realizadas quatro sessões de adaptação de 10 minutos cada, a velocidade de 3,5 m/min e em seguida uma avaliação da velocidade máxima para cada animal nas respectivas inclinações, adaptada de Melo, Martinho e Michelini (2003). Os animais foram divididos em quatro grupos: A1 e A2 (aclone); D1 e D2 (declive). A Tabela 2 apresenta as médias das velocidades máximas por grupo.

**Tabela 2 – Média das velocidades (m/min) por grupo de treinamento.**

Grupo de treinamento	Média das velocidades máximas (m/min)
Aclone 1	7,27
Aclone 2	6,31
Declive 1	8,07
Declive 2	6,50

A opção por avaliar a velocidade dos animais se justifica pela relação estabelecida por Margaria (1968) entre o custo de transporte em inclinações, e por resultados apresentados por Wickler ET AL. (2000). Os autores relatam relação entre a velocidade preferida e o menor custo de transporte, sendo que em aclone, onde o custo de transporte é maior, a velocidade preferida desenvolvida pelos animais é menor.

A velocidade de treinamento foi estabelecida considerando a velocidade máxima média inicial (VMI) de cada grupo. Tomou-se o cuidado de aumentar a velocidade de treinamento quando o tempo era mantido, e aumentar o tempo de treinamento quando a velocidade era mantida. Foram também mantidas sessões de recuperação relativos a carga de treinamento. Aceitando que o desempenho dos animais melhoraria durante o treinamento, a velocidade máxima também aumentaria, sendo assim as intensidades são relativas à velocidade máxima inicial. O Quadro 1 apresenta a velocidade relativa e o tempo para cada dia de treinamento.

**Quadro 1 – Dias e respectivos volumes de treinamento de ambos os grupos experimentais.**

Dias	Velocidade	Tempo	Dias	Velocidade	Tempo
1	60% VMI	10 min	24	60% VMI	40 min
2	60% VMI	15 min	25	Intervalo	
4	Intervalo		26	Intervalo	
5	Intervalo		27	80% VMI	40 min
6	70% VMI	20 min	28	85% VMI	40 min
7	65% VMI	20 min	29	90% VMI	30 min
8	70% VMI	25 min	30	95% VMI	30 min
9	70% VMI	25 min	31	100% VMI	30 min
10	75% VMI	25 min	32	Intervalo	
11	Intervalo		33	Intervalo	
12	Intervalo		34	100% VMI	35 min
13	70% VMI	30 min	35	105% VMI	35 min
14	75% VMI	30 min	36	110% VMI	30 min
15	80% VMI	30 min	37	105% VMI	40 min
16	80% VMI	35 min	38	110% VMI	35 min
17	75% VMI	40 min	39	Intervalo	
18	Intervalo		40	Intervalo	
19	Intervalo		41	110% VMI	35 min
20	80% VMI	40 min	42	100% VMI	40 min
21	90% VMI	30 min	43	Intervalo	
22	90% VMI	30 min	44	Intervalo	
23	60% VMI	35 min	45	Sacrifício	

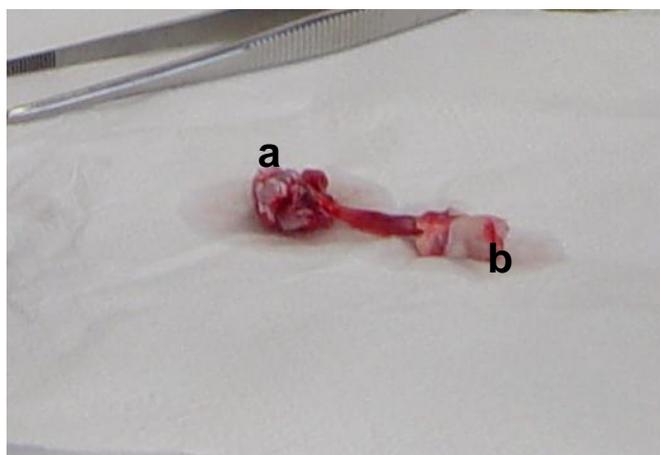
Devido à especificidade dos procedimentos histológicos e a capacidade de identificarem tanto adaptações agudas quanto adaptações crônicas ao exercício, os últimos intervalos foram feitos em dias diferentes, para que todos os animais treinassem dois dias consecutivos e mantivessem 48 horas de intervalo antes do sacrifício.

### 4.3 Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico intra-peritoneal (5 ml). Após os procedimentos os animais foram decapitados e descartados. Devido a perda de amostras durante os procedimentos cirúrgicos e na fixação dos músculos nas garras de pressão para os ensaios mecânicos o número de amostras por grupo está indicado em cada procedimento.

*Para os ensaios de tração (n = 24 músculos; 7C, 8A e 9D):*

O músculo sóleo da pata direita foi removido mantendo parte da origem e inserção distal (fíbula, músculos adjacentes e calcâneo) para melhor fixação na máquina de ensaios (Figura 11). Com a utilização de um paquímetro analógico da marca Mitutoyo (150 mm; resolução 0,05mm) foram medidos o comprimento do músculo, da origem fibular até a face inferior do calcâneo; e a espessura da face anterior na região intermediária perpendicular a linha do comprimento muscular



**Figura 11 – Músculo sóleo fresco com a origem (a) e a inserção distal (b) logo após a retirada.**

*Para análise bioquímica por western blot (n = 12 músculos; 4C, 4A, 4D):*

O músculo sóleo da pata esquerda foi retirado cuidadosamente para manter apenas tecido muscular, pesado, acondicionado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para em seguida ser conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Para microscopia (n = 13 músculos; 4C, 4A, 5D)*

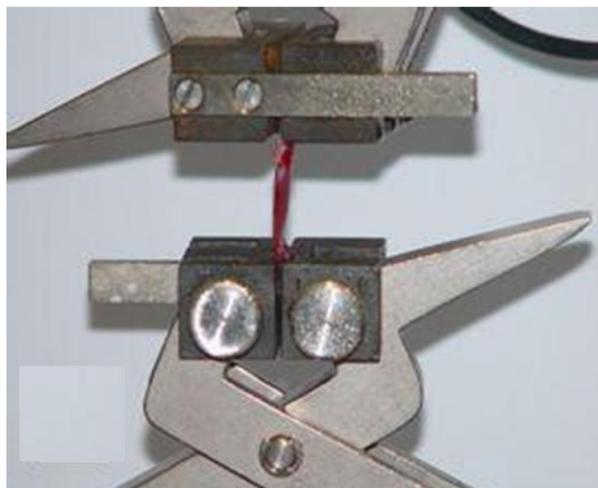
O músculo sóleo da pata traseira esquerda foi retirado cuidadosamente verificada a massa, para em seguida ser fixado com alfinetes pelas extremidades em lâminas de poliestireno. O comprimento dos músculos fixados foi medido com o paquímetro. Em seguida os músculos foram acondicionados em solução fixadora de paraformaldeído 4% diluído no tampão fosfato (TF) 0,1M, pH 7,4 e resfriados.

#### 4.4 Ensaio de Tração

Para os ensaios mecânicos foi utilizada a máquina de ensaios EMIC modelo DL 2000 com uma célula de carga de 50 N, com velocidade de  $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  e garras de pressão (Figura 12a). A captura dos dados foi feita pelo software Mtest LBP v. 3.0. Primeiramente foi medida a espessura dos músculos com um paquímetro Mitutoyo 150 mm, resolução de 0,05 mm. Em seguida o músculo foi fixado às garras pelas extremidades ósseas até a junção músculo-tendínea (Figura 12b). Solução salina foi borrifada às amostras a cada minuto a fim de mantê-las umedecidas e conservar as propriedades do tecido (WARD & LIEBER, 2005).



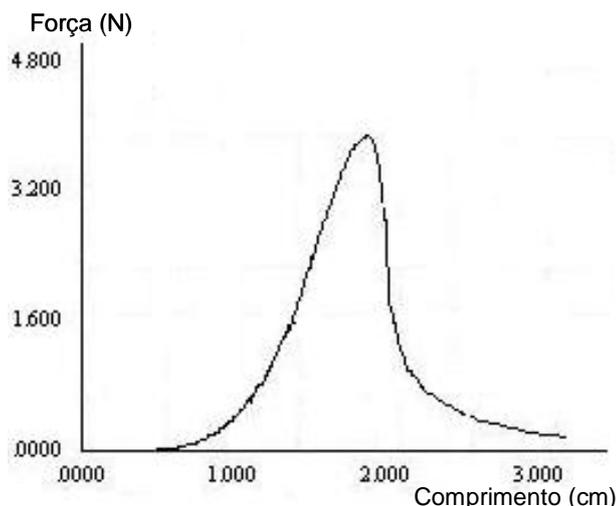
a)



b)

Figura 12 – a) Garra utilizada para fixar o material durante os ensaios de tração; b) músculo sóleo fixado às garras.

A Figura 13 ilustra uma curva de força típica deste ensaio. No eixo  $y$  encontram-se os valores de força em Newtons e no eixo  $x$  o comprimento do músculo em centímetros.



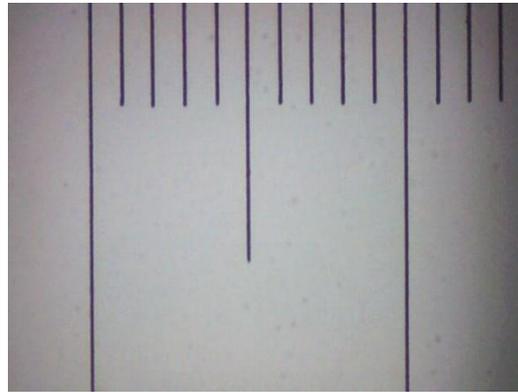
**Figura 13 – Exemplo de curva força passiva x comprimento de um ensaio de tração do músculo sóleo de ratos na máquina EMIC.**

#### **4.5 Sarcômeros em Série**

Os músculos sóleos foram retirados, posicionados sobre uma lâmina de poliestireno com alfinetes na posição alongada e acondicionados em solução fixadora de paraformaldeído 4% diluída em TF durante aproximadamente quatro horas. Em seguida os músculos foram retirados das lâminas e colocados em solução de ácido nítrico 30%, diluído em água destilada e deionizada. Após 48 horas a solução foi substituída por uma solução de glicerina 50% diluída em água destilada e deionizada; os músculos foram mantidos nesta solução em frascos escuros em temperatura ambiente.

Duas semanas depois os músculos foram retirados da solução de glicerina e fibras foram isoladas com ajuda de uma pinça. As fibras foram fixadas em lâminas por meio de bálsamo sintético do Canadá. Foram retiradas quatro fibras laterais, quatro fibras intermediárias e quatro fibras mediais do músculo. Após a fixação, cinco campos de cada fibra foram fotografados com uma câmera CCD Pro-Series High Performance acoplada a um microscópio (400x) Nikon eclipse, totalizando 60 imagens por animal. Para cada imagem foi contado o número de sarcômeros em série dentro de uma região de interesse (RDI), conforme proposto por Hajjar, Même & Léoty (1999) e, posteriormente, o comprimento da RDI foi calibrado em ambiente

matlab com a utilização de uma régua de calibração (Figura 14). Foi considerado um sarcômero a distância entre a linha média de uma banda clara até a linha média da banda clara seguinte.



**Figura 14 – Régua de calibração para cálculo do comprimento do campo**

A Figura 15 apresenta imagens de fibras musculares e o desenho do campo onde os sarcômeros foram contados. O tamanho das RDIs ao longo dos quais foram contados os sarcômeros variou conforme a qualidade das imagens.

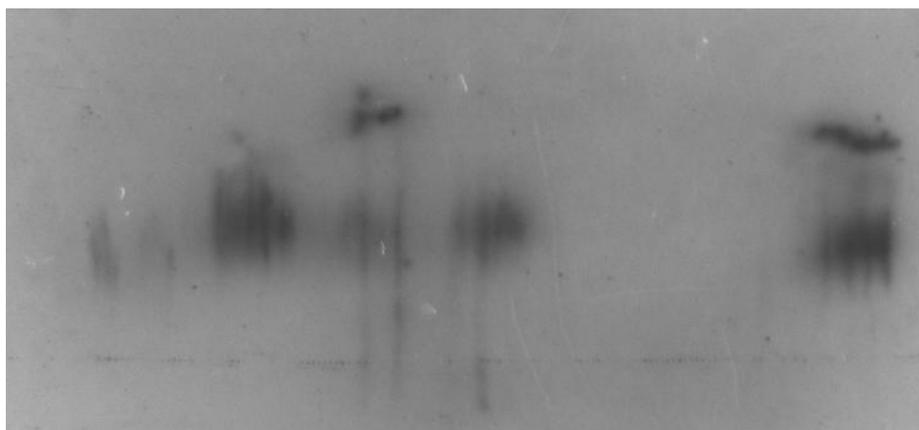


**Figura 15 – Exemplos de imagens de fibras musculares e o desenho do campo; a) fibra lateral do rato A5; b) fibra lateral do rato C9 e c) fibra medial do rato C9.**

#### **4.6 Expressão da titina por Western Blot**

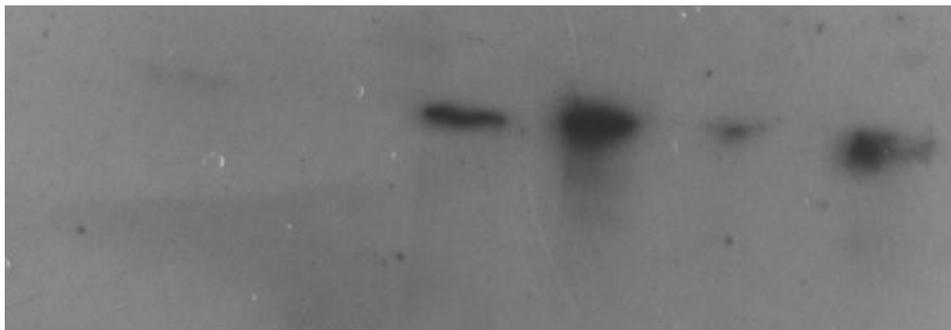
Uma porção do ventre muscular foi seccionada e homogeneizada com tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, SDS 2% (p/v), EDTA 0,0015M), Após as amostras foram fervidas por 3 minutos e centrifugadas a 20.000 g por 5

minutos a 20°C, a quantidade de proteínas totais foi quantificada pelo método de Peterson modificado (PETERSON, 1977). As amostras foram então colocadas em tampão de corrida (Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, SDS 2% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v)), e em seguida aplicadas em gel poliacrilamida-SDS e as proteínas separadas em bandas específicas de acordo com seu peso molecular por eletroforese. Foram testadas concentrações de 4% para o gel de entrada e 10% para o gel de corrida (Wang & Greaser, 1985), observando-se que as proteínas se deslocaram normalmente pelo gel, contudo a titina não entrou no gel de corrida. A partir dessa constatação foi testada uma concentração menor do gel de corrida (Anderson ET AL., 2002; Neagoe ET AL., 2003) e neste caso, conforme mostra a Figura 16, os fragmentos de titina se espalharam pelo gel de corrida.



**Figura 16 – Revelação com anticorpo das bandas de titina corridas em gel poliacrilamida-SDS 6%.**

Por fim, a partir dos estudos de Granzier e Wang (1993) e Niederländer ET AL. (2004), foi produzido um gel gradiente 4-10% e, em seguida testadas as concentrações de 4% para gel de entrada e 10% para gel de corrida mantendo a corrente de separação a 90 V por uma hora e 150 V por 3 horas. Para os testes das concentrações de gel as bandas de titina foram reveladas com a utilização do anticorpo monoclonal anti-titina 9D10 (Hybridoma Bank, University of Iowa, USA) por imunodeteção (WANG & GREASER, 1985). Por meio dessa técnica foi possível também identificar a posição da titina nas membranas. A Figura 17 apresenta as bandas da titina separadas no gel gradiente.



**Figura 17 – Revelação com anticorpo das bandas de titina corridas em gel gradiente poliacrilamida-SDS 4-10%.**

Após definidas as concentrações do gel, os parâmetros de corrida e a posição da titina foi realizada uma nova eletroforese. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences) em voltagem oscilante (próxima a 25 V) e amperagem definida multiplicando-se a área da membrana por 3 mA. Para estabelecer a relação entre a expressão da titina e da miosina sem a necessidade de adquirir mais anticorpos as membranas foram coradas com Red Ponceau. Após retirar o excesso com água destilada as membranas foram fotografadas com luz UV e as bandas quantificadas pelo software ImageQuant 350. As técnicas e soluções utilizadas estão descritas detalhadamente no Apêndice.

## **4.7 Análise**

### **4.7.1 Ensaios Mecânicos**

Após a realização dos ensaios mecânicos e a reconstrução das curvas de força passiva X deformação, foi construída uma nova curva de tensão passiva ( $\sigma$ ) X deformação relativa ( $\epsilon$ ), do início do ensaio até o pico de força, sendo:

$$(\epsilon) = l/l_0$$

$$\sigma = F/ASTE;$$

onde:

$l$  = comprimento do músculo em m

$l_0$  = comprimento inicial, em m, na primeira força detectada no ensaio

F = força em N

ASTE = área de secção transversa estimada em m<sup>2</sup>

A ASTE foi estimada considerando o músculo como um cilindro perfeito e a AST deste cilindro como:

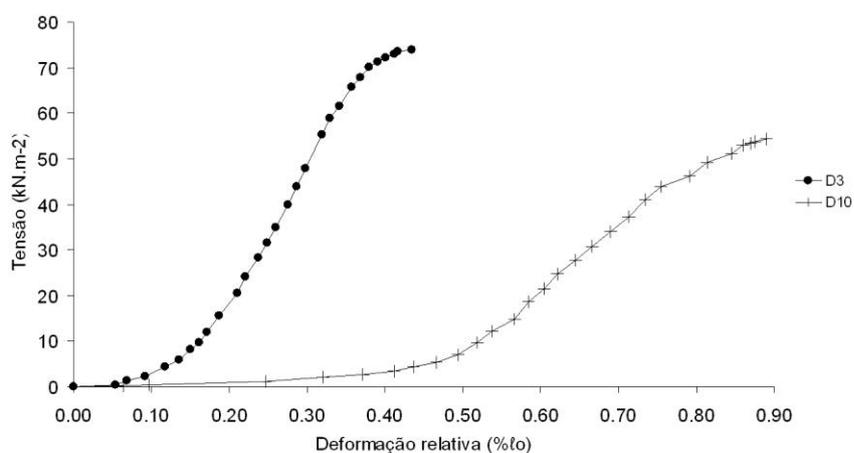
$$AST = \pi (r/2)^2;$$

onde:

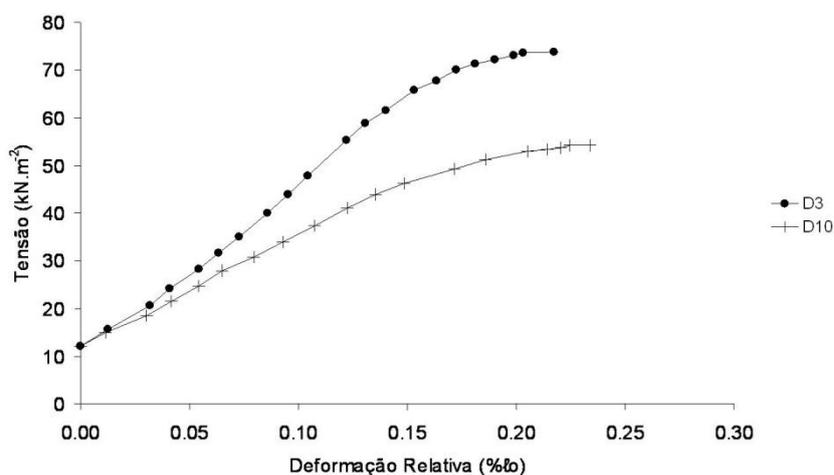
r = média de três medidas da espessura do músculo em m

A Figura 18 apresenta exemplos de curvas  $\sigma \times \epsilon$ . Considerando que os ensaios foram realizados com o músculo isolado e fixado em garras de pressão com ranhuras, uma limitação do método é a fase de acomodação dos tecidos nas garras. Além disso, segundo Muñiz e colaboradores (2001) a fase inicial dos ensaios representa a amplitude fisiológica do músculo, onde não existem deformações plásticas.

Considerando que o objetivo foi analisar a tensão em amplitudes supra-fisiológicas verificando a capacidade máxima de tensão até a ruptura e com o intuito de minimizar as variações decorrentes da acomodação dos tecidos nas garras, foi estipulado um valor mínimo de tensão de 10 kN.m<sup>-2</sup> para a análise das curvas; o valor máximo (valor de pico) foi assumido como o valor final da curva. A partir dessa nova curva foram calculados o trabalho (W), considerado a integral da curva e a rigidez do tecido foi obtida pela inclinação da reta ascendente para cada animal e média para cada grupo.



a)



b)

**Figura 18 – Exemplo de curvas Tensão ( $\text{kN.m}^{-2}$ ) x Deformação Relativa para os animais 3 e 10 do grupo declive. a) curva original; b) curva recortada a partir do valor mínimo de  $10 \text{ kN.m}^{-2}$ .**

#### 4.7.2 Sarcômeros em Série

Após a medida do comprimento do músculo sóleo fixado, a contagem dos sarcômeros e a calibração da RDI foram calculados o comprimento médio do sarcômero ( $l_s$ ), o número de sarcômeros em série ( $N_s$ ) e a densidade ( $\rho$ ) dos sarcômeros para cada animal, sendo:

$$l_s = l_{\text{RDI}} / n_s$$

$$N_s = l_{\text{fibra}} / l_s$$

$$\rho = n_s / l_{\text{RDI}}$$

onde:

$\ell_s$  = comprimento médio dos sarcômeros

$\ell_{RDI}$  = comprimento da região de interesse

$n_s$  = número de sarcômeros na região de interesse

$N_s$  = número de sarcômeros em série

$\ell_{fibra}$  = comprimento da fibra muscular

$\rho$  = densidade

Devido a limitações técnicas não foi possível medir o comprimento de cada fibra muscular. Para determinar o número de sarcômeros em série foi considerada relação entre o comprimento da fibra e o comprimento muscular total, assumindo a razão de 0,69 para o sóleo de ratos proposta por Eng e colaboradores (LIEBER & FRIDEN, 2000; ENG ET AL, 2008).

#### **4.7.3 Titina**

A quantificação da proteína é dada em pixels relativos ao número de pontos pretos da RDI da membrana corada. Foi utilizado um padrão de peso molecular para identificação da miosina e da titina. A seguir a expressão, em pixels, das bandas de cada proteína para cada sujeito foi normalizada pela área de captura da imagem. Calculou-se então a razão entre a expressão da titina e da miosina para os valores brutos e normalizados.

#### **4.8 Tratamento Estatístico**

Utilizou-se estatística descritiva e inferencial para a análise dos dados. Primeiramente foi verificada a normalidade da distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk para todos os dados. Para avaliar a confiabilidade das medidas de comprimento e densidade do sarcômero foi verificado o coeficiente de variação para cada animal e o coeficiente Alpha de Cronbach para as 60 RDI das 12 fibras musculares de cada animal.

Em seguida foram comparados a relação massa do sóleo/ massa corporal total, o comprimento médio dos sarcômeros, a densidade, o número de sarcômeros em série, a tensão passiva máxima, o trabalho mecânico, o coeficiente de elasticidade e a expressão da titina entre os grupos. Foi verificada a homogeneidade das variâncias dos grupos pelo teste de Levene, as diferenças entre os grupos (C, A e D) por meio de múltiplas Análises de Variância de um fator e a identificação específica das diferenças com teste post-hoc de Bonferroni.

Os dados de rigidez da curvas  $\sigma \times \epsilon$  não obedeceram aos critérios de normalidade, sendo aplicada estatística não paramétrica. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para detectar diferenças e, para as comparações dois a dois foi utilizado o teste U de Mann-Whitney.

Ainda, para verificar similaridades dos comportamentos individuais e a confiabilidade da medidas das curvas  $\sigma \times \epsilon$  normalizadas e do trabalho mecânico em cada grupo foi utilizado o Coeficiente de Correlação Intraclasse aliado ao Coeficiente Alpha de Cronbach.

Para análise do ICC foram consideradas correlações fracas, moderadas e fortes, respectivamente:  $ICC < 0,4$ ;  $0,4 \leq ICC < 0,75$  e  $0,75 \leq ICC$  (FLEISS, 1986). Foi utilizado o programa SPSS versão 13.0, com nível de significância  $\leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características gerais

Para questões de caracterização dos grupos, antes da preparação para que fossem retiradas as fibras o músculo sóleo da pata esquerda foi pesado e seu comprimento medido após fixação na barra de poliestireno. A Tabela 3 apresenta as médias, desvios padrão e coeficientes de variação da massa do sóleo, da relação da massa do sóleo com a massa corporal total do animal e do comprimento do músculo para cada grupo.

**Tabela 3 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para a massa do sóleo, a relação massa do sóleo/ massa corporal total e o comprimento muscular.**

Grupo		Massa do sóleo (g)	Massa do sóleo/ massa corporal	Comprimento do músculo (mm)	Comprimento da fibra (mm)
Controle	Média	0,122	0,041	33,0	22,79
	DP	0,016	0,001	1,2	0,86
	CV (%)	13,3	12,0	4,0	4,0
Active	Média	0,139	0,044	31,54	21,76
	DP	0,021	0,002	0,99	0,69
	CV (%)	15,4	4,3	3,0	3,0
Declive	Média	0,145	0,046	32,8	22,65
	DP	0,021	0,004	1,4	0,97
	CV (%)	14,3	9,0	4,0	4,0

Podemos observar variações de 13 a 15% na massa do sóleo, de 4 a 12% na razão massa do sóleo/ massa corporal total de menos de 5% no comprimento da fibra para os três grupos. Os dados foram considerados normais e homogêneos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para massa do sóleo ( $F(2, 11) = 1,557$ ;  $p = 0,263$ ), para relação massa do sóleo/ massa corporal total ( $F(2, 11) = 3,949$ ;  $p = 0,059$ ) e para comprimento muscular ( $F(2, 12) = 1,71$ ;  $p = 0,23$ ), mesmo com médias superiores dos animais que treinaram.

A massa do músculo pode ser indicativo de adaptação muscular, mas também influenciada pelo tamanho do animal. Nesse sentido a razão massa do sóleo/ massa corporal total é mais adequada para ser analisada. Os resultados são semelhantes aos valores apresentados por Goto e colaboradores (2003), em estudo que investigou as características do sóleo de ratos Wistar controle e com suspensão das patas traseiras. Encontraram valores de  $0,45 \pm 0,03$  para o grupo controle, próximo da média dos animais treinados no presente estudo, e de  $0,30 \pm 0,04$  para o grupo experimental (GOTO ET AL., 2003). Parece então que, mesmo sem alterações significativas existe uma diferença entre as médias do presente estudo, indicativa de maior massa nos animais treinados.

Adams e colaboradores (2004) apresentam valores de razão massa sóleo/ massa corporal como indicativo de hipertrofia muscular. Aplicando estímulos elétricos durante alongamento, encurtamento e isometria encontraram aumento da razão para os animais treinados em 11%, 12% e 14%, respectivamente. Esses dados são um forte indício de que as médias encontradas no presente estudo refletem uma tendência a adaptação na massa muscular que possivelmente se confirmaria com maior número de indivíduos.

## 5.2 Características Mecânicas

A Figura 19 mostra o comportamento das curvas  $\sigma \times \epsilon$  para cada animal de cada grupo. Em relação à tensão se observam valores entre 35 e 65  $\text{kN.m}^{-2}$  para os grupos controle (a) e aclone (b) e entre 40 e 80  $\text{kN.m}^{-2}$  para o grupo declive. Em relação à deformação o grupo aclone parece apresentar um comportamento mais uniforme se comparado aos demais.

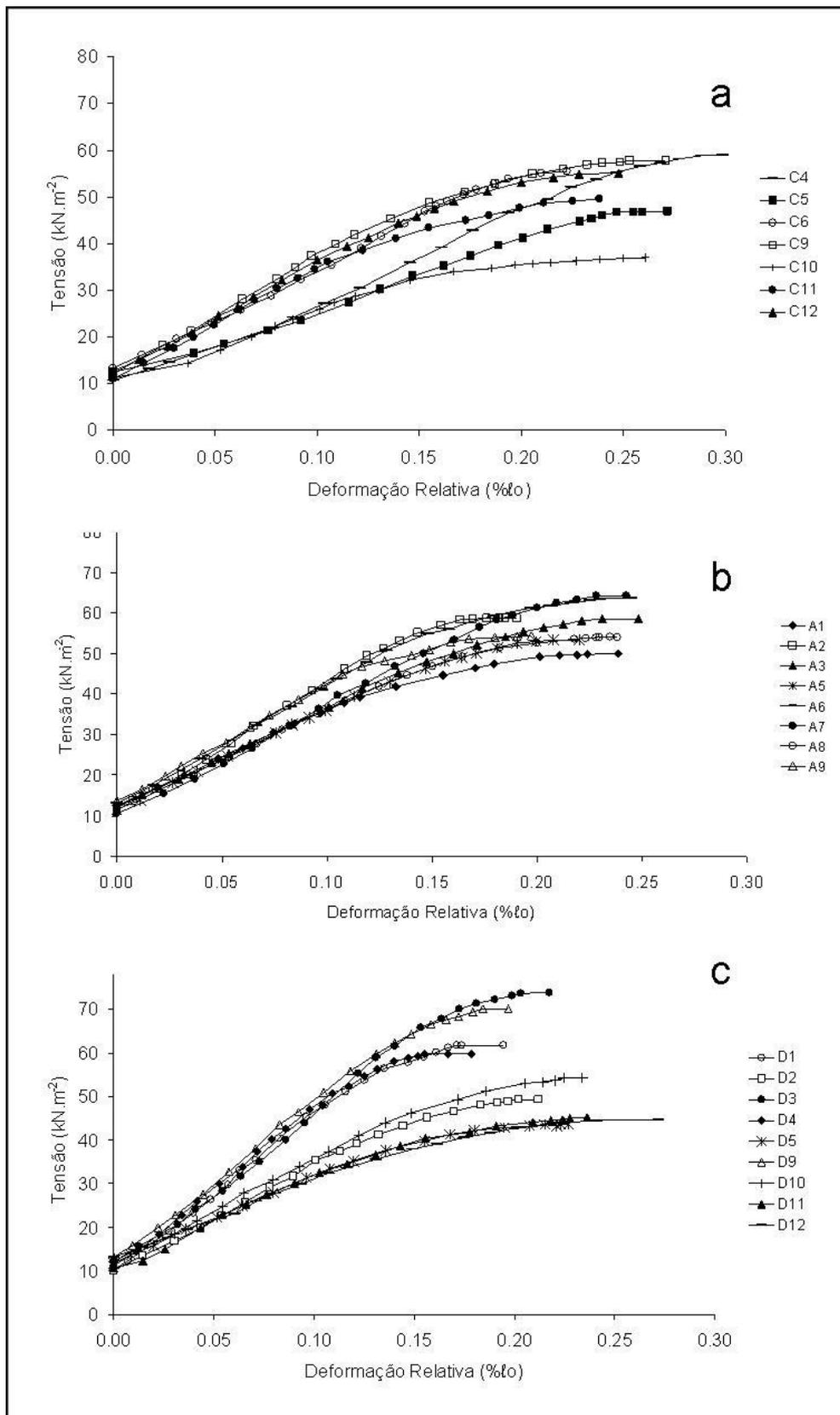
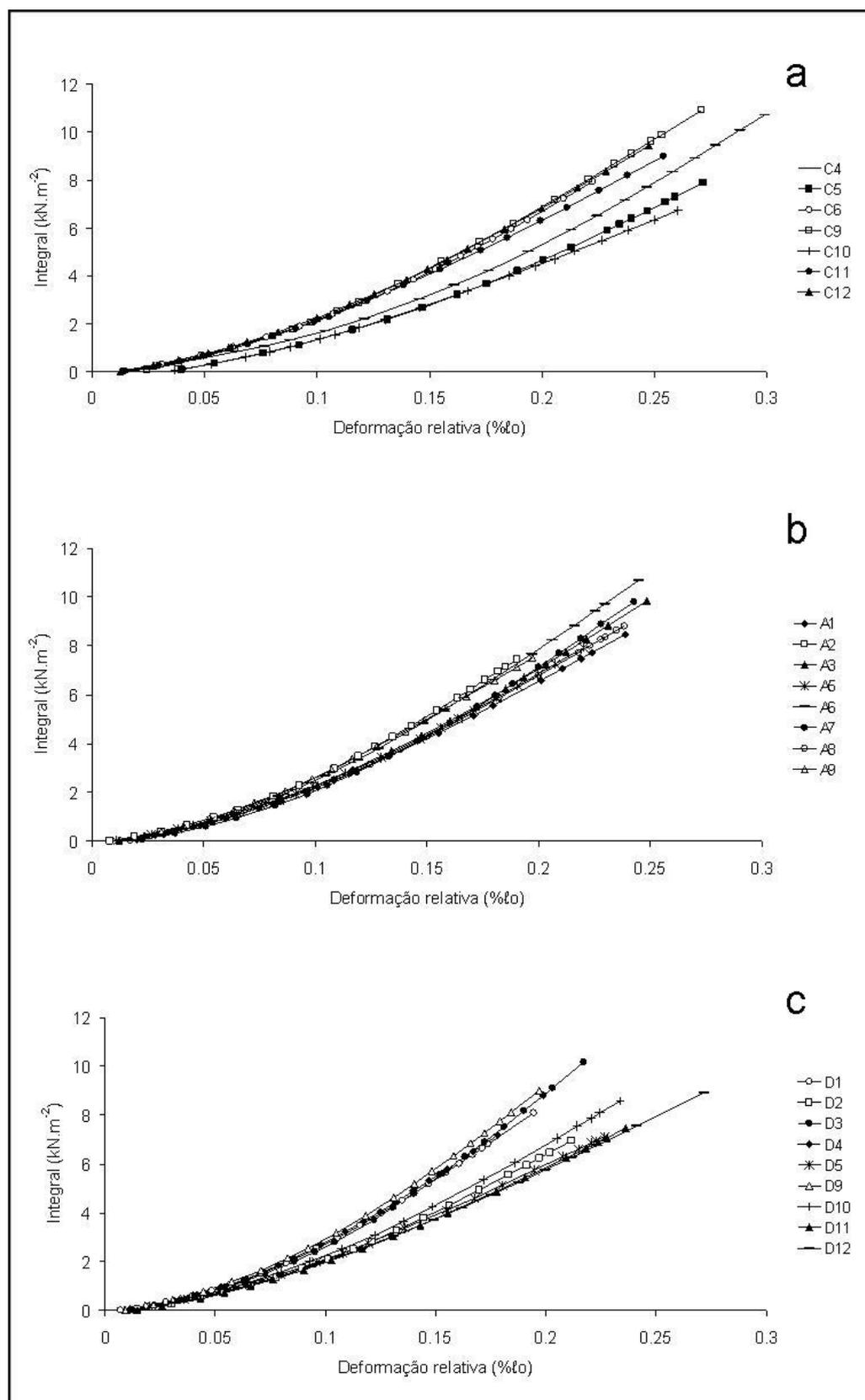


Figura 19 – Curvas  $\sigma \times \epsilon$  a partir do valor mínimo de tensão de  $10 \text{ kN.m}^{-2}$  para cada animal. a) controle; b) active; c) declive.

O comportamento das curvas se assemelha aos resultados encontrados por Muñiz e colaboradores (2001) em ensaios com o sóleo isolado de ratos. Estudos sobre a função passiva feitos com fibras isoladas (Toursel et al., 2002), ou mesmo *in vivo* em humanos (Gajdosik, 2001; Hoang, Herbert & Gandevia, 2007) apresentam curvas muito semelhantes, contudo a diferença nos métodos não permite a comparação dos valores absolutos.

A Figura 20 apresenta as curvas individuais de trabalho para cada grupo, calculadas a partir da integral das curvas apresentadas na Figura 18. Os comportamentos entre os animais para cada grupo são bastante semelhantes.



**Figura 20 – Integral das curvas  $\sigma \times \epsilon$  normalizadas para cada animal. a) controle; b) active; c) declive.**

A Tabela 4 apresenta o ICC para cada variável analisada. O coeficiente Alpha de Cronbach associado ao ICC indica confiabilidade das medidas, com valores próximos a um em todas as variáveis para todos os grupos.

Conforme os pontos de corte do ICC estabelecidos nos métodos, observamos correlação forte apenas na deformação do grupo aclone, resultado que fica evidente ao analisarmos qualitativamente a Figura 20b. As demais correlações apresentadas na Tabela 4 são moderadas, mas significativas ( $p < 0,001$ ), com valores inferiores nas curvas da integral. Parece então que, apesar da discrepância nos valores absolutos das curvas  $\sigma \times \epsilon$ , principalmente para o grupo declive (Figura 19c), o comportamento é bastante semelhante, com valores mais altos de ICC. Já nos resultados da integral, apesar de curvas mais próximas, os comportamentos diferem mais, com valores de ICC mais baixos.

**Tabela 4 – Coeficientes de Correlação Intraclasse (ICC) e Coeficientes Alpha de Cronbach para as variáveis mecânicas por grupo.**

Variável	Grupo	Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC)	Alpha de Cronbach
Tensão (kN.m <sup>-2</sup> )	Controle	0,706 ]0,479; 0,923[ $p < 0,001$	0,979
	Aclone	0,712 ]0,501; 0,913[ $p < 0,001$	0,979
	Declive	0,693 ]0,489; 0,895[ $p < 0,001$	0,977
Deformação Relativa	Controle	0,763 ]0,554; 0,941[ $p < 0,001$	0,984
	Aclone	0,774 ]0,584; 0,963[ $p < 0,001$	0,985
	Declive	0,644 ]0,433; 0,873[ $p < 0,001$	0,972
Integral da Curva $\sigma \times \epsilon$	Controle	0,585 ]0,345; 0,877[ $p < 0,001$	0,966
	Aclone	0,685 ]0,468; 0,903[ $p < 0,001$	0,976
	Declive	0,552 ]0,338; 0,826[ $p < 0,001$	0,959

Ao compararmos qualitativamente os coeficientes entre os grupos, podemos também perceber menores valores no grupo declive, seguido pelo grupo controle, para todas as variáveis. Aparentemente as diferenças individuais no grupo aclone são menos perceptíveis, com maiores valores de ICC para todas as variáveis analisadas.

A Tabela 5 apresenta os valores médios das variáveis mecânicas para cada grupo. O teste de Shapiro-Wilk indicou dados não normais na rigidez ( $p = 0,044$ ). Optou-se então por aplicar estatística não-paramétrica para esta variável.

A análise de variância não encontrou diferenças significativas entre os grupos para tensão passiva ( $F(2, 23) = 0,819$ ;  $p = 0,454$ ) e integral da curva ( $F(2, 23) = 1,188$ ;  $p = 0,324$ ). Contudo a deformação relativa foi diferente ( $F(2, 23) = 6,018$ ;  $p = 0,009$ ) entre os grupos controle e aclone ( $p = 0,05$ ) e controle e declive ( $p = 0,009$ ).

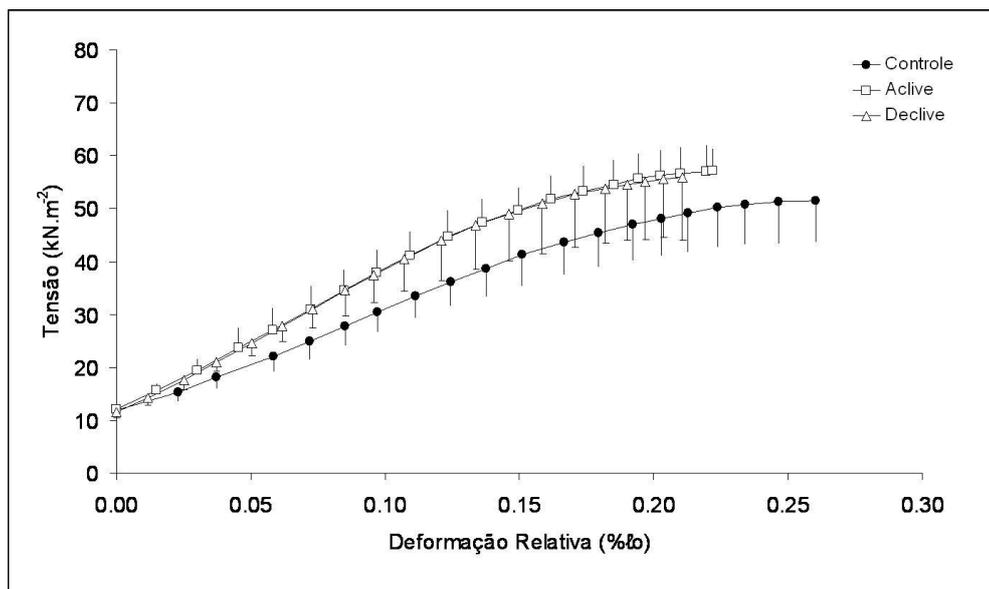
**Tabela 5 – Média e desvio padrão (DP) de tensão passiva, deformação relativa, integral da curva  $\sigma \times \epsilon$  e rigidez para cada grupo.**

Grupo		Tensão (kN.m <sup>-2</sup> )	Deformação Relativa*	Integral da curva (kN.m <sup>-2</sup> )	Rigidez (kN.m <sup>-2</sup> )*
Controle <sup>a</sup>	Média	51,6	0,261	9,2	208
	DP	7,7	0,024	1,6	37
Aclone <sup>b</sup>	Média	57,0	0,228	8,8	268
	DP	5,0	0,023	1,3	35
Declive <sup>b</sup>	Média	56	0,219	8,2	298
	DP	11	0,028	1,1	83

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos nas variáveis assinaladas com "asterisco\*".

Esses resultados parecem demonstrar que os músculos dos animais que não treinaram são menos rígidos e, conseqüentemente alcançam maiores deformações. Muñiz e colaboradores (2001) citam adaptações semelhantes a exercícios em esteira sem inclinação, com maior deformação nos músculos de animais que não treinaram. Contudo, descrevem ainda aumento da tensão passiva em animais treinados (MUÑIZ ET AL., 2001).

A integral da curva, que representa o trabalho, calculada a partir da tensão e da deformação, parece não sofrer influência da deformação – maiores deformações não geram maiores valores de integral; seria lógico deduzir que a tensão passiva dos animais controle é menor, contudo esse resultado se apresenta apenas em valores médios. Possivelmente os altos desvios padrão da tensão e da integral impeçam a determinação de diferenças significativas. A Figura 21 apresenta as curvas médias de  $\sigma \times \epsilon$  com seus respectivos desvios padrão para cada grupo.



**Figura 21 – Curvas  $\sigma \times \epsilon$  médias para cada grupo com desvios padrão dos valores de tensão passiva.**

Em relação à rigidez foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ( $p = 0,032$ ). A análise por pares indicou diferenças significativas na rigidez entre os grupos controle e declive ( $p = 0,049$ ) e controle e aclive ( $p = 0,011$ ).

Gosselin e colaboradores (1998) relatam comportamento oposto, com diminuição da rigidez em ratos velhos treinados em aclive. Contudo essas diferenças não são perceptíveis em animais jovens que apresentam, inclusive, médias superiores de rigidez em animais treinados, mas sem diferenças estatísticas, resultado que corrobora com o presente estudo. Os autores citam que o exercício físico melhora o equilíbrio entre deposição de fibras novas de colágeno e degradação das fibras velhas, diminuindo sua concentração.

A literatura apresenta também investigações sobre o efeito agudo do treinamento excêntrico citando, por exemplo, a diminuição da tensão passiva nos primeiros dias e aumento depois de uma semana, aumento na rigidez depois de 24 horas (Hoang, Herbert e Gandevia, 2007).

Ainda sobre o efeito agudo de uma única sessão de treinamento excêntrico unilateral, Reisman, Allen e Proske (2009) avaliaram a tensão passiva após alongamento. Encontraram diminuição do torque passivo imediatamente após alongamento e aumento ao longo do tempo, contudo com maiores valores de

torque passivo para a perna que havia realizado o treino excêntrico anteriormente. Entretanto são poucos os estudos que investigam as adaptações da força passiva a períodos de treinamento excêntrico mais longo.

### 5.3 Sarcômeros

Para medida do comprimento médio dos sarcômeros e da densidade foram utilizadas 60 imagens de 12 fibras musculares sendo cinco RDI diferentes por fibra para cada animal. A Tabela 6 apresenta médias, desvios padrão e coeficientes de variação do comprimento dos sarcômeros e da densidade para cada animal avaliado.

**Tabela 6 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) do comprimento de sarcômero e da densidade para cada animal.**

Animal	Comprimento de Sarcômero ( $\mu\text{m}$ )			Densidade (sarcômeros/mm)		
	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
C8	3,12	0,16	5,1	3,21	0,17	5,2
C10	3,03	0,13	4,5	3,31	0,15	4,5
C11	3,09	0,12	3,9	3,24	0,13	4,0
C12	3,00	0,10	3,4	3,33	0,11	3,4
A5	2,96	0,14	4,9	3,38	0,16	4,9
A6	2,98	0,02	5,2	3,37	0,18	5,5
A7	3,01	0,11	3,7	3,32	0,12	3,7
A10	3,00	0,16	5,4	3,34	0,19	5,8
D2	2,72	0,10	3,6	3,68	0,13	3,6
D5	2,83	0,12	4,3	3,54	0,15	4,4
D9	2,87	0,14	4,8	3,49	0,17	4,9
D11	2,77	0,16	5,8	3,62	0,22	6,0
D12	2,84	0,10	3,6	3,52	0,13	3,8

Cx = grupo controle; Ax = grupo ativo; Dx = grupo declive

Podem-se observar em relação aos coeficientes de variação que em nenhum caso houve valores maiores de 6%. A confiabilidade das medidas foi confirmada pelo coeficiente Alpha de Cronbach com valor de 0,907 para o comprimento dos sarcômeros e 0,982 para a densidade.

Em relação à média do comprimento do sarcômeros para o grupo controle os valores variam de 3,0 a 3,1; já para o grupo aclave variam de 2,9 a 3,0 e o grupo declive, com valores menores de 2,7 a 2,8. Quanto a densidade, o grupo controle variou de 3,2 a 3,3, o grupo aclave se manteve em 3,3 e o grupo declive, com valores maiores, variou de 3,4 a 3,6. Os dados foram considerados normais e homogêneos.

A Tabela 7 apresenta os valores de comprimento médio dos sarcômeros, densidade e ainda o número de sarcômeros em série, calculado a partir do comprimento médio dos sarcômeros e do comprimento do músculo, para cada grupo.

**Tabela 7 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para comprimento de sarcômero, densidade e número de sarcômeros em série por grupo.**

Grupo		Comprimento do sarcômero ( $\mu\text{m}$ )	Densidade (sarcômeros/mm)	Número de sarcômeros em série (x10)
Controle	Média	3,060	3,275	751
	DP	0,054	0,056	24
	CV (%)	1,8	1,7	3,3
Aclave	Média	2,990	3,353	739
	DP	0,023	0,026	27
	CV (%)	0,8	0,8	3,7
Declive	Média	2,806	3,570	817
	DP	0,059	0,077	51
	CV (%)	2,1	2,2	6,0

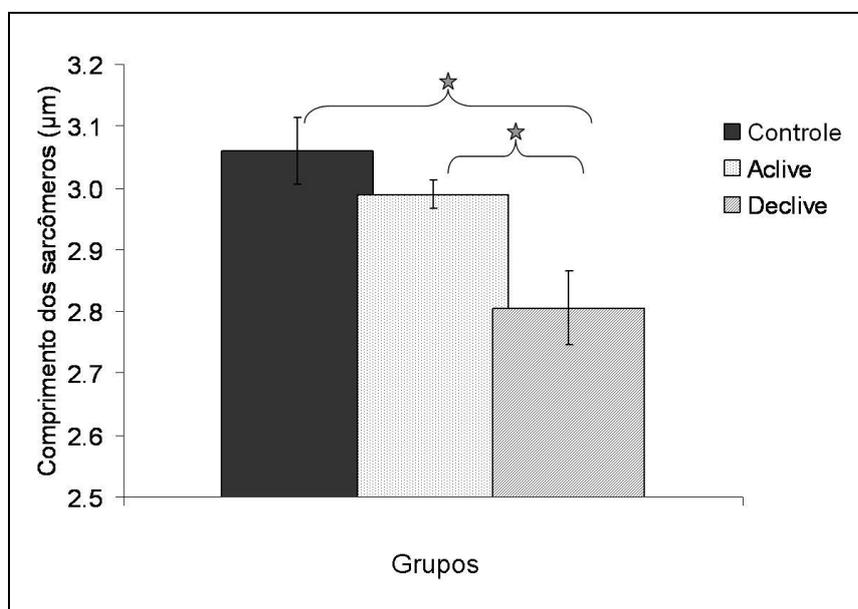
Novamente se observam variações inferiores a 6% em todas as variáveis para todos os grupos. Especialmente no comprimento e na densidade dos sarcômeros a variação não passa de 2,2%. Os dados foram considerados normais e homogêneos.

Os valores médios de comprimento dos sarcômeros foram 3,06, 2,99 e 2,80 para os grupos controle, aclave e declive, respectivamente. Tabary e colaboradores (1976) apresentam comprimento médio do sarcômero de sóleo de gatos de  $2,722 \pm 0,064 \mu\text{m}$ . Kurushin e colaboradores (2009) apresentam comprimentos entre 2,4 e 2,6  $\mu\text{m}$  para sarcômeros do sóleo de ratos Wistar com dois meses de idade. Da mesma forma Hajjar, Même & Léoty (1999) apresentam valores inferiores,

próximos de 2,4  $\mu\text{m}$ , para sarcômeros do semitendinoso de rãs. Já em estudo de Tardieu e colaboradores (1977) o comprimento médio dos sarcômeros de sóleos de coelhos variou de 3,39 até 3,72  $\mu\text{m}$ .

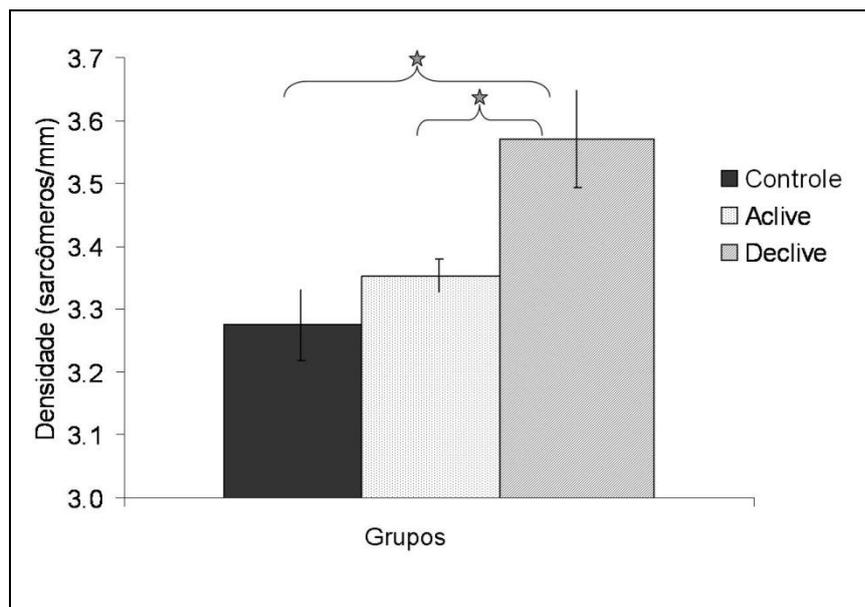
Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para comprimento do sarcômero ( $F(2, 12) = 29,125$ ;  $p < 0,01$ ), densidade ( $F(2, 12) = 30,249$ ;  $p < 0,01$ ) e número de sarcômeros em série ( $F(2, 12) = 5,787$ ;  $p = 0,021$ ).

Observa-se diminuição do comprimento médio de sarcômeros nos animais que treinaram em declive em relação ao controle e ao aclave ( $p < 0,01$ ), sem diferenças entre os dois últimos ( $p = 0,116$ ), conforme a Figura 22.



**Figura 22 – Média e desvio padrão do comprimento de sarcômero por grupo. \*  $p < 0,01$**

A densidade (Figura 23), que representa o número médio de sarcômeros por mm de fibra muscular, indicou diferenças significativas também do grupo declive para o grupo aclave e o grupo controle ( $p < 0,01$ ), com maior quantidade de sarcômeros por mm. Novamente os valores do grupo controle e do grupo declive não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,2$ ).



**Figura 23 – Média e desvio padrão da densidade de sarcômeros por mm de fibra por grupo. \*  $p < 0,01$**

A análise do número de sarcômeros em série está apresentada na Figura 24. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas apenas entre o grupo declive e o grupo ativo ( $p = 0,033$ ), com maior número de sarcômeros em série no grupo declive. Diferentemente das variáveis anteriores, não foram encontradas diferenças entre o grupo declive e o grupo controle ( $p = 0,076$ ), apesar da média superior para o grupo declive.

Considerando as diferenças encontradas na densidade, parece que a média mais alta dos comprimentos das fibras musculares no grupo controle (Tabela 3) influenciou no número de sarcômeros em série não indicando diferenças significativas entre o grupo declive e o grupo controle.

Tardieu e colaboradores (1977) encontraram diminuição do comprimento e aumento do número de sarcômeros em resposta a imobilização de músculos em posição alongada. Koh e Herzog (1998) também citam o mesmo tipo de resposta em músculos com maior excursão. Ambos os estudos justificam essa adaptação pela tentativa de manutenção de um comprimento ótimo de produção de força.

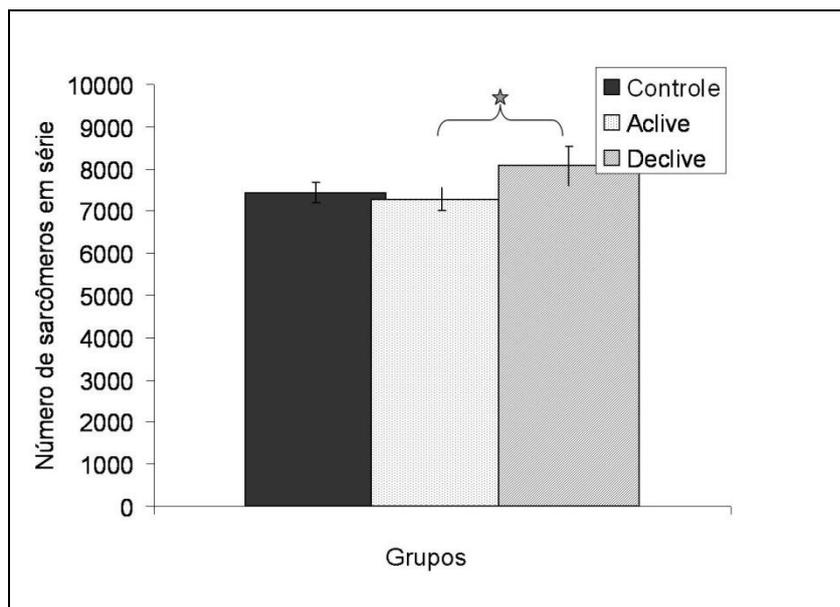
A relação força X comprimento determina então um intervalo de comprimento de sarcômero onde o platô é atingido, sendo este aceito como o comprimento ótimo de produção de força (GORDON, HUXLEY & JULIAN, 1966).

Assim, o comprimento ótimo de produção de força de uma fibra muscular ou de um músculo seria o comprimento onde há maior quantidade possível de pontes cruzadas estabelecidas por sarcômero. Para manter o comprimento ótimo de produção de força em músculos alongados ou com maior excursão (variação de comprimento) a adição de sarcômeros em série é a estratégia adotada (TARDIEU ET AL., 1977; KOH & HERZOG, 1998).

Herzog e colaboradores (1991) encontraram o deslocamento da curva torque X ângulo do músculo reto femoral em ciclistas e corredores. Os corredores que atuam com o reto femoral mais alongado apresentaram maior capacidade de produção de torque com o músculo em maiores comprimentos. Já os ciclistas que atuam com o reto femoral mais encurtado deslocavam a curva torque X ângulo para comprimentos menores. Segundo os autores essa seria uma resposta funcional a adaptações estruturais no comprimento dos sarcômeros.

A mesma adaptação é citada também em estudos sobre efeito do treinamento excêntrico. Com a utilização do modelo aclone X declive e as mesmas inclinações do presente estudo Lynn e Morgan encontraram resultados semelhantes com aumento do número de sarcômeros em série no grupo declive em relação ao aclone, e sem diferenças entre aclone e controle para o músculo vasto intermédio (LYNN & MORGAN, 1994; LYNN, TALBOT & MORGAN, 1998). Esses estudos estão de acordo com a hipótese de adaptação no número de sarcômeros em série em resposta ao treinamento excêntrico.

Parece, contudo, que o estímulo do treinamento excêntrico difere do estímulo de maiores amplitudes de movimento. Lynn e Morgan (1994) explicam que durante contrações excêntricas a diminuição da sobreposição de actina e miosina nos sarcômeros acaba tensionando sarcômeros vizinhos e, conseqüentemente, os túbulos transversos e o retículo sarcoplasmático. Essa tensão é responsável por destruir as membranas e liberar cálcio no retículo sarcoplasmático. Por isso o aumento do número de sarcômeros em série é uma resposta mais evidente no treinamento excêntrico, como fator de proteção e prevenção de novas rupturas, não necessariamente para a manutenção do comprimento ótimo de produção de força.



**Figura 24 – Média e desvio padrão do número de sarcômeros em série por grupo. \* p = 0,033**

Fibras musculares isoladas mantidas em ambiente de cultura a 80% e 105% do comprimento inicial de produção de tensão parecem também responder de maneiras diferentes. As fibras mantidas a 80% não apresentaram modificações no número de sarcômeros em série, mas aumentaram a força em tetania, principalmente no comprimento em que foram mantidas. Os autores especulam que talvez proteínas como a titina e a reorganização das fibras de colágeno extracelulares possam ser responsáveis por esse comportamento (JASPERS ET AL., 2004). Já em fibras mantidas a maiores comprimentos foi encontrado aumento do número de sarcômeros em série depois da segunda semana em cultura apenas em alguns exemplares, aliado ao aumento no tempo até o relaxamento. Esse comportamento indica adaptação seletiva de fibras rápidas. Contrações excêntricas *in vivo* – em alongamento – parecem promover aumento de células satélite e suas ligações com a fibra muscular. Contudo no estudo apresentado, como as fibras são isoladas, uma das explicações para a não adaptação das fibras lentas poderia estar na dificuldade de sinalização mecânica das células satélite no endomísio.

Butterfield, Leonard e Herzog também utilizaram modelo de treinamento aclive X declive para avaliar o número de sarcômeros em série dos músculos vasto lateral (VL) e vasto intermédio (VI) de ratos. Depois de cinco dias de treinamento não encontraram diferenças significativas entre os grupos controle, aclive e declive.

Depois de dez dias de treinamento, no entanto, relatam diminuição do número de sarcômeros em série no grupo aclave para VI e VL e aumento no grupo declive apenas para VI (BUTTERFIELD, LEONARD & HERZOG, 2005).

Em contrapartida, Koh e Herzog encontraram resultados controversos utilizando contrações excêntricas eletricamente estimuladas em coelhos. Realizaram treinamentos de 50 contrações, duas vezes por semana durante 12 semanas. Não encontraram aumento no número de sarcômeros em série no extensor longo dos dedos e em fascículos profundos do tibial anterior. Apenas um aumento de 3% foi encontrado em fascículos superficiais do tibial anterior (KOH & HERZOG, 1998). Contudo, diferenças metodológicas como período e protocolo de treinamento, bem como a utilização do membro contra-lateral como controle, podem ter influenciado diferenças nos resultados.

#### **5.4 Titina**

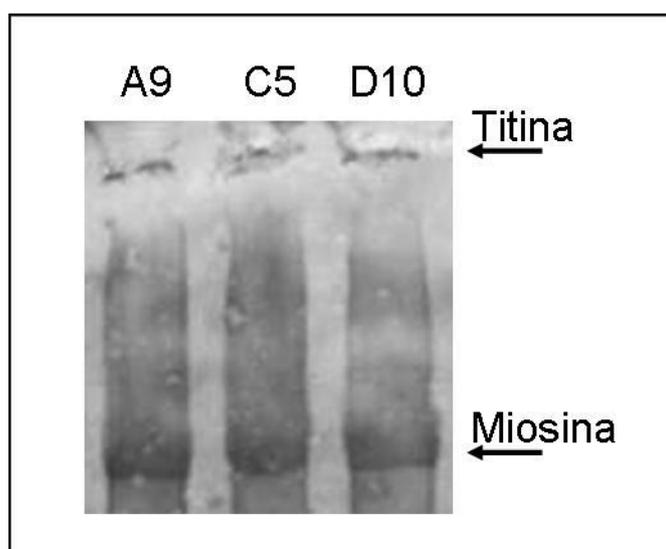
A Tabela 8 apresenta os valores brutos e normalizados da expressão da titina e da razão titina/miosina por grupo. Observamos que os valores normalizados apresentam, aparentemente, melhor qualidade com menores coeficientes de variação.

Toursel e colaboradores (2002) investigaram a titina de fibras isoladas do músculo sóleo de ratos Wistar após suspensão das patas traseiras. Encontraram valores inferiores da razão titina/miosina, entre 0,2 e 0,3. Contudo, utilizaram gel gradiente de 2-12%, o que pode ter permitido melhor empilhamento dos fragmentos de titina. No presente estudo foram utilizadas concentrações de 4% e 10% para gel de entrada e separação, respectivamente, o que talvez explique as diferenças dos valores.

**Tabela 8 – Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos dados brutos e normalizados da expressão da titina e da razão titina/miosina por grupo.**

Grupo		Expressão da titina em Megapixels	Razão titina/miosina	Expressão da titina normalizada (x100)	Razão titina/miosina normalizada
Controle	Média	23,3	0,46	451	0,88
	DP	6,2	0,07	6,5	0,03
	CV (%)	26,4	16,0	1,4	3,1
Active	Média	25,6	0,62	455	0,89
	DP	8,4	0,28	17	0,03
	CV (%)	32,9	45,0	3,8	3,6
Declive	Média	21,7	0,38	452	0,87
	DP	6,6	0,06	13	0,03
	CV (%)	30,4	17,0	2,9	3,3

Não foram encontradas diferenças significativas para a expressão da titina ( $F(2,14) = 0,387$ ;  $p = 0,687$ ), para a razão titina/miosina ( $F(2,14) = 2,505$ ;  $p = 0,123$ ), para a expressão da titina normalizada ( $F(2,14) = 0,170$ ;  $p = 0,846$ ) e para a razão titina/miosina ( $F(2,14) = 0,917$ ;  $p = 0,426$ ). A Figura 25 apresenta um recorte da membrana corada e fotografada, utilizada para quantificação das bandas de titina e miosina.



**Figura 25 – Imagem corada com Red Ponceau e fotografada para a quantificação das bandas de titina e miosina. Ratos A9, C5 e D10.**

Estes resultados corroboram com o estudo de Kyröläinen e colaboradores (2005). Os autores investigaram o efeito de treinos de potência na força e na composição dos músculos. Encontraram adaptação na inclinação das curvas de força, ou seja, os indivíduos alcançavam a força máxima em menos tempo, mas não houve diferenças significativas na expressão da titina em resposta ao treinamento.

Toursel e colaboradores (2002) destacam diminuição na razão titina/miosina em animais com suspensão das patas traseiras. Já Goto e colaboradores (2003), em estudo semelhante não encontraram adaptações da titina a três dias de suspensão das patas traseiras. Seus resultados, entretanto, demonstram aumento da expressão da  $\beta$ -conectina (titina) após três dias de remobilização das patas traseiras.

### **5.5 Adaptações estruturais e funcionais: considerações**

O objetivo desta investigação foi descrever e comparar os efeitos do treinamento em aclive ou em declive no músculo sóleo de ratos. As hipóteses relacionadas ao aumento da tensão passiva e do trabalho em animais treinados não se confirmaram. Houve diferenças na rigidez do músculo sóleo entre o grupo controle e os grupos experimentais. Contudo, observaram-se desvios padrão superiores aos artigos de referência utilizados no cálculo amostral para os dados de tensão, ou seja, a grande variabilidade pode ter impedido a identificação de diferenças significativas.

Para verificar a influência do número de indivíduos no resultado utilizamos valores de tensão obtidos nesse estudo para a realização de um novo cálculo amostral. Os dados de entrada no software WinPepi foram: poder observado de 80%, índice de significância de 5%, diferença mínima esperada entre os grupos de 10% da média dos três grupos e os desvios padrão dos grupos testados. O número sugerido foi de 22 indivíduos para cada grupo, superior ao valor encontrado com os

mesmos dados de entrada e valores de referência da literatura (MUÑIZ ET AL., 2001). Possivelmente a variabilidade dos dados do presente estudo se deve às técnicas de avaliação e mensuração utilizadas. Estudos com menor variabilidade dos dados são realizados com os músculos ainda inseridos ou fibras isoladas e o auxílio de micromanipuladores que permitem fixação mais precisa das estruturas.

Em relação à estrutura da fibra muscular o número de sarcômeros em série foi maior e o comprimento médio dos sarcômeros menor em resposta ao treinamento em declive, possivelmente como fator de proteção ao treinamento excêntrico. A análise bioquímica da titina não indicou adaptações na expressão da proteína nem na razão titina/miosina em resposta ao treinamento.

Parece então não haver uma relação clara entre as adaptações estruturais da titina e funcionais da tensão passiva neste estudo. Deve-se entender, no entanto, que as adaptações estruturais são dependentes de características específicas de cada tecido, além de fatores individuais como a genética (TOIGO & BOUTELLIER, 2006). Assim, segundo Toigo & Boutellier (2006), adaptações estruturais não significam necessariamente melhor desempenho; a habilidade em uma tarefa é distinta da habilidade de adaptação dos tecidos.

Ademais, Tabary e colaboradores (1976) avaliando curvas de tensão ativa X comprimento fazem uma crítica a estudos com músculos isolados. Segundo os autores possivelmente existam adaptações em amplitudes fisiológicas de movimento do músculo em questão, contudo quando o músculo é retirado ele passa a atuar, tanto de forma ativa quanto de forma passiva, em comprimentos não fisiológicos, o que pode interferir nos resultados.

Especificamente em relação à adaptação mecânica sem a adaptação da titina, a proteína elástica dos sarcômeros, Herzog e colaboradores (1991) comentam que no músculo a força passiva pode ser influenciada por tecidos extracelulares como as estruturas músculo-tendíneas, as quais possivelmente adaptaram às diferentes demandas funcionais impostas, mas não foram investigadas neste estudo.

Existem ainda algumas críticas sobre a utilização do modelo do duplo pêndulo invertido em quadrúpedes. Segundo Griffin e colaboradores (2004) esse mecanismo não está muito bem esclarecido, pois, aparentemente, as energias não

variam como nos bípedes e, por contar com quatro apoios e não somente dois, há maior oscilação do centro de massa durante a locomoção em quadrúpedes.

Lee et al. (2008) comentam a possibilidade de contatos simultâneos e assimetrias de membros individuais durante a locomoção, podendo não ser o duplo pêndulo a análise mais fidedigna. Aparentemente as patas dianteiras têm função de gerar movimento (trabalho positivo) e as patas traseiras de absorver energia (trabalho negativo). Assim, as patas dianteiras contribuem para o trabalho total positivo em aclave e as patas traseiras para o trabalho total negativo em declive. O punho não realiza trabalho, enquanto o tornozelo faz trabalho negativo em declive e positivo em aclave.

A sobrecarga muscular e articular parece também não ser a mesma. Gregor ET AL. (2001), por exemplo, observaram que o músculo sóleo atua com mais força na movimentação do tornozelo em declive, enquanto que em aclave o músculo gastrocnêmio aumenta sua força e o sóleo diminuiu. Além disso, a absorção da energia ocorre pelas articulações distais no plano e em aclave, e pelas proximais em declive – as metacarpofalangianas e as metatarsofalangianas desempenham maior trabalho negativo em aclave, e não desempenham trabalho em declive, pois sua capacidade de dissipar energia parece ser reduzida pela diminuição dos momentos articulares em declive (LEE ET AL., 2008).

Temos então estudos que encontram resultados estruturais semelhantes com a utilização da locomoção em aclave e declive (Lynn & Morgan, 1994; Lynn, Talbot & Morgan, 1998; Butterfield, Herzog & Leonard, 2005) e resultados controversos apresentados por Koh e Herzog (1998) com a utilização de contrações puramente excêntricas. Temos ainda estudos que utilizam o modelo aclave X declive como estímulo concêntrico ou excêntrico (Lynn & Morgan, 1994; Lynn, Talbot & Morgan, 1998; Butterfield, Herzog & Leonard, 2005) e temos estudos que questionam a relação entre o duplo pêndulo invertido e o trabalho positivo (concêntrico) e negativo (excêntrico) em quadrúpedes (GREGOR ET AL., 2001; GRIFFIN ET AL., 2004; LEE ET AL., 2008)

Ou seja, parece que as diferenças individuais e nos métodos de pesquisa podem ter influenciado nos resultados deste estudo tanto quanto influenciam os resultados conflitantes que a literatura disponibiliza.

## 6 CONCLUSÃO

O objetivo desta investigação foi descrever e comparar características mecânicas e histológicas do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento em aclave ou declive.

Concluimos que o treinamento causa adaptações na rigidez muscular, aumentada para o grupo aclave e o grupo declive, no maior número de sarcômeros em série e menor comprimento médio de sarcômeros para os animais que treinaram em declive.

Não foram encontradas diferenças significativas na tensão passiva, possivelmente influenciada por um número amostral insuficiente, no trabalho, na expressão da titina e na razão titina/miosina entre os grupos. A não adaptação da titina aliada ao aumento da rigidez do tecido pode indicar aumento de outras estruturas passivas não avaliadas neste estudo. Com o intuito de avaliar se a variabilidade dos resultados é consequência dos métodos ou do número de indivíduos, sugere-se a análise das variáveis mecânicas com “n” maior. Considerando ainda as dúvidas que permanecem quanto a utilização do modelo aclave X declive em quadrúpedes como estímulo concêntrico e excêntrico, respectivamente, investigações semelhantes ao presente estudo, mas com a avaliação e comparação das patas traseiras e dianteiras permitiria elucidar a aplicabilidade desse método.

## REFERÊNCIAS

1. ABBOTT BC; AUBERT XM. The force exerted by active striated muscle during and after change of length. **J Physiol** 117:77-86, 1952.
2. ADAMS GR; CHENG DC; HADDAD F; BALDWIN KM. Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. **J Appl Physiol** 96: 1613–1618, 2004.
3. ALBERTS B; JOHNSON A; LEWIS J; RAFF M; ROBERTS K; WALTER P. **Molecular and Biology of THE CELL**. Garden Science, 2002.
4. ALEXANDER RM. Optimum muscle design for oscillatory movement. **J Theor Biol** 184:253-259, 1997.
5. ALEXANDER RM. Tendon elasticity and muscle function. **Comp Biochem Physiol** 133:1001-1011, 2002.
6. ANDERSON J; JOUMAA V; STEVENS L; NEAGOE C; LI Z; MOUNIER Y ET AL. Passive stiffness changes in soleus muscle from desmin knockout mice are not due to titin modifications. **Eur J Physiol** 444:771-776, 2002.
7. BIEWENER AS. Patterns of mechanical energy change in tetrapod gait: pendula, springs and work. **J Experim Zool** 899-911, 2006.
8. BORG TK; CAULFIELD JB. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. **Tissue cell** 12: 197-207, 1980.
9. BROMAN H; DE LUCA CJ; MAMBRITO B. Motor unit recruitment and firing rates interaction in the control of human muscles. **Brain Res** 337:311-319, 1985.
10. BUTTERFIELD TA; LEONARD TR; HERZOG W. Differential serial sarcomere number adaptations in knee extensor muscles of rats is contraction type dependent. **J Appl Physiol** 99:1352-1358, 2005.
11. BUTTERFIELD TA; HERZOG W. Is the force-length relationship a useful indicator of contractile element damage following eccentric exercise? **J Biomech** 38: 1932-1937, 2005.
12. CAIOZZO VJ; PERRINE JJ; EDGERTON R. Training-induced alterations of the in vivo force-relationship of human muscle. **J Appl Physiol** 51(3): 750-754, 1981.
13. CAMPBELL DT; STANLEY JC. **Delineamentos experimentais e quase-experimentais de pesquisa**. São Paulo: EPU: Ed. Universidade de São Paulo, 1979.
14. CAVAGNA GA; SAIBENE FP; MARGARIA R. External work in walking. **J Appl Physiol** 18:1-9, 1963.

15. CAVAGNA GA; MARGARIA R. Mechanics of walking. **J Appl Physiol** 21(1):271-278, 1966.
16. CAVAGNA GA; DUSMAN B; MARGARIA R. Positive work done by a previously stretched muscle. **J Appl Physiol** 24(1):21-32, 1968.
17. CAVAGNA GA; HEGLUND NC; TAYLOR CR. Mechanical work in terrestrial locomotion: two basic mechanisms for minimizing energy expenditure. **Am J Physiol** 233:243-261, 1977.
18. CHENG W; RUELL PA; GHODDUSI M; KEE A; HARDEMAN EC; HOFFMANN KM ET AL. Ultrastructural changes and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> regulation in red vastus muscle following eccentric exercise in rat. **Exp Physiol** 92.2: 437-447, 2007.
19. DE LUCA CJ; ERIM Z. Common drive of motor units in regulation of muscle force. **Trends in Neurosciences** 17(7):299-305, 1994.
20. DALEY MA; BIEWENER AA. Muscle force-length dynamics during level versus incline locomotion: a comparison of in vivo performance of two guinea fowl ankle extensors. **J Exp Bio** 206:2941-2958, 2003.
21. DI COLA E; WAIGH TA; TRINICK J; TSKHOVREBOVA L; HOUMEIDA A; PYCKHOUT-HINTZEN W ET AL.. Persistence length of titin from rabbit skeletal muscles measured with scattering and microrheology techniques. **Bioph J** 88:4095-4106, 2005.
22. EDMAN KAP; ELZINGA G; NOBLE MIM. Enhancement of mechanical performance by stretch during tetanic contractions of vertebrate skeletal muscle fibres. **J Physiol** 281:139-155, 1978.
23. EDMAN KAP; ELZINGA G; NOBLE MIM. Residual force enhancement after stretch of contracting frog single muscle fibers. **J Gen Physiol** 80:769-784, 1982.
24. ENG CM; SMALLWOOD LH; RAINIERO MP; LAHEY M; WARD SR; LIEBER RL. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. **J Exp Bio** 211: 2336-2345, 2008.
25. FENN WO. A quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius muscle of the frog. **J Physiol** 58: 175-203, 1923.
26. FLEISS RL. **The design and analysis of clinical experiments**. New York: John Wiley and Sons, 1986.
27. GAJDOSIK RL. Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. **Clin Biomech** 16:87-101, 2001.
28. GLEESON N; ESTON R; MARGINSON V; MCHUGH M. Effects of prior concentric training on eccentric exercise induced muscle damage. **Br J Sports Med** 37:119-125, 2003.

29. GORDON AM; HUXLEY AF; JULIAN FJ. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. **J Physiol** 184:170-192, 1966.
30. GOSSELIN LE; ADAMS C; COTTER TA; MCCORMICK RJ; THOMAS DP. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix. **J Appl Physiol** 98:1011-1016, 1998.
31. GOTO K; OKUYAMA R; HONDA M; UCHIDA H; AKEMA T; OHIRA Y; YOSHIOKA T. Profiles of connectin (titin) in atrophied soleus muscle induced by unloading of rats. **J Appl Physiol** 94:897-902, 2003.
32. GRANZIER HLM; WANG K. Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver staining of titin and nebulin from single muscle fiber segment. **Electroph** 14: 56-64, 1993.
33. GRANZIER HLM; AKSTER HA; TER KEURS HED. Effect of thin filament length on the force-sarcomere length relation of skeletal muscle. **Am J Physiol** 260: C1060-C1070, 1991.
34. GRANZIER HLM; WANG K. Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles: the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. **Biophys J** 65: 2141-2159, 1993.
35. GRANZIER HLM; LABEIT S. The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring. **Exerc Sport Sci Rev** 34(2): 50-53, 2006.
36. GREGOR RJ; SMITH JL; SMITH DW; OLIVER A; PRILUTSKY BI. Hindlimb Kinetics and Neural Control During Slope Walking in the Cat: Unexpected Findings. **J Appl Biomech** 17: 277-286, 2001.
37. GRIFFIN TM; MAIN RP; FARLEY CT. Biomechanics of quadrupedal walking: how do four-legged animals achieve inverted pendulum-like movements? **J Experim Biol** 207:3545-3558, 2004.
38. HAJJAR M; MEME W; LEOTY C. Measurement of sarcomere length during fast contraction of muscle fibers by digital image analysis. **J Biomech** 32(7): 737-742, 1999.
39. HEGLUND NC; FEDAK MA; TAYLOR CR; Cavagna GA. Total mechanical energy changes as a function of speed and body size in birds and mammals. In.: Energetics and mechanics of terrestrial locomotion. **J Exp Biol** 97:57-66, 1982.
40. HERBERT RD; MOSELEY AM; BUTLER JE; GANDEVIA SC. Change in length of relaxed muscle fascicles and tendons with knee and ankle movement in humans. **J Physiol** 539(2):637-645, 2002.
41. HERZOG W; TER KEURS HEDJ. Force-length relation of in-vivo human rectus femoris muscles. **Eur J Physiol** 411:642-647, 1988.
42. HERZOG W; LEONARD TR; RENAUD JM; WALLANCE J; CHAKI G; BORNEMISZA S. Force-length properties and functional demands of cat gastrocnemius, soelus and plantaris muscle. **J Biomech** 25: 1329-1335, 1992.

43. HERZOG W; GUMARÃES ACS; ANTON MG; CARTER-ERDMAN KA. Moment-length relations of rectus femoris muscles of speed skaters/cyclists and runners. **Med Sci Sport Exerc** 23(11): 1289-1296, 1991.
44. HERZOG W; LEONARD TR. The history dependence of force production in mammalian skeletal muscle following stretch-shortening and shortening-stretch cycles. **J Biomech** 33:532-542, 2000.
45. HERZOG W; LEONARD TR; WU JZ. The relationship between force depression following shortening and mechanical work in skeletal muscle. **J Biomech** 33(6): 659-668, 2000.
46. HERZOG W; LEONARD TR. Force enhancement following stretching of skeletal muscle: a new mechanism. **J Exp Biol** 205: 1275-1283, 2002.
47. HILL AV. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. **Proc Royal Soc** 126(B): 136-195, 1938.
48. HOANG PD; HERBERT RD; GANDEVIA SC. Effects of Eccentric Exercise on Passive Mechanical Properties of Human Gastrocnemius in vivo. **Med Sci Sports Exerc** 39(5): 849-857, 2007.
49. HOROWITS, R., KEMPNER, E.S., BISHER, M.E., PODOLSKY, R.J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. **Nature** 323:160-164, 1986.
50. HOWARD, P. **Estereology**, Leeds: Wiley-Sons, 1999.
51. HUXLEY HE. Electron microscope studies of the organization of the filaments in striated muscle. **Biochimica et Biophysica Acta** 12, 387-394, 1953.
52. HUXLEY AF; NIEDERGERKE R. Structural changes in muscle during contraction. **Nature** 173:971-973, 1954.
53. HUXLEY H; HANSON J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. **Nature** 173:973-976, 1954.
54. HUXLEY, A.F. Muscle structure and theories of contraction. **Prog Biophysic Chem**, 7:255-318, 1957.
55. HUXLEY AF; SIMMONS RM. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. **Nature** 233: 533-538, 1971.
56. HUXLEY AF. Cross-bridge action: present views, prospects and unknowns. **J Biomech** 33:1189-1195; 2000.
57. IWAZUMI T. **A new field theory of muscle contraction**. In: Crossbridge Mechanism in Muscle Contraction. University of Tokyo Press, Tokyo, 611-632, 1979.

58. JASPERS RT; FEENSTRA HM; VERHEYEN AK; VAN DER LAARSE WJ; HUIJING PA. Effects of strain on contractile force and number of sarcomeres in series of *Xenopus leavis* single muscle fibres during long-term culture. **J Musc Res Cell Motil** 25: 285-296, 2004.
59. JOUMAA V; RASSIER DE; LEONARD TR; HERZOG W. Passive force enhancement in single myofibrils. **Eur J Physiol** 455: 367-371, 2007.
60. KAWAI M; BRANDT PW. **Federation Proc.** 32: 374A, 1973.
61. KOH TJ; HERZOG W. Eccentric training does not increase sarcomere number in rabbit dorsiflexor muscles. **J Biomech** 31: 499-501, 1998.
62. KOH TJ; HERZOG W. Excursion is important in regulating sarcomere number in the growing rabbit tibialis anterior. **J Physiol** 508(1): 267-280, 1998.
63. KRONBAUER GA; MELO MO; ILHA J; HIRAKATA LM; SHINKAI RSA; LOSS JF ET AL. Intensidade de treinamento em inclinações e avaliação da tensão passiva do sóleo de ratos. **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Biomecânica**. São Paulo, SP. 29/07 a 01/08, 2009.
64. KULIG K; ANDREWS JG HAY JG. **Human strength curves**. In: Exercise and Sports Sciences Reviews. The Collamore Press, Lexington, 417-466, 1984.
65. KURUSHIN VA; PONOMAREVA EV; OGNEVA IV; LIPESTS EN; SHENKMAN BS. Quantitative Evaluation of the Relationship between  $Ca^{2+}$  Sensitivity and Sarcomere Length in Rat Soleus after 14-Day Hindlimb Suspension. **Doklady Biological Sciences**, 424: 29–31, 2009.
66. KYRÖLÄINEN H; AVELA J; MCBRIDE MJ; KOSKINEN S; ANDERSEN JL; SIPILA S ET AL. Effects of power training on muscle structure and neuromuscular performance. **J Med Sci Sports** 15: 58-64, 2005.
67. LABEIT D; WATANABE K; WITT C; FUJITA H; WU Y; LAHMERS S ET AL.. Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. **Proc Nat Acad Sci USA** 100, 13716–13721, 2003.
68. LEE H-D; HERZOG W. Force enhancement following muscle stretch of electrically stimulated and voluntary activated human adductor pollicis. **J Physiol** 545:321-330, 2002.
69. LEE H-D; HERZOG W; LEONARD T. Effects of cyclic changes in muscle length on force production in in-situ cat soleus. **J Biomech** 34: 979-987, 2001.
70. LEE E-J; JOUMAA V; HERZOG W. New insights into the passive force enhancement in skeletal muscles. **J Biomech** 40: 719-727, 2007.
71. LEE DV; MCGUIGAN P; YOO EH; BIEWENER AA. Compliance, actuation, and work characteristics of the goat foreleg and hindleg during level, uphill, and downhill running. **J Appl Physiol** 104:130–141, 2008.

72. LIEBER RL; FRIDÉN J. Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. **Muscle & Nerve** 23: 1647-1666, 2000.
73. LINKE WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. **Cardio Res** 77: 637-648, 2008.
74. LINKE WA; IVEMEYER M; MUNDEL P; STOCKMEIER MR; KOLMERER B. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. **Biophysics** 95:8052-8057, 1998.
75. LYNN R; MORGAN DL. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers that does incline running. **J Appl Physiol** 77:1439-1444, 1994.
76. LYNN R; TALBOT JA; MORGAN DL. Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. **J Appl Physiol** 85(1): 98–104, 1998.
77. MACINTOSH BR; MACNAUGHTON MB. The length-dependence of muscle active force: considerations for parallel elastic properties. **J Appl Physiol** 98:1666-1673, 2005.
78. MAGANARIS CN. Force-length characteristics of in vivo human skeletal muscle. **Acta Physiol Scand** 172: 279-285, 2001.
79. MARGARIA R. Positive and Negative Work Performances and Their Efficiencies in Human Locomotion. **Int Z angew Physiol einschli Arbeitsphysiol** 25:339-351, 1968.
80. MARUYAMA K; MATSUBARA S; NATORI R; NONOMURA Y; KIMURA S; OHASHI K ET AL. Connectin, an elastic protein of muscle: characterization and function. **J Biomech** 82: 317-337, 1977.
81. MARUYAMA K; MURAKAMI F; OHASHI K. Connectin, an elastic protein: Comparative Biochemistry. **J Biomech** 82: 337-345, 1977.
82. MARUYAMA K; KIMURA S; KURODA M; HANDA S. Connectin, an elastic protein: its abundance in cardiac myofibrils. **J Biomech** 82: 347-350, 1977.
83. MELO RM; MARTINHO JR. E; MICHELINI LC. Training-induced pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension** 42: 851-857, 2003.
84. MINAJEVA A; KULKE M; FERNANDEZ JM; LINKE WA. Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils. **Biophys J** 80: 1442-1451, 2001.
85. MINETTI AE; ARDIGÒ LP; SAIBENE F. Mechanical determinants of gradient walking energetics in man. **J Physiol** 472: 725-735, 1993.

86. MUÑIZ J; DEL RIO J; HUERTA M; MARTIN JL. 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.
87. MUTUNGI G. The effects of inorganic phosphate and arsenate on both passive muscle visco-elasticity and maximum Ca<sup>2+</sup> activated tension in chemically skinned rat fast and slow twitch muscle fibres. **J Musc Res Cell Motil** 24:65-75, 2003.
88. MUTUNGI G; TRINICK J; RANATUNGA KW. Resting tension characteristics in differentiating intact rat fast- and slow-twitch muscle fibres. **J Appl Physiol** 95: 2241-2247, 2003.
89. NAGY A; GRAMA L; HUBER T; BIANCO P; TROMBITAS K; GRANZIER HL; KELLERMAYER MS. Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal muscle titin. **Biophysics** 89(1):329-336, 2005.
90. NATORI R. The role of myofibrils, sarcoplasm and sarcolemma. **Jikeikai Med J** 1: 18-28, 1954.
91. NEAGOE C; OPITZ CA; MAKARENKO I e LINKE WA. Giant variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. **J Musc Res Cell Mot** 24:175-189, 2003.
92. NIEDERLANDER, N., RAYNAUD, F., ASTIER, C., CHAUSSEPIED, P. Regulation of the actin-myosin interaction by titin. **Eur J Biochem** 271:4572-4581, 2004.
93. PEREIRA JE; CABRITA AM; FILIPE VM; BULAS-CRUZ J; COUTO PA; MELO-PINTO P; ET AL. A comparison analysis of hindlimb kinematics during overground and treadmill locomotion in rats. **Behav Brain Res** 172:212-218, 2006.
94. PETERSON GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem** 83: 346-356, 1977.
95. PINNIGER GJ; RANATUNGA KW; OFFER GW. Crossbridge and non-crossbridge contributions to tension in lengthening rat muscle: force-induced reversal of the power stroke. **J Physiol** 573(3):627-43, 2006.
96. PLANT DR; BEITZEL F; LYNCH GS. Length-tension relationship are altered in regenerating muscles of the rat after bupivacaine injection. **J Appl Physiol** 98:1998-2003, 2005.
97. POLLACK GH. **Muscle & Molecules: Uncovering the principles of biological motion**. Capítulo 2. Seattle, Ebner & Sons Publishers, 1990.
98. PURSLOW PP. Strain-induced reorientation of na intramuscular connective tissue network: implications for passive muscle elasticity. **J Biomech** 22:221-312, 1989.

99. RASCH PJ. **Cinesiologia e Anatomia Aplicada**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. 1991.
100. RASSIER, D.E., MACINTOSH, B.R., HERZOG, W. Length dependence of active force production in skeletal muscle. **J Appl Physiol** 86(5):1445-1457, 1999.
101. RASSIER DE; HERZOG W; WAKELING J; SYMW DA. Stretch-induced, steady-state force enhancement in single skeletal muscle fibres exceed the isometric force at optimum fiber length. **J Biomech** 36:1309-1316, 2003.
102. RASSIER DE; HERZOG W; POLLACK GH. Dynamics of individual sarcomeres during and after stretch in activated single myofibrils. **Proc R Soc Lond B** 270:1735-1740, 2003.
103. REISMAN S; ALLEN TJ; PROSKE U. Changes in passive tension after stretch of unexercised and eccentrically exercised human plantarXexor muscles. **Exp Brain Res** 193: 545-554, 2009.
104. SANDERCOCK TG. Nonlinear summation of force in cat soleus muscle results primarily from stretch of the common-elastic elements. **J Appl Physiol** 82: 2206-2214, 2000.
105. SCHLEIP R; NAYLOR IL; URSU D; MELZER W; ZORN A; WILKE H-J ET AL. Passive muscle stiffness may be influenced by active contractility of intramuscular connective tissue. **Med Hypoth** 66: 66–71, 2006.
106. SOTIRIADOU S; KYPAROS A; ALBANI M; ARSOS G; CLARKE MSF; SIDIRAS G ET AL. Soleus muscle force following downhill running in ovariectomized rats treated with estrogen. **Acta Physiol Nutr Metab** 31: 449-459, 2006.
107. TABARY JC; TARDIEU C; TARDIEU G; TABARY C; GAGNARD L. Functional adaptation of sarcomere number of normal cat muscle. **J Physiol** 72: 277-291, 1976.
108. TARDIEU C; TABARY JC; TABARY C; HUET DE LA TOUR E. Comparison of the sarcomere number adaptation in young and adult animals. **J Physiol** 73:1045-1055, 1977.
109. TATSUMI R; MAEDA K; HATTORI A; TAKAHASHI K. Calcium binding to an elastic portion of connectin/titin filaments. **J Muscle Res Cell Motil** 22(2):149-162, 2001.
110. TER KEURS HEDJ; IWAZUMI T; POLLACK GH. The Sarcomere Length-Tension Relation in Skeletal Muscle. **J Gen Physiol** 72: 565-592, 1978.
111. TOIGO M; BOUTELLIER U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **Eur J Appl Physiol** 97: 643-663, 2006.

112. TOURSEL T; STEVENS L; GRANZIEER; MOUNIER Y. Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of unloading conditions. **J Appl Physiol** 92: 1465–1472, 2002.
113. TROMBITÁS K; GREASER M; LABEIT S; JIN J-P; KELLERMAYER M; HELMES M ET AL. Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. **J Cell Bio** 140: 853-859, 1998.
114. TSKHOVREBOVA L; TRINICK J. Flexibility and extensibility in the titin molecule: analysis of electron microscope data. **J Mol Bio** 310:755-771, 2001.
115. TSKHOVREBOVA L; TRINICK J. Role of titin in vertebrate striated muscle. **Phil Trans R Soc Lond B** 25:199-206, 2003.
116. TSKHOVREBOVA L; TRINICK J. Properties of titinimmunoglobulin and fibronectin-3 domains. **The J Bio Chemistry** 279(45):46351-46354, 2004.
117. WANG SM; GREASER ML. Immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to bovine cardiac titin on intact and extracted myofibrils. **J Muscle Res Cell Motil** 6: 293-312, 1985.
118. WARD SR; LIEBER RL. Density and hydration of fresh and fixed human skeletal muscle. **J Biomech** 38: 2317-2320, 2005.
119. WATERMAN-STORER CM. The cytoskeleton of skeletal muscle: is it affected by exercise? **Med Sci Sport Exerc** 23: 1240-1249, 1991.
120. WILLIAMS PE; GOLSPINK G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **J Anat (London)** 138:342-50, 1984.
121. WICKLER SJ; HOYT DF; COGGER EA; HIRSCHBEIN MH. Preferred speed and cost of transport: the effect of incline. **J Exp Biol** 203:2195–2200, 2000.
122. WOITTIEZ RD; HUIJING PA; BOOM HBK; ROZENDAL RH. A three-dimensional muscle model: a quantified relation between form and function of skeletal muscles. **J Morphology** 113:182-195, 1984.

**ANEXO**

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS

Parecer do Comitê de Ética para uso de Animais da PUC-RS



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**CARTA DE APROVAÇÃO**

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2007725

**Título :**  Resposta do trabalho mecânico da locomoção às adaptações morfológicas e cinemáticas para treinamento concêntrico e excêntrico em ratos

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPACÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
JEFFERSON FAGUNDES LOSS	PESQ RESPONSÁVEL	jeffe@esef.ufrgs.br	33085869
GLÁUCIA ANDREZA KRONBAUER	PESQUISADOR	gkglau@yahoo.com.br	
LEONARDO ALEXANDRE PEYRE TARTARUG A	PESQUISADOR	leonardo.tartaruga@ufrgs.br	33085869
MATILDE ACHAVAL ELENA	PESQUISADOR	achaval@vortex.ufrgs.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 13 , ata nº 93 , de 30/8/2007 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, sexta-feira, 31 de agosto de 2007

  
 ILMA SIMONI BRUM DA SILVA  
 Coordenador do CEP-UFRGS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 049/08-CEUA

Porto Alegre, 16 de julho de 2008.

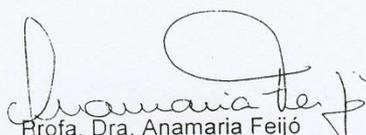
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética para o Uso de Animais  
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00028,  
intitulado: **“Características mecânicas do músculo sóleo de ratos  
submetidos a treinamento concêntrico e excêntrico”**.

Sua investigação está autorizada a partir da  
presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser  
entregues a este Comitê.

Atenciosamente,

  
Profa. Dra. Anamaria Feijó  
COORDENADORA DO CEUA-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Prof. Dr. Rosemary Sadami Arai Shinkai  
N/Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar sala 314- CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## APÊNDICE

Técnicas e soluções das análises bioquímicas

### DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Método de Peterson

Padrão de albumina 1 mg/mL (µL)		Água Milli-Q (µL)	Reagente de Lowry (µL)	Aguardar 10 minutos	Reagente de Folin 0,4N (µL)	Aguardar 30 minutos	Ler em 620 nm			
µL	µL									
0	0	100	100					50		
2	2	98	100					50		
5	5	95	100					50		
10	10	90	100					50		
15	15	85	100					50		
20	20	80	100					50		
25	25	75	100					50		
30	30	70	100					50		
35	35	65	100					50		
40	40	60	100					50		
Amostras 5-20 µL		qsp 100 µL	100		50					

#### Volume de amostras:

Amostras de culturas jovens (13 dias) 15 ou 20 µL.

Amostras de culturas velhas (30 dias) 10 µL.

Amostras de tecido 5 a 10 µL.

#### Cuidados com a placa:

Lavar a placa com H<sub>2</sub>O destilada, NaOH 1N (overnight) e por último com H<sub>2</sub>O destilada novamente. Enxaguar exaustivamente.

#### Soluções Utilizadas :

CTC: COBRE-TARTARATO-CARBONATO

- Solução 1: Carbonato de sódio

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> .....20g

H<sub>2</sub>O qsp .....100 mL

- Solução 2: Sulfato de cobre

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O .....0,2g

H<sub>2</sub>O qsp .....40 mL

- Solução 3: Tartarato duplo Na/K

KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>4H<sub>2</sub>O.....0,4g

H<sub>2</sub>O qsp .....40 mL

Misturar as soluções 2 e 3 e completar com água até 100 mL. Misturar esta solução com a solução 1 sob agitação. É importante que seja nesta ordem. Armazenar à temperatura ambiente em frasco âmbar coberto com alumínio. Válido por 2 meses.

**FOLIN 0,4 N:**

Reativo de folin 2 N .....10 mL

H<sub>2</sub>O qsp .....50 mL

Ou outra diluição 1:5. Armazenar à temperatura ambiente em frasco âmbar coberto com alumínio.

SDS 10%

SDS 99% .....10g

H<sub>2</sub>O qsp .....100 mL

Armazenar à temperatura ambiente.

NaOH 1N

NaOH.....4g

H<sub>2</sub>O qsp .....100 mL

Armazenar sob refrigeração.

LOWRY

CTC.....10 mL

SDS 10%.....10 mL

NaOH 1N.....8 mL

H<sub>2</sub>O.....12 mL

Armazenar em frasco âmbar coberto com alumínio. Válido por 2 semanas à temperatura ambiente.

ALBUMINA 1 mg/mL

Albumina bovina .....0,01 g

H<sub>2</sub>O qsp .....10 mL

Aliquotar em 500 µL e congelar.

**Cálculo da Quantidade de Proteína:**

- 1 Fazer a média das absorvâncias obtidas.
- 2 Calcular o fator da curva de calibração:

$$F = \frac{\text{Quantidade de albumina}}{\text{Absorvância obtida}}$$

- 3 Calcular a média dos fatores de calibração da curva, obtendo o fator de calibração médio (FCM).
- 4 Usar o FCM para o cálculo da quantidade de proteína nas amostras (em µg/µL):

$$[ \ ] \text{ amostras} = \frac{\text{Absorvância da amostra} \times \text{FCM}}{\text{Volume de amostra utilizado (em } \mu\text{L)}}$$

## IMUNOBLOTTING

### Protocolo Western Blotting

#### Transferência/ Blotting

- 1 Cortar a nitrocelulose 0,5 cm maior que o gel. Marque o início da aplicação com um pequeno corte transversal.
- 2 Cortar dois pedaços de papel filtro do mesmo tamanho da nitrocelulose.
- 3 Mergulhar nitrocelulose em Bjerrum por 10 minutos.
- 4 Molhar o 1º papel filtro em Bjerrum e com ele molhar o eletrodo inferior. Colocar o papel sobre o eletrodo inferior e retire as bolhas correndo um tubo de ensaio sobre o papel.
- 5 Colocar a membrana em cima do papel mantendo-a úmida.
- 6 A transferência pode ser realizada a partir de um gel recém corrido ou de um gel seco. Para gel recém corrido, marque nas duas placas o local onde o gel deve ser cortado, corte-o e deixe por 1 minuto em Bjerrum. Se o gel já estiver seco, corte-o na área de interesse (não deixe o celofane maior que o gel nas bordas para evitar a quebra do gel) e hidrate-o em tampão de equilíbrio durante 45-60 minutos sob agitação suave e retire o papel celofane. Deixe por 1 minuto em Bjerrum. Nos dois casos faça um novo corte no gel indicando o início da aplicação das amostras.
- 7 Transferir o gel do Bjerrum para cima da nitrocelulose. O corte do gel deve ficar junto com o da nitrocelulose. Retire as bolhas com um tubo de ensaio.
- 8 Sobre o gel coloque o 2º pedaço de papel filtro, previamente embebido em Bjerrum, e retire eventuais bolhas.
- 9 Retirar o excesso de Bjerrum com retalhos de papel filtro. Fechar o aparelho.
- 10 Ligar a fonte. Aperte na tecla set/enter. A luz indicando a voltagem começa a piscar, acerte com as setas para 15V e aperte novamente a mesma tecla. A luz indicando a amperagem começa a piscar e com as mesmas setas acerte para a amperagem desejada (esta depende do tamanho do gel: 1,2 mA/cm<sup>2</sup>) e aperte novamente set/enter. A luz indicando o tempo de corrida começa a piscar e com as setas acerte para uma hora. Aperte a tecla run. A tecla view serve para visualizar voltagem, amperagem e tempo de corrida.

OBS: O tempo de transferência depende do tamanho da proteína. No caso da GFAP (47kDa) uma hora é suficiente enquanto que a Calbindina quarenta minutos são o tempo adequado. Proteínas de menor peso molecular podem transfixar a membrana quando o tempo de corrida estiver em demasia.

- 11 A fonte "apita" quando o tempo de corrida acabou. Aperte stop e desligue a fonte.
- 12 Abra o aparelho e retire a nitrocelulose. A fixação é opcional. Para fixar a membrana, deixe-a em solução fixadora para blotting durante 5 minutos. Depois lave a membrana em água destilada até que saia o cheiro de ácido acético.
- 13 Se precisar corar as proteínas na membrana de NC, usar Ponceau 0,5% em ácido acético 1% por no mínimo 2 minutos e lavar de três a seis vezes com pequenas quantidades de solução ácido acético 0,01% até o aparecimento das bandas.

- 14 Lavar a membrana com TBS para retirar o excesso de Ponceau.
- 15 Limpar os dois eletrodos do aparelho com perfix molhado com água destilada (5 vezes). Deixar o aparelho aberto até secar.

Atenção: as etapas descritas devem ser realizadas com uso de luvas, lave-as para retirar o talco; utilize papel absorvente embebido em álcool para limpar a bancada e o material usado para cortar o gel, a nitrocelulose e o papel filtro. Estes cuidados evitam a contaminação do gel e da nitrocelulose com proteínas da pele.

### Imunodeteccção

- 1 Bloquear a membrana por imersão com M-TBS durante duas horas, o ideal é que seja overnight. A primeira hora deve ser sob agitação suave, depois pode ficar na geladeira.
- 2 Lavar com T-TBS, duas vezes por 5 min cada.
- 3 Incubar com 1º anticorpo diluído em M-TBS durante uma hora sob agitação suave.
- 4 Lavar com T-TBS, três vezes por 5 min cada.
- 5 Incubar com 2º anticorpo conjugado a peroxidase, diluído em M-TBS durante uma hora sob agitação suave.
- 6 Lavar com T-TBS três vezes por 10 min cada. E realizar ainda uma lavagem final com TBS por 10 min também. Deixar a membrana em TBS até a reação com luminol.  
⇒ Caso o 2º anticorpo não seja conjugado com Peroxidase, apos a lavagem, adicionar Peroxidase diluída 1:3000 em M-TBS. Deixar por no mínimo 1 hora no agitador.
- 7 Reação com Luminol (Sala Escura):
  - Retirar o excesso de TBS da nitrocelulose colocando-a sobre um papel filtro.
  - Colocar a membrana sobre uma placa de eucatex forrada com filme plástico. A membrana fica dentro de um plástico selado apenas no lado de cima.
  - No escuro, misturar os reagentes 1 e 2 (1:1 em alíquotas pequenas em um eppendorf). Os reagentes devem ser misturados somente no momento da reação e para cada reagente use uma ponteira diferente.
  - Molhar a membrana com o reagente de luminol e cobrir com o plástico selado por 1 minuto. Certifique-se que o reagente cobriu toda a membrana e retire as bolhas.
  - Retirar o excesso de reagente inclinando levemente o eucatex e secar as bordas da nitrocelulose com papel absorvente.
  - Rapidamente expor a membrana a um filme de raio X por 2 a 30 minutos cortado no lado da aplicação. Cuidado pois o filme não pode ser molhado!
  - Revelar: Deixar 3 minutos na solução reveladora, lavar em ácido acético 10% e deixar 4 minutos na solução fixadora. Após 1 minuto na solução fixadora já é possível acender a luz. Lavar diversas vezes o filme com H<sub>2</sub>O e por último com H<sub>2</sub>O destilada.

Stripping

Incubar a membrana em NaOH 1N durante 10 minutos sob agitação. Lavar a membrana com água destilada até retirar o excesso de NaOH (3-4 vezes).

OBS: Fazer stripping sempre que for recolocar o 1º anticorpo, seja ele igual ou diferente do anterior.

Soluções:

## BJERRUM

<b>Trizma (48 mM)</b>	5,836 g
<b>Glicina (39 mM)</b>	2,956 g
<b>Metanol (20%)</b>	200 mL
<b>H<sub>2</sub>O milli-Q qsp</b>	1000 mL

Armazenar na geladeira e não acertar o pH.

## SOLUÇÃO FIXADORA

<b>Metanol</b>	40 mL
<b>Ácido acético</b>	10 mL
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	50 mL

Armazenar na geladeira.

## PONCEAU 0,5%

<b>Ponceau</b>	0,05 g
<b>Ácido acético</b>	100 µL
<b>H<sub>2</sub>O destilada qsp</b>	10 mL

Armazenar a temperatura ambiente

## TBS

<b>NaCl</b>	58,48 g
<b>Tris (30 mM)</b>	7,5 g
<b>H<sub>2</sub>O milli-Q qsp</b>	2000 mL
<b>pH 7,5</b>	

Armazenar na geladeira.

## T-TBS

Tween 20 0,05%

Diluir 50 µL de Tween 20 em 100 mL de TBS.

Usar ponteira cortada devido a grande viscosidade do Tween. Armazenar em geladeira. De preferência fazer no momento do uso.

## M-TBS

Diluir 5 g de leite em pó (leite desnatado sem cálcio) em 100 mL de TBS.

Armazenar em geladeira.

## TAMPÃO DE EQUILIBRAÇÃO

**Solução de uso:** 50 mL tris-glicina  
0,5 mL SDS 10%

## Stock

<b>Trizma (25 mM)</b>	1,51 g
<b>Glicina (192 mM)</b>	7,21 g
<b>H<sub>2</sub>O milli-Q qsp</b>	500 mL

## SOLUÇÕES PARA REVELAÇÃO:

### Solução Reveladora:

2850 mL para 13 litros

Cuidar a capacidade do frasco em que está a solução.

**Ácido Acético 10%** (250 mL de ácido acético em 2,5 litros de água destilada).

### Solução Fixadora:

2850 mL para 13 litros

Cuidar a capacidade do frasco em que está a solução.

## ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL

### Gel de PoliAcrilamida-SDS (SDS-PAGE)

#### Preparação dos géis:

	Gel de separação (10%)	Gel de entrada (3%)
<b>Acrilamida 40%</b>	5 mL	330 µL
<b>Tris 1,5M pH 8,8</b>	5 mL	-
<b>Tris 500mM pH 6,8</b>	-	780 µL
<b>SDS 1%</b>	2 mL	300 µL
<b>Glicerol</b>	1,5 mL	300µL
<b>H<sub>2</sub>O milli-Q</b>	6,5 mL	1,3 mL
<b>Temed</b>	12,5 µL	4,5 µL
<b>Persulfato 10%</b>	90 µL	45 µL

- 1 Limpar as placas com álcool. Montar a placa, utilizando jogo de espaçadores e pente de mesma espessura e prendendo bem com grampos e peças de acrílico.
- 2 Colocar o pente e marcar com caneta a 1,5 cm abaixo do final do pente, na placa de trás.
- 3 Medir de forma adequada os itens da tabela acima e ir colocando em 2 recipientes separados, obrigatoriamente de vidro, devidamente identificados. Mantenha os recipientes no gelo durante o preparo das soluções para evitar a polimerização.
- 4 Agitar com bailarina os géis de entrada e de separação.
- 5 Cobrir o becker contendo o gel de entrada com filme plástico.
- 6 Sob agitação adicionar o TEMED ao gel de separação, cuidadosamente para não formar bolhas, e o Persulfato seguindo esta ordem. Não demorar após a adição, pois a polimerização inicia imediatamente.
- 7 Inclinar ligeiramente a placa e verter o conteúdo do becker pela parede até passar um pouco da marca porque o gel tende a retrair.
- 8 Cobrir com SDS 0,01% e deixar polimerizando por no mínimo 30 minutos. A polimerização depende da temperatura. O SDS 0,01 % sobre o gel visa evitar que o oxigênio do ar impeça a polimerização.
- 9 Após, desprezar o SDS virando a placa na pia e verificar se não ficaram bolhas. Caso isso ocorra lave a superfície do gel com água milli-Q.
- 10 Repita o passo 6 e adicionar o TEMED e o Persulfato ao gel de entrada.
- 11 Inclinar ligeiramente a placa e verter o conteúdo do becker pela parede até atingir a

superfície, de modo que ao colocar o pente o gel transborde.

- 12 Colocar o pente empurrando-o pela lateral para empurrar as bolhas e deixar polimerizando por no mínimo 30 minutos.
- 13 Tirar os grampos e as peças de acrílico, colocar filme plástico em cima e em baixo, colocar dentro de um saco identificado e guardar na geladeira por até uma semana.

#### Preparação das amostras:

- 1 Lisar as células utilizando 100  $\mu\text{L}$  de Stopping Solution A / poço (placa de 24 poços). No caso de microfalias utilizar 50  $\mu\text{L}$  e em fatias 100  $\mu\text{L}$  de Stopping Solution A. Homogeneizar as amostras com seringa de insulina. Realizar este procedimento em gelo.
- 2 Ferver as amostras por dois minutos.
- 3 Retirar uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  para a dosagem de proteínas no caso de amostras provenientes de cultura ou fatia. No caso de amostras de microfalias utilizar 5  $\mu\text{L}$  para a dosagem de proteínas.
- 4 Congelar as amostras devidamente identificadas.

#### Aplicação das amostras:

- 1 Descongelar as amostras e adicionar 25% do volume da amostra de Stopping Solution B contendo 5% de mercaptoetanol. Agitar.

$$\begin{array}{rcl} \text{Ex:} & 84 \mu\text{L de amostra em Stopping Solution A} & \text{-----} & 100\% \\ & & \text{X} & \text{-----} & 25\% \\ & \text{X} = 21 \mu\text{L de Stopping Solution B com mercaptoetanol} & & & \end{array}$$

- 2 Preparar 1L de tampão superior diluindo 200 mL em 1L de água destilada.
- 3 Retirar o pente do gel e marcar as canaletas a serem utilizadas.
- 4 Montar a cuba com a placa utilizando grampos de forma que não vaze o tampão superior. Colocar primeiro o tampão superior e depois o tampão inferior com a finalidade de verificar se não tem vazamento.
- 5 Aplicar 40-60  $\mu\text{g}$  de proteínas por amostra. Para isso utilizar seringa Hamilton não esquecendo de lavar a seringa com água milli-Q entre as amostras.

**Correr a eletroforese na câmara fria, ajustando a voltagem para 230- 250V. A corrida dura aproximadamente 3 horas.**

#### Preparação dos tampões:

	Tampão superior (5x [ ])	Tampão inferior
Trisma base	15 g	24,12 g
Glicina	71,5 g	-
SDS 95%	5 g	-
H <sub>2</sub> O destilada qsp	1L	4L
<b>pH 8,0</b>		

#### OBS:

- ✓ Armazenar o tampão superior à temperatura ambiente.
- ✓ Acertar o pH do tampão inferior com HCl 6N e armazenar na geladeira. Ou com mais ou menos 1,3 mL de HCl fumegante.

**Soluções:****ACRILAMIDA 40%**

Acrilamida..... 390g  
 Bisacrilamida..... 10 g  
 H<sub>2</sub>O milli-Q qsp ..... 1000 mL  
 Utilizar balão volumétrico e máscara (tóxico). Armazenar em geladeira.  
**TAMPÃO TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8**  
 Tris..... 181,6 g  
 HCl fumegante.....  $\cong$  30 mL  
 H<sub>2</sub>O milli-Q qsp ..... 1000 mL  
 Usar balão volumétrico. Armazenar em geladeira.

**TAMPÃO TRIS-HCl 500 mM pH 6,8**

Tris..... 60 g  
 HCl fumegante.....  $\cong$  45 mL  
 H<sub>2</sub>O milli-Q qsp ..... 1000 mL  
 Usar balão volumétrico. Armazenar em geladeira.

**SDS 10%**

SDS 99%..... 50 g  
 H<sub>2</sub>O milli-Q qsp ..... 500 mL  
 Usar balão volumétrico. Armazenar em geladeira.

**Stopping Solution A (SDS STOPPING SOLUTION 4%)**

SDS 10%..... 4 mL  
 EDTA 100mM..... 200  $\mu$ L  
 Tris 500 mM..... 1 mL  
 H<sub>2</sub>O milli-Q qsp ..... 10 mL  
 Armazenar a temperatura ambiente.

**Stopping Solution B (GLICEROL SAMPLE DILUTION SOLUTION 40%)**

Glicerol 100%..... 4 mL  
 Azul de Bromofenol.....  $\mu$ L  
 Tris 500 mM..... 1 mL  
 H<sub>2</sub>O milli-Q qsp ..... 10 mL  
**Armazenar a temperatura ambiente.**

Funções:

- Mercaptoetanol: Manter as pontes dissulfeto rompidas.
- Stopping A: O SDS desnatura as proteínas
- EDTA: Quelante de Cálcio e Magnésio
- TRIS: Tampão
- Stopping B: Glicerol: deixar a amostra mais densa do que o tampão de eletroforese superior.
- Azul de bromofenol: marca a frente de corrida.