

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO**

MYLENA DE CAMPOS OLIVEIRA

**EFEITO DO TREINAMENTO COM PLATAFORMA VIBRATÓRIA NA MORFOLOGIA
DO MÚSCULO DIAFRAGMA EM RATOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA**

CASCAVEL - PR
(Março/2021)

MYLENA DE CAMPOS OLIVEIRA

**EFEITO DO TREINAMENTO COM PLATAFORMA VIBRATÓRIA NA MORFOLOGIA
DO MÚSCULO DIAFRAGMA EM RATOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Rose Meire Costa

COORIENTADOR: Marcia Miranda Torrejais

CASCADEL - PR

(Março/2021)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Oliveira, Mylena de Campos
Efeito do treinamento com plataforma vibratória na morfologia do músculo diafragma em ratos com obesidade hipotalâmica / Mylena de Campos Oliveira; orientador(a), Rose Meire Costa; coorientador(a), Marcia Miranda Torrejais, 2020.
111 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, 2020.

1. Músculo estriado esquelético. 2. Plataforma vibratória. 3. Animais experimentais. 4. Obesidade. I. Costa, Rose Meire. II. Torrejais, Marcia Miranda. III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-85
Rua Universitária, 2089 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4586 - Cascavel - Paraná



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

MYLENA DE CAMPOS OLIVEIRA

Efeito do treinamento com plataforma vibratória na morfologia do músculo diafragma em ratos obesos através do MSG.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, Processo Saúde-doença e Políticas de Saúde, linha de pesquisa Fatores Que Influenciam A Morfofisiologia Orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Rose Mello Costa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Sabrina Grassioli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Sônia Maria Marques Gomes Bertolini

Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Cascavel, 3 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me dado condições, saúde, sabedoria e também forças para chegar até aqui e superar todas as dificuldades.

À minha família, que sempre me deu uma base, sempre me apoiando em minhas decisões. Principalmente, à minha mãe, que sempre estava pronta a me ouvir e sempre me incentivou muito.

A todos os professores que fizeram parte dessa jornada, principalmente aos que mais que professores se tornaram amigos de certa forma, sempre incentivando e ajudando.

Agradeço grandemente à minha orientadora, Prof.^a Dra. Rose Meire Costa Brancalhão, por todo o suporte sempre durante o trabalho e principalmente na reta final, sempre disposta a esclarecer qualquer dúvida e dando o apoio necessário.

Também à minha coorientadora, Prof.^a Dra. Marcia Miranda Torrejais, principalmente pela confiança, pelos ensinamentos e por estar sempre presente no decorrer do trabalho.

À Prof.^a Dra. Sabrina Grassioli, que também sempre colaborou desde o começo do trabalho, com contribuições sempre muito válidas.

À Prof.^a Dra. Sonia Maria Marques Gomes Bertolini, por aceitar ao convite para participar da banca e pelas contribuições realizadas.

E também não poderia deixar de agradecer, primeiramente, à Pamela e à Camila, por tudo que me ensinaram desde o começo, pois devo muito do que sei a elas. À Bárbara e à Mariana, por toda a disposição e ajuda com o experimento. Aos meus amigos e colegas de laboratório, Ana Retameiro, Ariadne, Aldair, Leticia, Mikael, Dani, Rafa, Matheus e Suelen, que sempre estavam dispostos a me ajudar de alguma forma e que sem dúvidas com eles também aprendi muitas coisas. À minha prima Daniella, que aguentou todas as minhas lamentações e também contribuiu com o trabalho de certa forma. Aos demais amigos que fiz na faculdade, Ana Farina, Milara e Gustavo, que sempre estavam dando uma palavra de apoio e incentivo nos momentos de dificuldade. E a todos os demais amigos, que também sempre estiveram ao meu lado.

RESUMO

OLIVEIRA, M. C. **Efeito do treinamento com plataforma vibratória na morfologia do músculo diafragma em ratos com obesidade hipotalâmica.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus de Cascavel, Unioeste, 2020.

O músculo diafragma se apresenta como o principal músculo relacionado à mecânica respiratória, apresentando notável plasticidade, mas, sofre remodelações por diversas condições, como a obesidade e o exercício físico. A plataforma vibratória (PV) provoca estímulos mecânicos que podem promover modificações musculares, porém, ainda pouco se sabe sobre os seus efeitos. Assim, o presente estudo objetivou investigar os efeitos do uso da PV na morfologia do músculo diafragma de ratos obesos obtidos pela administração neonatal de glutamato monossódico (MSG). Ratos *Wistar* recém-nascidos foram separados inicialmente em: grupo controle (GC; n=14) e grupo obeso (GO; n=14), os quais, nos primeiros cinco dias de vida, para indução da obesidade, receberam a administração de MSG (4 mg/g). Aos 70 dias de vida, os grupos foram distribuídos em quatro: controle (GC; n=7), exercitado em PV (GCP; n=7), obeso (GO; n=7) e obeso exercitado em PV (GOP; n=7), sendo iniciado o exercício com protocolo de frequência de 60 hertz (Hz) e amplitude de dois milímetros, três vezes por semana durante 10 minutos, em um período de oito semanas. Ao fim do período experimental, já com 130 dias de idade, os animais foram eutanasiados para a coleta das gorduras retroperitoneal e periepídídima e também do músculo diafragma, que foi dividido em antímeros esquerdo e direito, para avaliação da morfologia e morfometria das fibras musculares, análise dos diferentes tipos de fibras, porcentagem de tecido conjuntivo, morfometria das junções neuromusculares (JNMs) e análise da atividade das enzimas colinesterase (ChE), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e reação de lipoperoxidação (LPO). As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise de variância Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Em todos os grupos estudados, a morfologia das fibras apresentou-se preservada. Entretanto, a obesidade causou diminuição na área de secção transversal e nos diâmetros maior e menor, bem como aumento no número de fibras musculares e redução na relação núcleo/fibra. Houve redução no número de fibras glicolíticas nos animais treinados e redução de área das fibras tipo IIA e IIB nos animais obesos. A porcentagem de tecido conjuntivo foi maior nos animais obesos, assim como nos animais treinados. Na análise das junções neuromusculares, houve diminuição em todos os parâmetros analisados com relação à obesidade, PV e pela interação dos dois fatores. Com relação ao estresse oxidativo, a obesidade causou diminuição na atividade de CAT e aumento na GST, enzima essa que também se apresentou aumentada nos animais treinados em PV e na interação entre os dois fatores, sendo que a interação promoveu, da mesma forma, redução na GR. Conclui-se, portanto, que o exercício em PV não conseguiu reverter os efeitos causados pela obesidade no músculo em estudo, apesar de ser observada algumas alterações com esse tipo de exercício.

Palavras-Chaves: Músculo estriado esquelético. Vibração. Animais experimentais.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. C. **Effects of training with vibrating platform on the diaphragm muscle morphology in rats with hypothalamic obesity.** Dissertation (Master's degree). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

Diaphragm muscle is presented as the main muscle related to respiratory mechanics, presenting remarkable plasticity, undergoing remodelling due to several conditions, such as obesity and physical exercise. Vibrating platform (VP) causes mechanical stimuli, which can promote muscle changes, however, little is known about its effects. Thus, the present study aims to investigate the effects of using VP on the diaphragm muscle morphology of obese rats by the monosodium glutamate (MSG). Newborn *Wistar* Rats were initially separated into: control group (CG; n=14) and obese group (OG; n =14); who received MSG (4 mg/g) in the first five days of life to induce obesity. At 70 days of age, the groups were divided into four; control (CG; n=7), exercised in VP (CGP; n=7), obese (OG; n=7) and obese exercised in VP (OGP; n=7), started the training protocol, at a frequency of 60 hertz (Hz) and two millimetres amplitude, three times a week for 10 minutes, over a period of eight weeks. At the end of the experimental period, at 130 days of age, the animals were euthanized and the retroperitoneal and peri-epididymal fats were collected, as well as the diaphragm muscle, which was divided into left and right antimeres to evaluate the morphology and morphometry of the muscle fibers, the different types of fibers, the percentages of connective tissue, morphometry of neuromuscular junctions (NMJs) and analysis of the activity of cholinesterase (ChE), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) and lipoperoxidation reaction (LPO). Statistical analysis was performed using the Two-way ANOVA analysis of variance test, with Bonferroni's post-test ($p < 0.05$). In all the studied groups the fibers' morphology was preserved, however, in morphometry, obesity caused a decrease in the cross-sectional area and in the larger and smaller diameters, as well as an increase in the number of muscle fibers and a reduction in the core/fiber ratio. There was a reduction in the number of glycolytic fibers in trained animals and a reduction in the area of type IIA and IIB fibers in obese animals. The percentage of connective tissue was higher in obese animals, as well as in trained animals. In the analysis of neuromuscular junctions, there was a decrease in all of the analyzed parameters facing obesity, VP and the interaction of the two factors. Regarding oxidative stress, obesity caused a decrease in CAT activity and an increase in GST, an enzyme that was also increased in animals trained in VP, and also in the interaction between the two factors, where the interaction also promoted a reduction in GR. Therefore, it is concluded that exercise in VP was not able to reverse the effects caused by obesity in the studied muscle, although some changes were observed relating to this type of exercise.

Keywords: Striated skeletal muscle. Vibration. Experimental animals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vista inferior do músculo diafragma	14
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina
ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
CEUA – Comitê de ética no uso de animais
Ca⁺² – Cálcio
CAT - Catalase
ChE – Colinesterase
CNA – Comprimento nasoanal
CO₂ – Gás carbônico
CONCEA – Conselho Nacional de Experimentação Animal
DNTB – 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato
EROs – Espécies reativas de oxigênio
GC – Grupo controle
GCP – Grupo controle exercitado em plataforma vibratória
GH – Hormônio do Crescimento
GHRH – Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GLUT4 – Proteína translocadora de glicose 4
GO – Grupo obeso
GOP – Grupo obesos exercitado em plataforma vibratória
GR – Glutathione redutase
GST – Glutathione S-transferase
HE – Hematoxilina - Eosina
Hz – Hertz
IBR₂ – Teste de respostas biológicas integradas versão 2
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL – Índice de lee
IL – 6 – Inter leucina 6
IMC – Índice de massa corporal
JNMs – Junção Neuromusculares
LPO – Lipoperoxidação
MDA – Malondialdeído

MDF – Fibra de média densidade

mm - milímetros

MSG – Glutamato monossódico

NBT – Azul de tetrazolium

NADH-TR – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Tetrazolium Redutase

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

OMS – Organização Mundial da Saúde

OTG – Orgão tendinoso de Golgi

PV – Plataforma vibratória

rpm – rotações por minuto

SOD – Superóxido dismutase

TNF α – Fator de necrose tumoral α

UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	7
2.OBJETIVOS.....	10
2.1Objetivo Geral.....	10
2.2Objetivos específicos.....	10
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Músculo estriado esquelético.....	11
3.2 Obesidade.....	14
3.3 Modelos de obesidade com animais experimentais.....	16
3.4 Efeitos da obesidade no músculo estriado esquelético.....	17
3.5 Exercício físico e plataforma vibratória.....	19
3.6 Efeitos da plataforma vibratória no músculo esquelético.....	21
ARTIGO CIENTÍFICO 01.....	23
ARTIGO CIENTÍFICO 02.....	46
CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS GERAIS.....	74
ANEXO 01 – Aprovação do Comitê de Ética.....	85
ANEXO 02 – Normas artigo 01.....	86
ANEXO 03 – Normas Artigo 02.....	96

1. INTRODUÇÃO

O tecido muscular estriado esquelético constitui cerca de 40% do corpo humano, desenvolvendo importantes funções de execução das respostas motoras para realização de atividades físicas diárias (RISSI et al., 2016), além de homeostase da glicose e balanço de energia (SILVENNOINEN et al., 2013). Dentre os diversos músculos existentes, o músculo diafragma é o mais importante no ato da respiração, apresentando-se em formato de cúpula. Esse músculo localiza-se entre a cavidade abdominal e torácica, podendo ser dividido em três regiões anatômicas: esternal, costal e crural (LESSA et al., 2012).

Devido à grande plasticidade que o tecido muscular apresenta, modificações adaptativas podem acontecer em seu metabolismo, ocorrendo em resposta à presença de patologias e também à realização de atividades físicas (SILVENNOINEN et al., 2013). Essas adaptações musculares ligadas à prática de atividades físicas envolvem aspectos como adequações no metabolismo oxidativo, aumento no número e tamanho de mitocôndrias e até mesmo aumento na expressão e na atividade de enzimas do metabolismo energético (ALEGRE et al., 2012), ocorridas para o aumento da oferta de oxigênio, convergindo para a melhora da contração e da geração de força (BOFF, 2008).

Devido aos benefícios que a realização de atividades físicas tem promovido para a saúde e para a qualidade de vida das pessoas, a recomendação dessa prática tem aumentado cada vez mais (PUCCI et al., 2012). A literatura já indica a melhora de aptidão cardiorrespiratória, da composição corporal e do bem-estar psicossocial, além de outros benefícios. Tais aspectos tornam a atividade física uma importante ferramenta no tratamento de várias patologias, como a obesidade e as comorbidades que a acompanham (PAES et al., 2015).

Cada vez mais, observa-se uma diversidade nos tipos e modalidades de exercícios disponíveis, se tornando popular nas academias o uso de equipamentos (SILVA et al., 2015). Recentemente, foram desenvolvidos aparelhos produtores de vibração, denominados de plataforma vibratória (PA, doravante), que têm sido utilizados com o intuito de proporcionar uma alternativa auxiliar na realização de treinamentos e também na reabilitação física (JUNIOR; BARONI; VAZ, 2012). O

equipamento produz vibrações sinusoidais, com frequências e amplitudes variadas, que são transmitidas ao corpo por meio das extremidades e, com isso, estimulam, por exemplo, os fusos musculares (BACHA et al., 2016).

Alguns benefícios do uso da PV são relatados na literatura, como a melhora na composição corporal, na força muscular e na saúde cardiovascular em humanos (YONG; SON; KWON, 2015), além de redução de adipogênese em animais (MADDALOZZO et al., 2008).

Ademais, acredita-se que a estimulação dos fusos promovida pelas vibrações provoque o aumento do gasto energético, gerando uma queima calórica, fato que torna a PV um possível tratamento para a obesidade (BIANCHETTI et al., 2015). Essa doença crônica, definida pelo excesso de gordura corporal, é considerada uma epidemia pelo modo como sua incidência tem aumentado no decorrer dos anos (WHO, 2015).

Para melhor entendimento do desenvolvimento da obesidade e também de suas comorbidades associadas, são utilizados nas pesquisas científicas modelos de animais experimentais que têm essa doença induzida de diversas formas, sendo uma delas pela administração no período neonatal de glutamato monossódico (MSG) (OLNEY, 1969). Essa substância causa lesões nos núcleos arqueados hipotalâmicos, levando ao desenvolvimento da obesidade, à inibição de ganho de massa muscular, ao grande acúmulo de gordura e ao menor comprimento ósseo (CANTELLI, et al., 2017; VELLOSO; SCHWARTZ, 2011). A partir disso, esse modelo se torna apropriado para o estudo da chamada obesidade hipotalâmica (BONFLEUR et al., 2015).

Dentre as alterações causadas pela obesidade no músculo estriado esquelético, relatam-se, em alguns estudos, a ocorrência de redução da área de secção transversal das fibras musculares (BAYOL; SIMBI; STICKLAND, 2005; KEMP et al., 2009; SISHI et al., 2010), as mudanças na composição dessas fibras (DENIES et al., 2014) e também o acúmulo de lipídeos intramusculares (SILVENNOINEN et al., 2013). Outro fator agravante relacionado a complicações respiratórias causadas pela doença, isso porque, com o acúmulo de gordura na região abdominal, pode haver uma redução nas dimensões anatômicas de músculos importantes, como o diafragma (TEIXEIRA et al., 2009), causando restrição na mecânica pulmonar (DELGADO; LUNARDI, 2011). No entanto, devido à escassez

de estudos, pouco se sabe sobre quais são os efeitos causados pelas vibrações mecânicas na morfologia muscular e também na mecânica respiratória.

Nesse sentido, considerando a crescente prevalência da obesidade em todo o mundo, a necessidade de se buscar terapias menos invasivas, como a atividade física, voltadas ao tratamento dessa doença, e o aumento no uso das plataformas vibratórias, defende-se a relevância de se estudar os efeitos que a vibração mecânica de corpo inteiro exerce na morfologia do músculo diafragma, analisando seu potencial terapêutico no auxílio ao tratamento da obesidade. Assim sendo, é possível elaborar a hipótese de que o exercício físico com plataforma vibratória irá melhorar os parâmetros de obesidade, como a redução de peso corporal e o acúmulo de gordura, proporcionado pelo maior gasto energético, assim como a reversão dos efeitos causados por essa doença na musculatura estriada esquelética.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do treinamento com PV sobre a morfologia do músculo diafragma de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do treinamento em PV sobre o perfil histomorfológico das fibras musculares em roedores obesos;
- Descrever o tecido conjuntivo do músculo diafragma;
- Estudar histomorfologicamente as junções neuromusculares;
- Quantificar o teor proteico e enzimático do tecido muscular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Músculo estriado esquelético

O tecido muscular esquelético atua na locomoção, na postura e nos movimentos de respiração (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). Além disso, forma o maior tecido constituinte do corpo dos vertebrados e humanos, compreendendo cerca de 40% do peso total do corpo e contém 50 a 75% de todas as proteínas corporais (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Ele é constituído de finas células contráteis cilíndricas, longas e multinucleadas, denominadas fibras musculares (BADARO; SILVA; BECHE, 2007). Todavia, apesar de embriologicamente e morfologicamente semelhantes, as células musculares são diferentes quanto à capacidade de gerar força e potência mecânica, haja vista que o curso temporal da resposta contrátil e a resistência à fadiga diferem acentuadamente de fibra para fibra (POLLA et al., 2004). Com base em suas propriedades funcionais, as fibras podem ser classificadas em fibras musculares do tipo I e de contração lenta, com seu sarcoplasma contendo grande quantidade de mioglobina e menor número de mitocôndrias, e fibras musculares do tipo II e contração rápida, que contêm pouca mioglobina e maior número de mitocôndrias (MINAMOTO, 2005). Músculos distintos, no entanto, têm uma predominância relativa diferente dos vários tipos de fibras, pois a presença de fibras com diferentes propriedades no mesmo músculo pode refletir uma adaptação a diferentes padrões de atividade impostos pelos neurônios motores (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Cada fibra muscular individual é formada por milhares de miofibrilas, que são compostas por pequenas estruturas chamadas miofilamentos proteicos, sendo os mais abundantes os de actina e miosina, compreendendo aproximadamente 70 a 80% do conteúdo total de proteínas de uma única fibra (FRONTERA; OCHALA, 2015). As miofibrilas apresentam um arranjo ordenado e são responsáveis pelas estriações transversais decorrentes dos chamados sarcômeros, que são a unidade funcional do músculo, sendo delimitados pela linha Z (BADARO; SILVA; BECHE, 2007). Nos sarcômeros, há ainda um padrão de bandas, as quais se dividem em

faixas escuras, denominadas banda A, e faixas claras, denominadas bandas I (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). Além disso, no centro da banda A, pode-se observar uma fina faixa mais clara, a banda H, formada apenas por filamentos espessos; já na sua região central, observa-se a linha M, formada por um arranjo hexagonal de proteínas que ligam filamentos espessos adjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

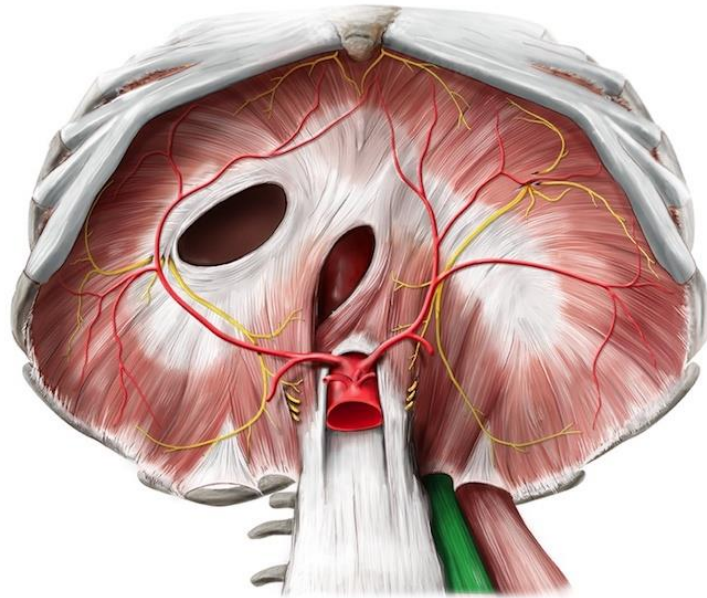
Os músculos são compostos também de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervos, elementos que podem influenciar grandemente na função muscular (GILLIES; LIEBER, 2011). O tecido conjuntivo envolve as fibras musculares e é composto por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007), como o colágeno, que se apresenta como o principal constituinte, com predominância dos tipos I e III (GILLIES; LIEBER, 2011). Esse tecido tem uma distribuição única constituída por vários componentes: o epimísio, que abrange um músculo individual; o perimísio, que envolve um grupo de fibras musculares; e o endomísio, que envolve cada fibra muscular isoladamente (FRONTERA; OCHALA, 2015). As funções desses componentes incluem manutenção muscular, miogênese, regeneração, reinervação e adaptações ao treinamento (HUENCHULLAN et al., 2017).

A contração das fibras musculares esqueléticas é comandada por estímulos provenientes do sistema nervoso e participando do mecanismo de controle encontra-se a junção neuromuscular (JNMs) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Portanto, em sua definição, a JNMs é a conexão sináptica entre os neurônios motores e as fibras musculares (WU; XIONG; MEI, 2010). Ela é formada por uma parte pré-sináptica, denominada terminação nervosa, responsável pela síntese dos neurotransmissores, sendo nesse caso a acetilcolina (ACh), que fica armazenada em vesículas (BLOCH-GALLEGO, 2015). Quando um potencial de ação chega até essa terminação nervosa, ocorre a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) e, conseqüentemente, há um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, desencadeando a migração das vesículas para a superfície nervosa, as quais sofrem então exocitose e liberam a ACh para a fenda sináptica (MARTYM; FANGERLUND; ERICKSSON, 2009). Já a parte pós-sináptica é constituída por receptores nicotínicos, que são ativados e respondem abrindo canais de sódio, garantindo a propagação da atividade elétrica e promovendo, dessa forma, a contração muscular (FANGERLUND; ERICKSSON, 2009).

Além disso, o tecido muscular também apresenta um sistema de defesa constituído por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as glutatonas, responsáveis por decompor radicais superóxido, peróxido e hidróxidos formados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), que são produtos normais do metabolismo, mas que, principalmente em condições patológicas, acabam superando a capacidade de eliminação do sistema antioxidante, gerando o chamado estresse oxidativo (JUNIOR et al., 2013).

Um dos exemplos de músculo estriado esquelético é o diafragma (Figura 1), que é encontrado apenas em mamíferos e é considerado o músculo mais importante da respiração, servindo de fronteira entre as cavidades torácica e abdominal (LESSA et al., 2012). Pela sua grande importância no processo respiratório e pela sua contínua atividade rítmica, suas fibras têm que ser muito resistentes à fadiga, sendo utilizadas na respiração silenciosa principalmente as fibras lentas; as fibras rápidas, por sua vez, são recrutadas quando ocorre aumento da frequência respiratória (POLLA et al., 2004). A proporção de fibras rápidas nos músculos respiratórios é maior em animais pequenos, como ratos e camundongos, do que em humanos ou animais maiores, podendo ser devido à taxa de ventilação que diminui de pequenos para grandes animais (MIZUNO, 1991). O diafragma pode ser dividido em três regiões diferentes: a esternal e costal, que em animais experimentais apresentam uma distribuição em mosaico muito uniforme das fibras tipo I, IIa e IIb, e a região lombar, que mostra uma porcentagem maior de fibras tipo I e menor de fibras tipo IIb na porção mais próxima da cavidade torácica e, na região mais próxima à cavidade abdominal, tem-se menor porcentagem de fibras tipo I e maior de fibras tipo IIb (REID; SHANKS; SAMRAI, 1997).

Figura 1 – Vista inferior do músculo diafragma



Fonte: www.saludconsultas.com (2018).

3.2 Obesidade

A obesidade tornou-se uma preocupação mundial a partir da década de 1990 (VEDANA et al., 2008), e desde então a sua prevalência tem aumentado muito rapidamente em todo o mundo (AUNE et al., 2016), o que faz com que se constitua um dos principais problemas que a saúde pública enfrenta nas sociedades modernas (PIMENTA et al., 2015). Por esse motivo, ela vem sendo tratada como uma epidemia, pois dados globais mostram que seu aumento varia na população atingindo todas as faixas etárias, raças e classes socioeconômicas (BERNARDES et al., 2009; POLESE; SILVA, 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre cinco e 19 anos estavam acima do peso ou obesas em 2016, e mais de 1,9 bilhão de adultos apresentavam excesso de peso; destes, mais de 650 milhões se classificavam como obesos (WHO, 2017).

Essa doença pode ser compreendida basicamente como a quantidade excessiva de gordura em deposição no organismo (POLESE; SILVA, 2016), ou,

mais precisamente, como uma condição na qual o percentual de gordura corporal aumenta a ponto de prejudicar a saúde e o bem-estar (LORENZO et al., 2016).

A obesidade é considerada uma condição de origem multifatorial, sendo provocada por vários eventos, tais como: distúrbios comportamentais (PIMENTA et al., 2015), predisposição genética, que se apresenta em diferentes graus (BLAKEMORE; BUXTON, 2014), e alterações endócrinas, metabólicas e psicológicas (RAVELLI et al., 2007).

Para o controle do balanço entre ingestão e gasto corporal de energia, existe um complexo sistema biológico comandado pelo sistema nervoso central, com neurônios localizados no hipotálamo (SANT'ANA; CAIADO; SILVA, 2014), que, por meio de conexões neuroendócrinas, recebem sinalização dos hormônios leptina e insulina sobre o estoque de gordura no organismo e induzem respostas apropriadas para a manutenção desses estoques (SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). Quando ocorrem falhas nesse sistema, como desequilíbrios ou alterações provocados por tumores benignos, distúrbios genéticos complexos ou por defeitos de sinalização, ocorrem o surgimento e o agravamento da obesidade, a chamada obesidade hipotalâmica (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010).

Um dos maiores problemas é que a obesidade se mostra uma importante causa de complicações médicas precoces e mortes prematuras (MURARA; MACEDO; LIBERALLI, 2008). Isso ocorre porque o tecido adiposo libera grande número de citocinas e mediadores bioativos envolvidos na inflamação, levando, portanto, o seu excesso ao maior risco de doenças crônicas (OLIVEIRA et al., 2015). Dentre as comorbidades que acompanham a obesidade estão as doenças cardiovasculares, as condições associadas com resistência à insulina, alguns tipos de câncer, a doença da vesícula biliar (GIGANTE; MOURA; SARDINHA, 2009), a osteoartrite, a hipertensão, as neoplasias (AUNE et al., 2016), os problemas respiratórios, os distúrbios do aparelho locomotor, as dislipidemias, a redução da captação de glicose pelo tecido muscular (BERNARDES et al., 2009) e também as dores e os distúrbios musculoesqueléticos (EL-KHANI et al., 2014). Dessa forma, a obesidade é um fator de risco importante para mortalidade dos indivíduos, provocando quase três milhões de mortes anuais no mundo (FINUCANE et al., 2011).

3.3 Modelos de obesidade com animais experimentais

Devido às complicações que a obesidade vem trazendo para a qualidade de vida das pessoas e às limitações éticas existentes no estudo com humanos (NASCIMENTO et al., 2008), modelos experimentais têm sido utilizados para entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade e comorbidades associadas a essa síndrome (KANAKASI; KOYA, 2011). Assim, são muito úteis para a investigação de aspectos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e na progressão de várias disfunções metabólicas (HIGA et al., 2014).

Existem vários modelos de indução de obesidade em roedores (KANAKASI; KOYA, 2011). Dentre esses estão as experiências com uso de dietas hiperlipídicas, que incluem a ingestão de gordura elevada (CASTIGLIONI et al., 2013), e as dietas hipercalóricas (38,5% de carboidratos, 15% de proteínas e 46,5% de gordura), também chamadas de dieta de cafeteria (PRADA et al., 2005), que refletem a variedade de alimentos altamente energéticos e palatáveis que são acessíveis às sociedades ocidentais e culminam para o ganho de peso (EBERTZ et al., 2014).

Existem ainda diferentes modelos de indução da obesidade, como o genético, que são animais nos quais houve mutação gênica, animais transgênicos ou aqueles nos quais se produziu *knock-out* de um ou mais genes (NAGARAJAN et al., 2012). Um dos exemplos são os camundongos *ob/ob* (com mutação no gene *ob*), que codifica a síntese da leptina, promovendo ausência dessa proteína (KEMP et al., 2009), fazendo com que esses animais apresentem quadro de hiperfagia e, conseqüentemente, a obesidade (ROSSINI; SILVA; MORAIS, 2012).

Alguns modelos de indução de obesidade são produzidos por meio da lesão hipotalâmica, com a utilização de dois métodos: lesão elétrica direta ou administração de MSG (VON DIEMEN et al., 2006). O método da lesão elétrica direta utiliza a passagem de corrente elétrica, que promove um aumento da leptina, bloqueando o efeito desse hormônio (CASTRO et al., 2018). No entanto, são encontradas algumas limitações nesse modelo devido à dificuldade de padronizar a localização dos eletrodos e, por conseguinte, o ponto de lesão (SHIMIZU et al., 2003).

Já a lesão hipotalâmica, feita por meio da administração do MSG aplicado no período neonatal, produz várias anormalidades endócrinas e comportamentais resultantes de sua neurotoxicidade (IWASE et al., 2000), resultando em necrose

neuronal dentro dos núcleos pré-ópticos e arqueados do hipotálamo e também na eminencia mediana (DAWSON et al., 1997), desenvolvendo a obesidade, a redução da atividade do sistema nervoso simpático e a disfunção hormonal na vida adulta (PARK et al., 2000). Além disso, nos núcleos arqueados hipotalâmicos, ocorre a liberação do hormônio que estimula a produção do hormônio de crescimento (GHRH), o qual se torna, portanto, reduzido, afetando também a sua concentração (MAITER et al., 1991; SASAKI; KAWAI; OHTA, 1994) e, como consequência, causa retardo de crescimento, inibição do ganho de massa muscular, grande acúmulo de gordura e menor crescimento ósseo (KUBOTA; NAKAGAWA; IGARASHI, 1994), o que torna esse modelo apropriado para o estudo da obesidade hipotalâmica presente nos humanos (BONFLEUR et al., 2015).

Nos roedores em que se administra o MSG, a o surgimento da obesidade ocorre de maneira incomum (BALBO et al., 2007), pois eles apresentam uma ingestão alimentar normal ou reduzida (GUIMARÃES et al., 2015), ocorrendo, desse modo, o desenvolvimento de obesidade independente do aumento da ingestão de alimentos (IWASE et al., 2000). Não obstante, quando comparados a animais não tratados, eles apresentam grande quantidade de gordura corporal e também são mais curtos e leves (SERESS, 1982). Além disso, esses animais apresentam intolerância à glicose, hiperinsulinemia, resistência à insulina (BALBO et al., 2007), redução da atividade da proteína translocadora de glicose (GLUT-4) e do tecido adiposo marrom (NAGATA et al., 2006), hiperleptinemia (DAWSON et al., 1997), função cognitiva alterada, comportamento de ansiedade, mobilidade reduzida, motivação sexual reduzida, padrões de memória alterados, diminuição da atividade do sistema nervoso simpático e disfunção hormonal (GUIMARÃES et al., 2015).

3.4 Efeitos da obesidade no músculo estriado esquelético

O músculo esquelético é um tecido que apresenta uma notável plasticidade, sendo capaz de sofrer remodelações adaptativas substanciais em resposta a vários estímulos, como carga mecânica, hipóxia, nutrição, desuso e doenças (DENIES et al., 2014). Isso acontece porque a função e estrutura muscular são condicionadas por diferentes fatores, tais como a inervação, a atividade proprioceptiva e o desempenho dos ciclos de alongamento/encurtamento, ocorrendo, portanto, caso haja comprometimento de um desses fatores, alterações musculares (RISSI et al., 2016).

No organismo obeso, o músculo esquelético deve cumprir as suas funções altamente complexas geralmente sob condições de aumento de massa corporal ou aumento de gordura corporal, além de atividade reduzida e outras alterações físicas e também hormonais, que estão associadas à obesidade. Nessas condições, os músculos acabam sofrendo alterações morfológicas e também bioquímicas, influenciando o seu desempenho (KEMP et al., 2009).

As alterações morfológicas em músculos estriados esqueléticos são relatadas em estudos com animais alimentados com dieta de cafeteria, promovendo atrofia muscular e redução da área de secção transversal das fibras musculares do músculo gastrocnêmio (SISHI et al., 2010) e também dos músculos semitendíneo (BAYOL; SIMBI; STICKLAND, 2005) e sóleo (ALMEIDA, 2008). Em camundongos ob/ob, relata-se ainda redução da massa muscular e da área de secção transversal de alguns tipos de fibras nos músculos esternocleidomastoideo e extensor longo dos dedos (KEMP et al., 2009).

Os músculos esqueléticos são heterogêneos em sua composição, apresentando constituição de mosaico com diferentes tipos de fibras de propriedades fisiológicas diferentes. A obesidade, todavia, causa comprometimento na capacidade oxidativa dessas fibras, fazendo com que ocorram mudanças em sua composição, podendo ocorrer menor proporção de fibras do tipo I, o que poderia ser prejudicial às funções exercidas pelo músculo (DENIES et al., 2014).

O acúmulo de lipídeos intramusculares também é observado em modelos de indução de obesidade em roedores, tais como aqueles obtidos por meio de dietas ricas em gordura (SILVENNOINEN et al., 2013). Esse acúmulo libera mediadores pró-inflamatórios sistêmicos e locais, como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), os quais, além de provocar inflamação local, quando combinado a fatores mecânicos, acarretam em prejuízos musculoesqueléticos como dores e osteoartrite (EL-KHANI et al., 2014). Em casos mais graves de acúmulo de gordura associado à inflamação e à perda de massa muscular, pode ocorrer a chamada obesidade sarcopênica (LEE, et al., 2015), sendo mais evidente em indivíduos com índice de massa corporal (IMC) superior a 40 kg/m² e com idade mais avançada (SOUZA et al., 2014).

Além disso, o acúmulo de tecido adiposo ao redor da caixa torácica e do abdome promove uma compressão mecânica na caixa torácica, fazendo com que o diafragma, os músculos abdominais e os pulmões sofram redução em seus

tamanhos (TEIXEIRA et al., 2009), levando à restrição da mecânica pulmonar, à diminuição da complacência do sistema respiratório e à diminuição dos volumes e das capacidades pulmonares (DELGADO; LUNARDI, 2011). Ademais, a força muscular respiratória em obesos pode estar reduzida devido à ineficácia dos músculos inspiratórios que trabalham sobrecarregados, aumentando o trabalho respiratório, o consumo de oxigênio e o custo energético (CASTELLO et al., 2007).

Os estudos que abordem os efeitos da obesidade sobre a morfologia e morfometria do músculo diafragma são bem escassos, no entanto, há um estudo com ratos obesos, alimentados com dieta de cafeteria e análise desse músculo, em que se verificou uma redução da porcentagem de colágeno, uma quantidade considerável de gotículas de lipídeos e uma desorganização da linha Z (ULSENHEIMER et al., 2017). Também, relata-se na literatura que ratos *Zucker* obesos por mutação genética sofrem remodelação das fibras do tipo I e IIa no músculo diafragma, tendo como consequência dessa remodelação o aumento da espessura geral desse músculo, o que poder ser benéfico para a geração de força da parede torácica (FARKAS et al., 1994).

3.5 Exercício físico e plataforma vibratória

Tratar pacientes com sobrepeso e obesidade é um desafio para os profissionais da área da saúde e para o próprio indivíduo (COZER; PISCIOLARO, 2012). A redução do peso pode prevenir ou retardar o acometimento de doenças relacionadas à obesidade, sendo esse o principal objetivo quando se inicia o tratamento (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2012). Tais comorbidades reduzem a longevidade e prejudicam a qualidade de vida (MURARA; MACEDO; LIBERALLI, 2008), fazendo com que ocorra a necessidade de modificações de estilo de vida e a adoção de hábitos saudáveis para o combate aos danos causados à saúde (EBERTZ et al., 2014).

Uma forma não farmacológica e economicamente viável para o tratamento da obesidade e das complicações que estão a ela associadas é a prática regular de exercícios físicos (ARAÚJO et al., 2012), que proporciona inúmeros benefícios à saúde, mas que variam de acordo com a intensidade, a duração e a frequência (SILVA et al., 2015). No entanto, a escolha do tipo de atividade física deverá ser orientada de acordo com as preferencias individuais e respeitando as limitações impostas por cada organismo (NOGUEIRA et al., 2012).

Atualmente, existe uma grande diversidade de tipos e modalidades de exercícios, sendo alguns com utilização de equipamentos (SILVA et al., 2015), sendo esses intitulados emagrecedores, fortalecedores de músculos ou fontes de condicionamento físico ideal (SANTOS; RODRIGUES; TRINDADE-FILHO, 2008). Um exemplo de equipamento com modalidade biofísica de exercícios, e que cada vez mais tem sido explorada como uma modalidade de treinamento para melhora da saúde geral, é a PV (YONG; SON; KWON, 2015).

A utilização da vibração sobre o organismo humano vem sendo utilizada como uma forma de terapia ocupacional há, surgindo por volta da década de 1970, (JUNIOR; BARONI; VAZ, 2012), com objetivo de combater a perda óssea e a diminuição muscular causada pela permanência de astronautas no espaço (SILVA et al., 2015).

Sabe-se que a exposição do organismo à vibração por períodos prolongados ou de grande magnitude produzida, por exemplo, por máquinas e alguns objetos traz efeitos prejudiciais, isso porque trabalhadores que ficam expostos a essas condições diariamente desenvolvem desde problemas sensório-motores até cardiorrespiratórios (BATISTA et al., 2007). Entretanto, uma nova visão sobre esse assunto vem sendo estudada, pois foram desenvolvidos aparelhos de vibração, como as PVs, que têm se mostrado muito eficientes na reabilitação e na melhora do desempenho físico (JUNIOR; BARONI; VAZ, 2012).

A PV consiste em um aparelho eletrônico composto por uma base vibratória, que oscila de acordo com amplitude e frequências variáveis (CASIMIRO et al., 2015), em que são produzidos movimentos oscilatórios sinusoidais que geram estímulos mecânicos e aumentam a carga gravitacional, fazendo com que esses estímulos sejam propagados por todo o corpo ou por parte dele (DALTRO; BARRETO; ROSA, 2016). Como a exposição à vibração ocorre por contato das extremidades distais com o aparelho, ela se propaga por vários tecidos antes de chegar aos músculos ou aos ossos que se deseja atingir (BATISTA et al., 2007).

A amplitude de vibração é referida em milímetros (mm) e a frequência, que se refere à taxa de repetições do deslocamento, é medida em Hertz (Hz), sendo correspondente a ciclos por segundo (HALLAL; MARQUES; GONÇALVES, 2010). Os protocolos clínicos descritos para a utilização do aparelho mostram que a frequência pode variar de 5 a 60 Hz, e as amplitudes de 1 a 100 mm, com a

utilização de diversas combinações desses parâmetros, permitindo a chegada de várias condições mecânicas para rotinas terapêuticas (FILHO et al., 2015).

Os benefícios da PV têm sido relatados em alguns estudos que mostram resultados como o aumento na atividade anabólica do osso, especialmente na densidade e na formação óssea, da função neuromuscular, do equilíbrio (SILVA; SCHNEIDER, 2011), na composição corporal, força muscular, saúde cardiovascular (YONG; SON; KWON, 2015), melhora do fluxo sanguíneo, redução de edema, dor articular e muscular, com conseqüente melhora da marcha (DALTRO, BARRETO, ROSA, 2016).

3.6 Efeitos da plataforma vibratória no músculo esquelético

De acordo com a capacidade de remodelação existente no tecido muscular, os exercícios físicos são realizados com direcionamento de acordo com o que se almeja atingir, sendo que suas respostas aos estímulos ocorrem tanto na forma neural quanto morfológica (LEMOS; PEREIRA, 2012). Apesar do uso bastante divulgado da PV no treinamento e na reabilitação, ainda se conhece pouco quais são os efeitos causados no corpo (HALLAL; MARQUES; GONÇALVES, 2010).

Em humanos, quando as PVs são empregadas no treinamento de força e de potência, os resultados mostraram aumento significativo nesses parâmetros e na atividade dos músculos analisados (JONES; FINCH; DUGAN, 2008). O aumento de massa muscular também tem sido observado em indivíduos jovens submetidos à PV (FIGUEROA et al., 2012; MILANESE et al., 2012; ROELANTS et al., 2004).

As vibrações promovidas pela PV causam alterações no comprimento musculotendíneo por meio da transmissão de estímulos mecânicos para receptores sensíveis ao reflexo de estiramento (BACHA et al., 2016). Desse modo, há estimulação dos fusos musculares pelas vibrações mecânicas e mudanças no comprimento das fibras musculares, resultando em alteração neural reflexa com conseqüente contração muscular, por meio do chamado reflexo tônico de vibração (ALBERCROMBY et al., 2007). No entanto, as vibrações também emitem comandos para as fibras inibitórias dos órgãos tendinosos de Golgi (OTG), que são sensíveis as variações nas tensões, havendo assim vibrações sincrônicas na musculatura excêntrica e concêntrica (HALLAL; MARQUES; GONÇALVES, 2010).

Pouco se sabe sobre os efeitos das vibrações na obesidade, porém, pesquisas com animais sugeriram que a exposição crônica a vibrações de corpo

inteiro diminui a adipogênese (MADDALOZZO et al., 2008) e teria também maior potencial para reduzir o tecido adiposo visceral do que, por exemplo, um programa que consiste em treinamento aeróbico combinado a treinamento de resistência em adultos obesos (VISSERS et al., 2010).

Na literatura são escassos estudos que investiguem a morfologia e morfometria muscular, após treinamento em PV, sendo ainda maior no que se refere ao músculo diafragma. No estudo de Reid, Shanks e Samrai (1997), com análise da morfologia da região costal desse músculo, mas com a realização de exercício de natação, não foram encontradas diferenças significativas quando verificada a área de secção transversal das fibras musculares e também a porcentagem dos tipos de fibras. Com relação à musculatura estriada esquelética de obesos e à realização de tratamento com a PV, existe uma lacuna ainda maior na literatura. Luciano e Mello (1999), em trabalho que analisou o músculo diafragma de ratos diabéticos experimentais, observaram redução nos níveis de proteínas totais desse músculo, apresentando melhora desses parâmetros após a realização de tratamento com exercício de natação.

Diante disso, considerando a problemática da obesidade nos dias atuais, a quase inexistência de trabalhos acadêmico-científicos que estudem os efeitos da PV como possível tratamento para essa doença e, ainda, os seus efeitos na histomorfologia da musculatura estriada esquelética, esta investigação se torna importante e relevante, pois pode apresentar dados e resultados que ajudarão a preencher a lacuna existente no que diz respeito às pesquisas sobre o tema, além de contribuir com discussões relacionadas à obesidade e ao enfrentamento dessa doença.

ARTIGO CIENTÍFICO 01

**EXERCÍCIO DE PLATAFORMA VIBRATÓRIA, EFEITOS MORFOLÓGICOS E NO
SISTEMA ANTI-OXIDANTE DO MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATOS OBESOS**

**REVISTA SCIENTIA MÉDICA
NORMAS DA REVISTA: ANEXO 02**

TÍTULO: Exercício de plataforma vibratória, efeitos morfológicos e no sistema anti-oxidante do músculo diafragma de ratos obesos

RESUMO

OBJETIVO: Investigar os efeitos da plataforma vibratória sobre parâmetros morfológicos e no sistema anti-oxidante do músculo diafragma de ratos *Wistar*, com indução de obesidade por glutamato monossódico (MSG).

MÉTODOS: 28 animais foram inicialmente divididos em dois grupos. Um grupo foi submetido ao protocolo de indução de obesidade, por meio da administração do MSG durante os cinco primeiros dias de vida, enquanto o outro grupo foi chamado de grupo controle, recebendo apenas solução salina. Aos 70 de idade, os grupos foram subdivididos e foi iniciado o treino com plataforma vibratória durante oito semanas, constituindo os grupos controle (GC), controle plataforma vibratória (GCP), obeso (GO) e obeso plataforma vibratória (GOP). Ao final do período experimental, quando os animais estavam com 130 dias de vida, ocorreram a eutanásia e a retirada do músculo diafragma. O antímero direito do músculo foi preparado para as análises histológica, quantificação das proteínas totais e estresse oxidativo.

RESULTADOS: O músculo diafragma é caracterizado como misto, pois, em condições normais, tem uma distribuição uniforme dos diferentes tipos de fibras musculares (I, IIA e IIB). Os animais obesos exibiram redução na área de secção transversal das fibras tipo IIA, IIB e nas proteínas totais; quanto às enzimas do estresse oxidativo, houve redução na atividade da Catalase e aumento da glutathione S-transferase. Já nos animais treinados em plataforma vibratória, observou-se uma redução na quantidade de fibras do tipo IIB, inferindo-se possíveis efeitos deletérios na capacidade contrátil de força e também aumento na atividade da enzima glutathione S-transferase, o que também foi verificado no grupo de

associação dos fatores obesidade e treino com plataforma vibratória, além de redução na atividade da glutatona redutase.

CONCLUSÕES: O treino com plataforma vibratória não alterou parâmetros morfológicos e metabólicos do músculo diafragma dos animais obesos MSG; por isso, novos estudos são necessários para se comprovar os efeitos do exercício de vibração de corpo inteiro no principal músculo respiratório.

DESCRITORES: estresse oxidativo; exercício; obesidade hipotalâmica, tecido muscular.

INTRODUÇÃO

O acúmulo excessivo ou anormal de gordura da obesidade tem sido associado a inúmeras comorbidades e complicações médicas, sendo considerado um importante problema de saúde pública [1]. Dentre os prejuízos à saúde, destacam-se as doenças cardiovasculares, o diabetes tipo 2 e vários tipos de cânceres [2]. Verifica-se, assim, que a obesidade compromete a saúde e as atividades diárias do indivíduo, o que torna a perda de peso uma necessidade na recuperação da qualidade de vida [3].

A prática regular de atividade física vem, há muito tempo, sendo apontada como fator positivo associado à saúde [4], e seus benefícios são amplamente reconhecidos, contribuindo na prevenção e no controle de doenças, como a obesidade e as suas comorbidades [5]. A atividade física planejada, estruturada e repetitiva, que caracteriza o exercício físico [6], traz inúmeros benefícios à saúde, como a melhora no condicionamento físico, a diminuição da perda de massa óssea e muscular, a melhora na aptidão cardiorrespiratória e o aumento da força, da coordenação e do equilíbrio [7].

Os movimentos corporais proporcionados pelo exercício físico resultam em gasto energético acima dos níveis de repouso [8]. Silva et al. [9] destacam a diversidade de tipos e

modalidades de exercícios, incluindo atividades nas quais se utilizam equipamentos, como os que produzem vibração, no caso das plataformas vibratórias, bastante populares no treinamento em academias [10].

A plataforma vibratória (PV, doravante) produz vibrações de corpo inteiro que causam alterações no comprimento musculotendíneo, por meio da transmissão de estímulos mecânicos para receptores sensíveis ao reflexo de estiramento, levando à estimulação dos fusos musculares, o que resulta em atividade neural reflexa com consequente contração muscular [11]. Esse mecanismo fisiológico promove o aumento do gasto energético e, consequente, a elevação da queima calórica [12]. Quando empregadas no treino de força e de potência, as vibrações mostram aumento nesses parâmetros, o que proporciona melhora no desempenho físico, na reabilitação física [13] e no aumento de massa muscular [14].

Em condição de obesidade, o sistema muscular é comprometido, isso porque os músculos inspiratórios - em especial, o diafragma - recebem profundas influências e trabalham sobrecarregados, o que pode acarretar em redução de força respiratória [15]. Dessa forma, é de suma importância o treinamento da musculatura na melhora da resistência, sendo que o exercício com a PV pode se tornar vantajoso pelos efeitos na melhora das funções respiratórias e na sua ação sistêmica que proporciona [16].

Poucos são os estudos que investigam as influências de exercícios físicos na estrutura morfológica do músculo inspiratório diafragma, que está localizado entre as cavidades abdominal e torácica e é considerado o mais importante no ato da respiração [17]. Reid et al. [16] analisaram a morfologia do diafragma utilizando exercício de natação; contudo, não foram observadas diferenças significativas na área de secção transversal das fibras musculares e também na porcentagem dos tipos de fibras, mostrando que seu efeito no diafragma parece ser menor do que outras intervenções, como a corrida em esteira ou a carga resistida inspiratória. Luciano e Mello [18], por sua vez, verificaram nos diafragmas de ratos diabéticos

uma redução nos níveis de proteínas totais, com melhora nesse parâmetro, após a realização de exercício de natação. Mesmo que a natação, também considerada um exercício aeróbico envolvendo os membros, assim como ocorre com a PV [19], tenha apresentado dados relevantes, esses ainda são controversos.

Diante desse contexto, foram investigados os efeitos da PV sobre parâmetros morfológicos e do sistema antioxidante do músculo diafragma em modelo experimental, ratos *Wistar*, com indução de obesidade por glutamato monossódico (MSG).

MÉTODOS

Animais experimentais

Um total de 28 ratos *Wistar*, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), foi mantido no biotério setorial do laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, sob condições de luminosidade (ciclo claro/escuro 12 h) e temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas. Os animais foram mantidos em gaiolas padrão (41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 17 cm de altura), com acesso à ração padrão para roedores (BioBase, Santa Catarina, SC, Brasil) e à água *ad libitum*.

Todos os experimentos relatados neste estudo foram conduzidos de acordo com a legislação nacional e internacional [diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e da Política de Atenção Humanitária e Uso de Animais de Laboratório (Política de PHS)] e com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo nº 08/18).

Grupos Experimentais

Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos: controle (GC, n=14) e obeso (GO, n=14), submetido ao protocolo de indução de obesidade. Durante os cinco primeiros dias de vida, os filhotes GO receberam injeções de MSG, em dose de 4 mg/g de peso corporal e, para passar pelo mesmo estresse. O GC recebeu solução salina subcutânea em dose de 1,25 mg/g de peso [20]. O dia do nascimento foi considerado o dia zero, sendo iniciadas as aplicações das injeções no dia um.

Aos 70 dias de idade, foi iniciado o treinamento com a PV, fazendo com que ambos os grupos fossem subdivididos em mais dois: grupo controle submetido à plataforma vibratória (GCP, n=7) e grupo obeso submetido à plataforma vibratória (GO, n=7).

Protocolo do treino na plataforma vibratória

A plataforma vibro-oscilatória comercial, da marca Vibro Oscilatória Arktus triplanar profissional, foi utilizada nos treinos, realizados três vezes por semana com duração de 10 minutos, durante oito semanas consecutivas. O protocolo do exercício foi adaptado a uma frequência de 60 Hz, com amplitude de dois milímetros [21].

Os animais foram posicionados e contidos sobre a PV com o uso de um suporte de madeira de placa de fibra de média densidade (MDF) adaptado, da cor branca, com compartimentos de 13 cm de largura, 19 cm de comprimento e altura de 25 cm. Em cada treino, foi realizado rodízio no posicionamento dos animais nos compartimentos, para minimizar os vieses decorrentes da diferença da amplitude de vibração nas áreas distintas da plataforma.

Coleta do músculo diafragma

Aos 130 dias de idade, após o término dos treinos com a plataforma vibratória, os animais foram dessensibilizados em câmara de CO₂ e eutanasiados com auxílio de guilhotina. Os animais foram mantidos em posição ventral e uma incisão na região mediana foi realizada logo abaixo do tórax, com o posterior rebatimento da pele e dos músculos. A retirada do diafragma consistiu apenas em sua parte costal, sendo dividida em antímero direito e esquerdo.

Análise histoenzimológica

Uma amostra do antímero direito do músculo diafragma foi mantido em temperatura ambiente durante um período de 30 a 40 minutos. Após esse tempo, a amostra foi coberta com talco neutro e congelada em nitrogênio líquido para posterior armazenagem em Biofreezer a -80°C. No processamento, as amostras musculares congeladas foram transferidas para uma câmara de criostato (LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome) a -30°C e mantidos durante 30 minutos. Em seguida, essas amostras tiveram uma de suas extremidades colada a um suporte metálico, utilizando Tissue Freezing Medium (Leica – Jung – Germany), e seccionada transversalmente a 7 µm de espessura.

As secções transversais foram submetidas à reação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Tetrazolium Redutase (NADH-TR), conforme técnica de Pearse [22], modificada por Dubowitz e Booke [23], que permite a análise do metabolismo oxidativo e glicolítico dos três tipos de fibras musculares. Com esse material foi realizada a quantificação dos três tipos de fibras e também a mensuração de suas respectivas áreas de secção transversal, por meio do programa Image Pro Plus 6.0[®] (Media Cybernetics, Maryland, USA), sendo utilizados para cada animal quatro campos microscópicos (objetiva de 20X).

Análise do estresse oxidativo

Na análise do estresse oxidativo, a outra parte da amostra do antímero direito do músculo diafragma foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C , para posterior homogeneização. As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão Tris HCl pH 7.4 e centrifugadas a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos, em uma temperatura de 4°C . A quantificação de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford et al. [24], utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todas as amostras foram então normalizadas para 1 mg de proteína/mL.

Para avaliar a dosagem enzimática, associada ao sistema antioxidante, foram analisadas a atividade da Superóxido Dismutase (SOD), a atividade da Catalase (CAT), a reação de Lipoperoxidação (LPO), a atividade da Glutathione S-Transferase (GST) e a atividade da Glutathione Redutase (GR).

No caso da SOD, utilizou-se o método proposto por Crouch et al. [25] modificado. O princípio dessa análise consiste em quantificar o complexo formado entre superóxido e azul de tetrazolium (NBT), mensurada a 560 nm durante 1h30min. Uma alíquota de 0,75 mg/mL de proteína em etanol 25% foi preparada em volume de 800 μL e centrifugada a 12000 rpm (4°C) durante 20 minutos. A partir do sobrenadante, o meio de reação foi preparado em microplaca de 96 poços, em triplicatas, com volume final de 200 μL , contendo 0,1 mg de proteína. mL^{-1} , 0,09 mM de NBT, 0,015 mM de EDTA, 34,78 mM de sulfato de hidroxilamina, 79 mM de tampão carbonato de sódio pH 10,2 e a placa lida a 22°C , e uma unidade de SOD em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

A atividade da CAT foi acompanhada pelo decréscimo da absorvância a 240 nm [26], a partir do princípio de dismutação do peróxido, cujo coeficiente de extinção molar é de $40\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. As duplicatas, em 2 mL de solução, em uma cubeta de quartzo, apresentaram concentração final de 0,01 mg de proteína. mL^{-1} , sendo que o meio de reação apresentou

concentrações finais de 13,5 mM de H₂O₂, 50 mM de TRIS-HCl pH 8,0 e 0,25 mM de EDTA. Os resultados da atividade da enzima catalase foram expressos em mmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A determinação da reação de LPO foi realizada com objetivo de quantificar indiretamente os peróxidos, refletindo assim a intensidade da peroxidação lipídica. Foi realizado o método de ácido tiobarbitúrico (TBARS) [27], a partir de comparações de absorvância com curva de padrões de Malondialdeído (MDA), principal subproduto de peroxidação lipídica celular. Para preparação da amostra, o meio, contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína da amostra em ácido tricloroacético 6,7% em volume final de 180 µL, foi agitado em vórtex, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm a 4°C. Para a dosagem das substâncias reativas ao TBARS, 40 µL do sobrenadante, assim como de diferentes concentrações de MDA, foram adicionados em microplaca, em triplicata, a meio de reação, contendo 21,42 mM de TBA, 17,86 mM de NaOH (utilizado para solubilização do TBA), 0,73 M de TCA, 0,032 mM de BHT, etanol 3% (utilizado para solubilização do BHT) em PBS. A leitura da reação foi realizada a 22°C; após 60 minutos de incubação, a 60°C, em uma absorvância de 535 nm. Os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

A avaliação de detoxificação foi realizada pela análise da atividade da enzima GST. Com a metodologia de Keen e Jakoby [28], a atividade dessa enzima foi mensurada durante 5 minutos, em intervalos de 30 segundos, avaliando-se o aumento da absorvância devido a formação de um tioéter, a uma absorvância de 340 nm. A composição de reação é tampão fosfato de potássio pH 6,5, GSH 1,5 mM, CDNB 2 mM em 1 mL de etanol. A atividade da GST é expressa em µmoles de tioéter.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A atividade da GR foi avaliada de acordo com a técnica proposta por Sies [29]. O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) EDTA 1 mmol.L⁻¹

¹, GSSG 0,66 mmol.L⁻¹, NADPH 0,075 mmol.L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada durante 5 minutos a 340 nm. Os resultados foram expressos em NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Análises estatísticas

No caso do NADH, os dados foram expressos em média ± desvio padrão da média. Para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dois fatores. Quando f for significativo, as diferenças entre as médias foram avaliadas com valor de p corrigido para *Tukey*. Os valores com p<0,05 foram considerados significativos. O *software* utilizado para as análises estatísticas foi o *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (*GraphPad Software*©) (La Jolla, USA).

Para os dados da atividade das enzimas do estresse oxidativo, foi realizado o teste de respostas biológicas integradas versão 2 (IBR2), que combina valor matemático com resultado gráfico e foi aplicado neste estudo com base na avaliação das atividades enzimáticas do sistema antioxidante de forma conjunta [30]. O processamento de dados foi o seguinte:

$$A_i = \frac{1}{Z_i} \left(\frac{Z_i - Z_0}{Z_i} \right) \left(\frac{\delta Y_i - \mu}{s} \right) \log X_i = X_0 \delta P$$

A_i , Z_i , Z_0 , μ , s , X_i , e X_0 representaram o índice de desvio do biomarcador, a média da resposta padronizada do biomarcador, a média dos dados do biomarcador de referência, a média geral de Y_i , o desvio padrão de Y_i , os dados individuais do biomarcador e os dados médios de referência, respectivamente.

Para cada fator separado, os parâmetros são relatados em um gráfico em estrela para representar o desvio de referência de cada atividade enzimática investigada. Os valores acima

de zero representam a indução da enzima, e os valores abaixo de zero indicam inibição da atividade enzimática.

RESULTADOS

O estudo histoenzimológico da atividade da NADH-TR revelou a presença de fibras musculares dos tipos I (pequeno diâmetro e intensa atividade oxidativa), IIA (diâmetro médio e atividade oxidativa moderada) e IIB (grande diâmetro e baixa atividade oxidativa) em todos os grupos estudados (Figuras 1A - D).

A área de secção transversal das fibras musculares mostrou redução de 21% nas fibras do tipo IIA ($F_1 = 6,44$; $p = 0,02$) e de 31% no tipo IIB ($F_1 = 11,35$; $p = 0,002$) nos grupos GO e GOP quando comparados ao GC e ao GCP (Figuras 2B e 2C). Na área das fibras do tipo I, não foi verificada diferença significativa entre os grupos estudados e não houve interação entre os dois fatores, obesidade e plataforma ($F_{1,3} = 0,41$; $p = 0,53$) (Figura 2A).

Com relação à contagem do número dos diferentes tipos de fibras musculares, nos animais do GCP e do GOP foi observada redução de 21% apenas no tipo IIB ($F_1 = 7,66$; $p = 0,01$), quando comparados aos grupos GC e GO (Figura 2F). Nas análises da contagem dos tipos I e IIA, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos estudados e também não houve interação entre os fatores obesidade e plataforma (fibra tipo I – $F_{1,3} = 0,75$; $p = 0,40$; fibra tipo IIA – $F_{1,3} = 0,04$; $p = 0,84$) (Figuras 2D e 2E).

A quantificação de proteínas totais nas amostras, nos grupos GO e GOP, apresentou valores médios menores ($F_1 = 6,96$; $p = 0,01$) do que os grupos GC e GCP. A análise do efeito do treino em PV não revelou diferença ($F_1 = 0,18$; $p = 0,67$) ou interação entre os fatores obesidade e PV ($F_{1,3} = 0,17$; $p = 0,68$) (Figura 3).

Por meio do teste de IBR2, foi possível verificar a atividade das enzimas do sistema oxidativo, observando-se que a GST teve uma maior ativação na obesidade e também no treino em PV, assim como na associação entre esses fatores (Figuras 4A, 4B e 4C). Além disso, a atividade da CAT sofreu uma pequena redução em condição de obesidade (Figura 4B) e a enzima GR teve sua atividade reduzida na associação dos fatores obesidade e plataforma vibratória (Figura 4C). Por outro lado, na avaliação da enzima SOD e na reação de LPO, não foram observadas diferenças em nenhum dos fatores avaliados (Figuras 4A, 4B e 4C).

DISCUSSÃO

A administração do MSG nos animais em seu período neonatal causa lesões nos núcleos arqueados hipotalâmicos, resultando em uma destruição de 70 a 90% de corpos celulares neurais, sendo um dos prejuízos à diminuição da secreção do hormônio do crescimento (GH) [31], o qual, por sua vez, demonstra ser mediador do metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas nos tecidos do corpo, assim como nos processos de crescimento [32]. Devido à sua relação com a síntese proteica, a diminuição na concentração desse hormônio leva à deficiência de proteínas [33], corroborando com os resultados deste trabalho, considerando que os animais que passaram pela administração do MSG apresentaram redução na análise da quantificação de proteínas totais do músculo diafragma.

Sabe-se que a quantidade de proteínas interfere na área das fibras [34], e que esse modelo, por meio da diminuição da secreção do GH, causa deficiência proteica, prejudicando assim o desenvolvimento do músculo, tendo como consequência a diminuição da área de suas fibras musculares [33], aspecto observado no presente estudo, em que a obesidade, por meio do MSG, levou à redução na área das fibras do tipo IIA e na área das fibras do tipo IIB. Além disso, a resposta das fibras musculares a diferentes estímulos é específica do tipo de fibra,

sendo que é observada mais atrofia das fibras do tipo II do que das fibras do tipo I em condições associadas à perda de massa muscular em doenças [19], o que também corrobora com os achados desta pesquisa.

As fibras musculares têm capacidade de mudar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas [35], e o exercício físico é capaz de promover mudanças nas fibras musculares, alterando essas propriedades, isso porque diferentes tipos de exercícios podem alterar a quantidade de fibras lentas ou rápidas [34]. Quando realizada a contagem do número de cada um dos tipos de fibras musculares, foi observada uma redução apenas nas fibras do tipo IIB, em decorrência da plataforma vibratória. Exercícios de resistência ou aeróbicos, como é o caso da PV, promovem aumento da mioglobina em até 80%, do número e tamanho das mitocôndrias e também da atividade das enzimas oxidativas [36], trazendo uma capacidade metabólica aprimorada e permitindo a garantia da atividade por períodos prolongados sem fadiga excessiva, recrutando mais as fibras do tipo I [20], o que poderia estar associado a uma diminuição no número de fibras do tipo IIB.

Os dados de redução de quantidade de fibras do tipo IIB mostram as adaptações do músculo esquelético submetido ao exercício de plataforma vibratória e revelam uma importante medida de sua plasticidade, que é a elevada capacidade que esse tecido tem de sofrer adaptações tanto estrutural quanto funcionalmente, considerando-se a carga de trabalho, as atividades e também as condições patológicas [37]. A PV, conforme destacam Young et al. [38], traz resultados positivos na condição de um exercício de força; entretanto, os resultados obtidos neste estudo inferem possíveis efeitos deletérios na capacidade contrátil de força do diafragma. Outros estudos com a investigação do músculo diafragma após a realização de exercícios físicos não revelaram diferenças significativas nos parâmetros morfológicos de porcentagem e área de secção transversal das fibras musculares [16]. Com isso, verifica-se a

necessidade de novos estudos variando-se o tempo de intervenção, bem como o nível de intensidade do exercício com a PV.

No que diz respeito ao metabolismo oxidativo, tem-se discutido na literatura que a obesidade causa aumento da peroxidação lipídica e diminuição das enzimas citoprotetoras, tendo como consequência o dano celular progressivo gerado pelo estresse oxidativo [39]. No presente estudo, foi observada redução na atividade da CAT em detrimento da obesidade, corroborando com o estudo de Antunes Neto e Paula [40] com homens obesos e sedentários, no qual também se verificou redução na atividade dessa enzima. Devido ao importante papel da CAT no processo de quebra do peróxido de hidrogênio, que se encontra aumentado pela obesidade, a diminuição em sua atividade causa, conseqüentemente, a redução na eficiência do sistema de defesa antioxidante e aumenta a probabilidade de crescimento no estresse oxidativo [41].

Algumas das enzimas que compõe o sistema de defesa antioxidante parecem funcionar de forma integrada, sendo que à medida que a atividade de uma vai aumentando, a atividade de outra diminui, como é o caso das Glutationas e da Catalase [42]. Isso corrobora com o observado neste estudo, pois, nos animais obesos, ao contrário da Catalase, a atividade da Glutationa S-Transferase se apresentou aumentada, podendo ter ocorrido como uma ação protetora das células, devido à sua ação detoxificante, muito importante no combate ao estresse oxidativo [43].

Sabe-se que alta atividade muscular, promovida por exercícios físicos, leva ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) [44]; porém, exercícios regulares realizados em intensidade moderada são conhecidos por diminuir um estado pró-inflamatório no organismo, podendo reforçar as defesas antioxidantes por meio da adaptação ao estresse oxidativo [45]. Quando analisada a atividade da GST nos animais treinados em

PV, essa se apresentou aumentada, podendo ser uma adaptação para o combate do estresse oxidativo inicialmente causado pelo exercício em plataforma.

O mesmo resultado de aumento na atividade da GST foi observado no grupo com animais obesos e treinados em PV, indicando que os dois fatores juntos também têm influências sobre a atividade dessa enzima. Entretanto, esse mesmo grupo apresentou redução na atividade da GR, mostrando que a associação de ambos os fatores tem interferência também sobre a atividade dessa enzima. Corroborando com os resultados deste estudo, Watson et al. [46] observaram a redução dessa enzima em ratos obesos ob/ob, e Prada et al. [47] relatam redução de GR em ratos submetidos a treinamento com natação, não sendo encontrados trabalhos de análise da atividade dessa enzima com ambos fatores associados. A queda na atividade da GR pode estar relacionada à diminuição na nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) proveniente dos ciclos da pentose [48], pois estudos mostram que alguns exercícios físicos, dependendo de sua intensidade, reduzem a concentração do NADPH, que é um dos substratos da GR, sem a qual a reação catalisada por essa enzima não acontece [49].

Na análise da atividade da SOD e da reação de LPO, não foram observadas diferenças em nenhum dos fatores avaliados. Estudos com análise dos efeitos da PV na atividade das enzimas oxidativas são bem escassos na literatura. Em uma pesquisa que investigou os efeitos do treinamento em PV sobre o estresse oxidativo em animais diabéticos, Liu et al. [50] não encontraram diferenças na atividade de SOD, mas o exercício foi capaz de diminuir a LPO [50]. Entretanto, o protocolo utilizado por Liu et al. [50] foi diferente do presente estudo, e o músculo em análise também, o que pode ter interferido na diferença de resultados.

Com base nos resultados supracitados, conclui-se que a obesidade por meio do MSG causou a redução das proteínas totais do músculo diafragma, assim como a diminuição na área das fibras do tipo IIA e IIB e nas enzimas no sistema de defesa antioxidante. Além disso,

compreende-se que o treinamento com a PV parece não ser um recurso muito recomendado, visto que não conseguiu reverter os efeitos causados pela obesidade.

REFERÊNCIAS

1. Sande-lee SV, Velloso LA. Disfunção hipotalâmica na obesidade. Arq Bras Endocrinol Metab. 2012;56[6]:341-50. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302012000600001>
2. Aune D, Sen A, Prasad M, Norat T, Janszky I, Tonstad S, Romundstad P, Vatten LJ. BMI and all cause mortality: systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 milion deaths among 30.3 million participants. Braz J Microbiol 2016;353[2156]:1-17. <http://doi.org/10.1136/bmj.i2156>
3. Zottis C, Souza RHS, Burin DAP. Gastroplastia: uma alternativa para a qualidade de vida no tratamento da obesidade mórbida. [Fortaleza]: Congresso Brasileiro de Enfermagem; 2002. 54 p.
4. Pucci GCMF, Rech CR, Fermino RC, Reis RS. Associação entre atividade física e qualidade de vida em adultos. Rev Saúde Pública 2012;46[1]:166-79. www.scielo.br/rsp
5. Jesus GM, Jesus EFA. Nível de atividade física e barreiras percebidas para a prática de atividades físicas entre policiais militares. Rev Bras Ciênc Esporte 2012;34[2]:433-48. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-32892012000200013>
6. Nogueira IC, Santos ZMSA, Mont'Alverne DGB, Martins ABT, Magalhães CBA. Efeitos do exercício físico no controle da hipertensão arterial em idosos: uma revisão sistemática. Rev Bras Geriatr Gerontol 2012;15[3]:587-601. <http://dx.doi.org/10.1590/S1809-98232012000300019>
7. Paes ST, Marins JCB, Andreazzi AE. Efeitos metabólicos do exercício físico na obesidade infantil: uma visão atual. Rev Paul Pediatr 2015;33[1]:122-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpped.2014.11.002>
8. Pitanga FG, Beck CC, Pitanga CPS, Freitas MM, Almeida LAB. Prevalência e fatores sociodemográficos e ambientais associados a atividade física no tempo livre e no deslocamento em adultos. Motricidade 2014;10[1]:3-13. [http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.10\(1\).1246](http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.10(1).1246)

9. Silva U, Fontela PC, Bonamigo ECB, Winkelmann ER. Efeitos a curto prazo da plataforma vibratória e oscilatória em indivíduos saudáveis. *Cien Saúde* 2015;8[3]:99-103. <http://dx.doi.org/10.15448/1983-652X.2015.3.20882>
10. Giero M. Eficácia da plataforma vibratória na gordura localizada. *Rev Maiêutica* 2017;1[1]:41-54.
11. Bacha JMR, Cordeiro LR, Alvisi TC, Bonfim TR. Impact of sensorimotor training with whole body vibration platform on balance and functional mobility of an elderly individual after a stroke: case report. *Fisioter Pesq* 2016;23[1]:111-6. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-2950/14362423012016>
12. Bianchetti P, Sulzbach C, Kollet F, Blau M, Tassinary JAF, Sinigaglia G. Utilização de radiofrequência, terapia combinada, drenagem linfática manual e plataforma vibratória em hipotonia tissular e adiposidade localizada: estudo de caso. *Caderno pedagógico* 2015;12[3]:140-9. <http://www.univates.com.br/revistas/index.php/cadped/article/view/975>
13. Jones DMB, Finch HW, Dugan EL. Comparing the effects of various whole-body vibration accelerations on counter-movement jump performance. *J Sport Sci Med* 2008;7:144-50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763339/>
14. Figueroa A, Gil R, Wong A, Hooshmand S, Park SY, Vicil F, Sanchez-Gonzalez MA. Whole-body vibration training reduces arterial stiffness, blood pressure and sympathovagal balance in young overweight/obese women. *Hypertension Research* 2012;35:667-72. <https://www.researchgate.net/publication/221854165>
15. Castello V, Simões RP, Bassi D, Mendes RG, Borgui-Silva A. Força muscular respiratória é marcadamente reduzida em mulheres obesas mórbidas. *Arq Med ABC* 2007;32[2]:74-7. <https://www.portalnepas.org.br/amabc/article/view/186>
16. Reid WD, Shanks J, Samrai B. Regional and fiber-type percentages and sizes in the hamster diaphragm after swim training. *Physical Therapy* 1997;77[2]:178-86. <https://academic.oup.com/ptj/article-abstract/77/2/178/2633155>
17. Lessa TB, Constantino MVP, Silva LCS, Santos PRS, Neto ACA, Miglino MA, Bombonato PP, Ambrósio CE. Descrição morfológica do diafragma de sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). *Pesq Vet Bras* 2012;32[6]:553-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000600014>
18. Luciano E, Mello MAR. Efeitos do exercício físico crônico sobre as proteínas no diafragma de ratos diabéticos. *Motriz* 1999;5[2]:146-51. <https://doi.org/10.5016/8729>

19. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015;96:183-95. <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
20. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969;164:719-21. <http://dx.doi.org/10.1126/science.164.3880.719>
21. Butezloff MM, Zamarioli A, Leoni GB, Sousa-neto MD, Volpon JB. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Acta Bras Cir* 2015;30:727-35. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150110000002>
22. Pearse AGE. *Histochemistry: theoretical and applied*. 3rd ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1972.
23. Dubowitz V, Brooke M. *Muscle biopsy: a nerv approach*. 1st ed. London: Saunders; 1973.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;16:248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
25. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GMP, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981;30:235-41. <https://doi.org/10.2337/diab.30.3.235>
26. Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984;105:121-6. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
27. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 1978;52:302-10. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
28. Keen JH, Habig WH, Jakoby WB. Mechanism for the several activities of the glutathione s-transferases. *J Biol Chem* 1976;251[20]:6183-8. <http://www.jbc.org/content/251/20/6183.short>
29. Sies H, Koch OR, Martino E, Boveris A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *Elsevier* 1979;103[2]:287-90. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81346-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81346-0)
30. Sanchez W, Burgeot T, Porcher JM. A novel “integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. *Environ Sci Pollut Res* 2013;20:2721-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
31. Maiter D, Underwood LE, Martin JB, Koenig JI. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing

- hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endo* 1991;128[2]:1100-6. <https://doi.org/10.1210/endo-128-2-1100>
32. Thomas GA, Kraemer WJ, Comstock BA, Dunn-Lewis C, Maresh CM, Volek JS. Obesity, growth hormone and exercise. *Sports Med* 2013;43:839-49. <http://dx.doi.org/10.1007/s40279-013-0064-7>
 33. Clanton TL, Klawitter PF. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia invited review: adaptive responses of skeletal muscle to intermittent hypoxia: the known and unknown. *J Appl Physiol* 2001;90[6]:2476-87. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.6.2476>
 34. Boff SR. A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo. *Acta Fisiatr* 2008;15[2]:111-6. <http://www.periodicos.usp.br/actafisiatr/article/view/102923>.
 35. Denies MS, Johnson J, Maliphol AB, Bruno M, Kim A, Rizvi A, Rustici K, Medler S. Diet-induced obesity alters skeletal muscle fiber types of male but not female mice. *Physiol Rep* 2014;2[1]:1-11. <http://dx.doi.org/10.1002/phy2.204>.
 36. Bucci M, Vinagre EC, Campos GER, Curi R, Phiton-Curi TC. Efeitos do treinamento concomitante hipertrofia e endurance no músculo esquelético. *Rev Bras Cien Mov* 2005;13[1]:17-28.
 37. Kunz RI, Coradini JG, Rondon CLS, Brancalhão RMC, Bertolini GRF, Ribeiro LFC. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação de natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. *Publ Cien Biol Saúde* 2013;19[2]:123-9. <http://dx.doi.org/10.5212/Publ.Biologicas.v.19i2.0005>
 38. Young PS, Son WM, Know OS. Effects of whole body vibration training on body composition, skeletal muscle strength and cardiovascular health. *J Exerc Rehabil* 2015;11:289-95. <http://dx.doi.org/10.12965/jer.150254>.
 39. França BK, Alves MRM, Souto FMS, Tiziane L, Boaventura RF, Guimarães A, Alves Junior, A. Peroxidação lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *J Port Gastreterol* 2013;20[5]:199-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>
 40. Antunes Neto JMF, Paula LB. Índices de estresse oxidativo em sujeitos com diferentes níveis de composição corporal e aderência a pratica de atividade física. *Braz J Biol* 2011;5[2]:117-31. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93018957007>
 41. Bausenwein J, Serke H, Eberle K, Hirrlinger J, Joqschies P, Hmeidani FA, Blumenauer V, Spaniel-Borowski K. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of

- catalase activity in follicular fluid of obese women. *Mol Human Reprod* 2010;16[2]:117-24. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap078>
42. Zoppi CC, Antunes-Neto J, Catanho FO, Goulart LF, Moura NM, Macedo DV. Alterações em biomarcadores do estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev Paul Educ Fís* 2003;17[2]:119-30.
43. Torres MCP, Soares NFF, Pereira JAM. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione s-transferase de fígado bovino. *Ciênc Agrotec* 2006;30[2]:302-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542006000200016>
44. Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomol* 2015;5[2]:356-77. <https://doi.org/10.3390/biom5020356>
45. Scholer CM, Zavarize LD, Bock PM. Exercícios físicos no combate ao sobrepeso e obesidade: intensidade versus estresse oxidativo. *Ciênc Mov* 2016;36:71-85.
46. Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome p-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metab Dispos* 1999;27[6]:695-700. <http://dmd.aspetjournals.org/content/27/6/695.short>
47. Prada FJA, Voltarelli FA, Oliveira CAM, Gobatto CA, Macedo DV, Mello MAR. Condicionamento aeróbico e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbico. *Rev Bras Ciênc Mov* 2004;12[2]:29-34.
48. Rover Junior L, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova* 2001;24[1]:112-9. <http://dx.doi.org/10.1590/SO100-40422001000100019>
49. Tauler P, Gimeno I, Aguiló A, Guix MP, Pons A. Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflugers Arch* 1999;438:782-7. <http://doi.org/10.1007/s004249900125>.
50. Liu Y, Zhai M, Guo F, Shi T, Liu J, Wang X, Zhang X, Jing D, Hai C. Whole body vibration improves resistance in db/db mice: amelioration of lipid accumulation and oxidative stress. *Appl Biochem Biotechnol* 2016;179:819-29. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2033-6>.

ILUSTRAÇÕES

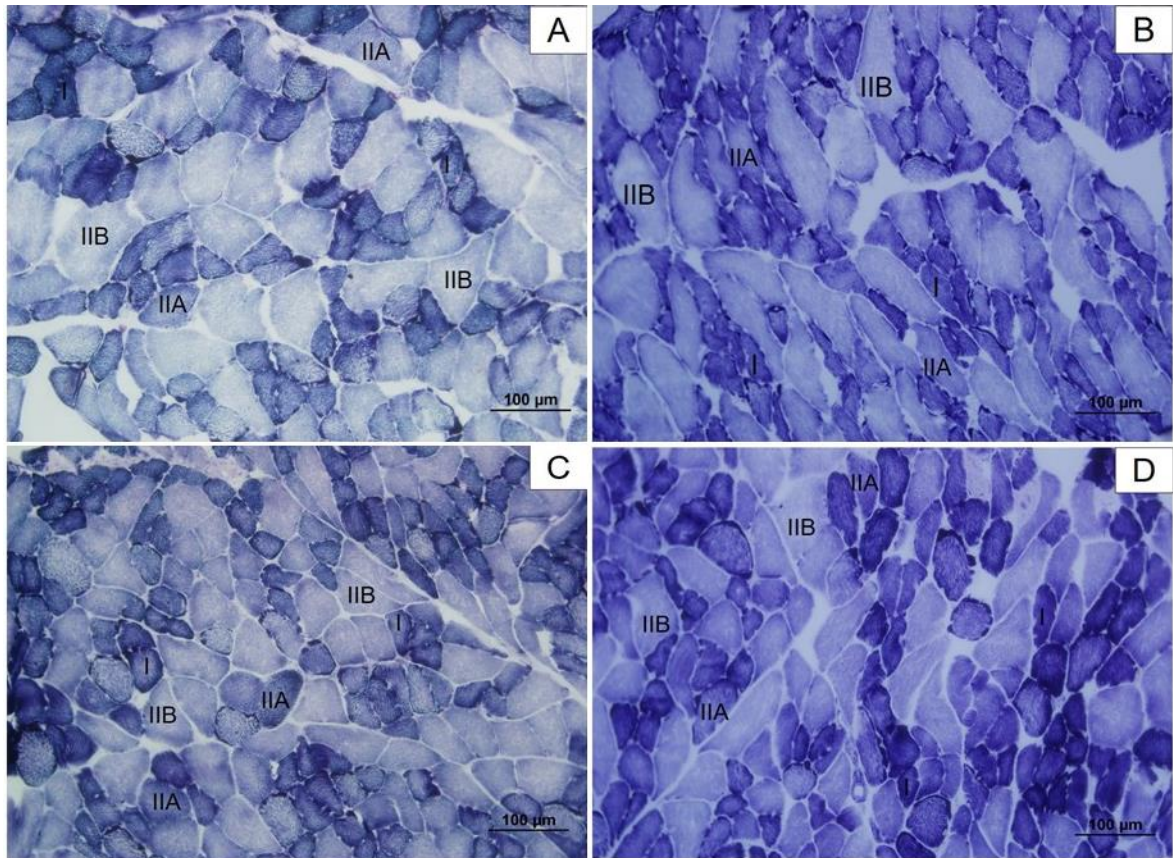


Figura 1. Fotomicrografias do músculo diafragma de ratos *Wistar* com 130 dias de idade. Secção transversal. Fibras musculares dos tipos I, IIA e IIB. Reação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Tetrazolium Redutase (NADH-TR). **A:** Grupo Controle (GC). **B:** Grupo controle exercitado em plataforma vibratória (GCP) **C:** Grupo obeso (GO). **D:** Grupo obeso exercitado em plataforma vibratória (GOP).

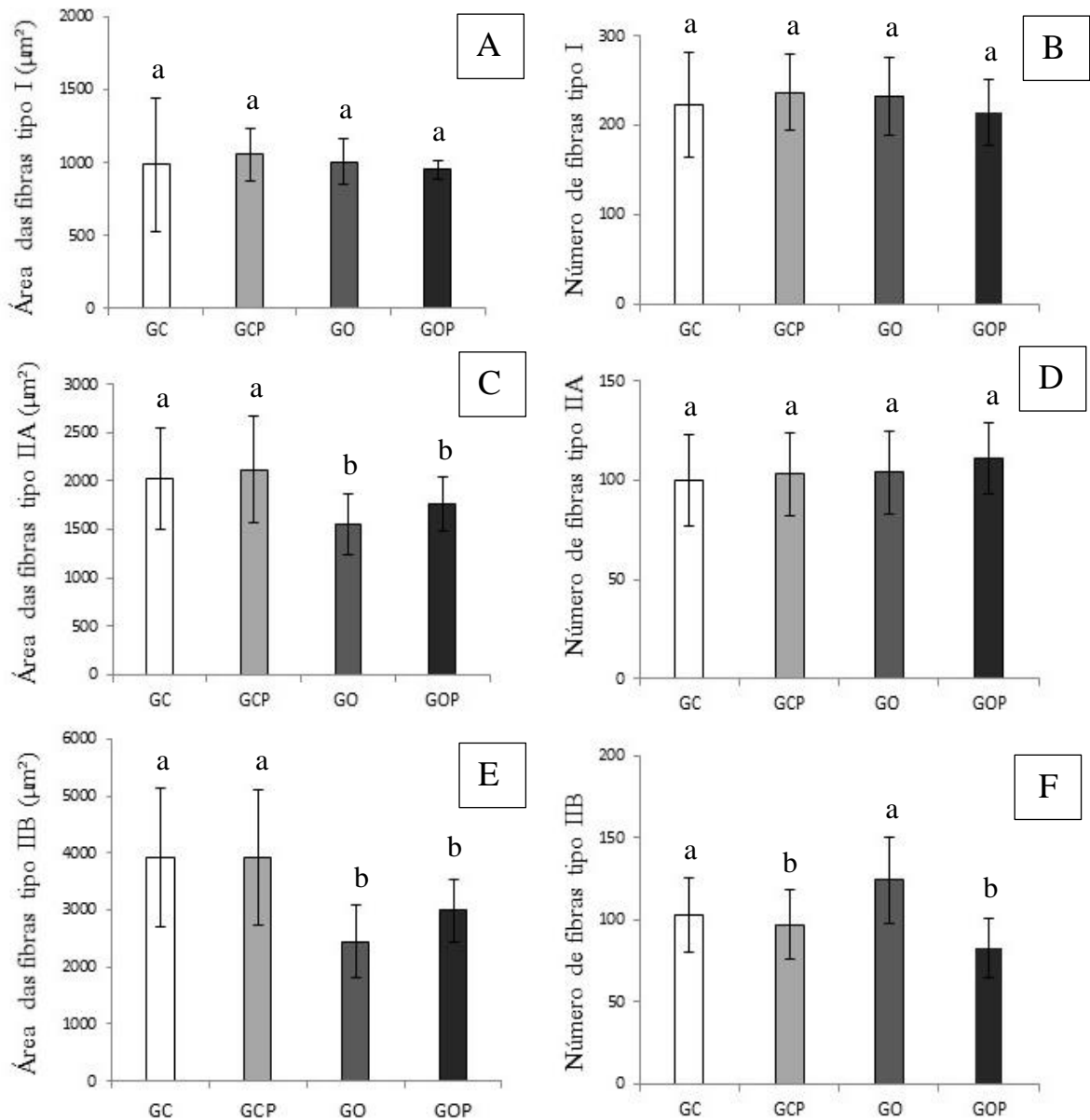


Figura 2. Análise morfométrica das fibras musculares do músculo diafragma de ratos *Wistar* com 130 dias de idade nos grupos controle (GC), treinado em plataforma vibratória (GCP), obeso (GO) e obeso treinado em plataforma vibratória (GOP), respectivamente. **A:** área das fibras do tipo I. **B:** área das fibras do tipo IIA. **C:** área das fibras do tipo IIB. **D:** número de fibras do tipo I. **E:** número de fibras do tipo IIA. **F:** número de fibras do tipo IIB. Valores expressos como média e desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas. Teste de análise de variância Two-way ANOVA ($p < 0,05$).

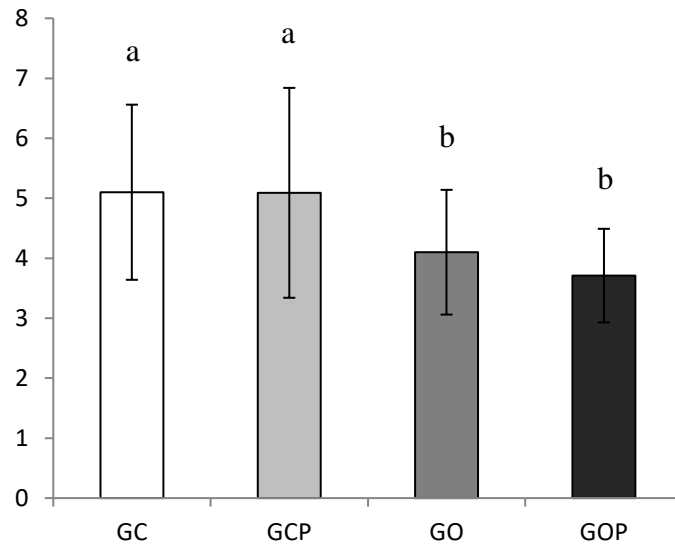


Figura 3. Análise da quantificação das proteínas totais do músculo diafragma de ratos *Wistar* com 130 dias de idade nos grupos controle (GC), treinado em plataforma vibratória (GCP), obeso (GO) e obeso treinado em plataforma vibratória (GOP), respectivamente. Valores expressos como média e desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas. Teste de análise de variância Two-way ANOVA ($p < 0,05$)

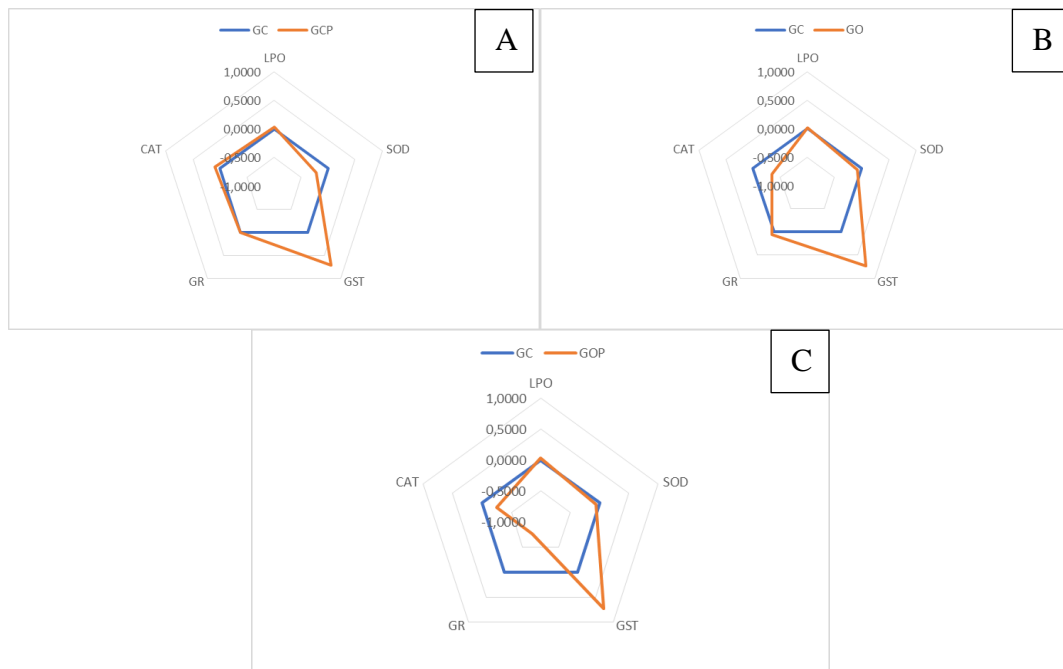


Figura 4. Parcelas estelares IBR da atividade das enzimas presentes no sistema de defesa antioxidante. **A:** animais treinados em plataforma vibratória (GCP). **B:** animais obesos (GO). **C:** obesos treinados em plataforma vibratória (GOP).

ARTIGO CIENTÍFICO 02

**MORPHOLOGY OF DIAPHRAGM MUSCLE FIBERS AND NEUROMUSCULAR
JUNCTIONS OF OBESE WISTAR RATS TRAINED ON A VIBRATION PLATFORM**

REVISTA THE ANATOMICAL RECORD

NORMAS DA REVISTA: ANEXO 02

Morphology of diaphragm muscle fibers and neuromuscular junctions of obese Wistar rats trained on a vibration platform

Mylena de Campos Oliveira¹, Ariadne Barbosa¹, Bárbara Zanardini de Andrade¹, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro¹, Gladson Ricardo Flor Bertolini¹, Marcia Miranda Torrejais¹ e Rose Meire Costa¹.

1 Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil.

Autor responsável: Mylena de Campos Oliveira

Endereço eletrônico: mylenac.oliveira@hotmail.com

Telefone: **(45) 99802-2041**

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the effects of the vibration platform on the morphological and neuromuscular structures of the diaphragm in Wistar rats, with monosodium glutamate-induced obesity (MSG). Twenty-eight animals were initially divided into two groups: Obese submitted to the diet-induced obesity protocol, through MSG administration, during the first five days of life; Control, which received saline solution. At seventy days of age, the groups were subdivided and the vibration platform training was started, which lasted eight weeks, constituting the groups Control (GC), Vibration Platform Control (GCP), Obese (GO) and Vibration Platform Obese (GOP). At one hundred and thirty days of age, the animals were euthanized and the diaphragm was removed. The muscle right antimere was prepared for three analyzes: histological, connective tissue and cholinesterase activity; the left antimere was processed for analysis of neuromuscular junctions. The diaphragm of the obese animals showed smaller muscle fibers, increased connective tissue and a reduced number of neuromuscular junctions; the exercise protocol on the vibration platform was inefficient to restore the morphometric parameters of the diaphragm muscle fibers, caused by obesity, also leading to an increase in connective tissue and a decrease in the size of neuromuscular junctions. These results draw the conclusion that the training protocol used may have been harmful to the diaphragm and that further studies are needed to prove its effects.

INTRODUCTION

Skeletal muscle tissue comprises about 40% of body mass, containing about 50 to 75% of body proteins (Fronteira and Ochala, 2015). The muscle fibers morphology exhibits a cylindrical shape, whose cells are elongated, thin and multinucleated. Sarcoplasm is characterized by the presence of transverse striations, the myofibrils, visible under light microscopy (Fronteira and Ochala, 2015).

The muscles are also composed of connective tissue, formed by an extracellular matrix, rich in carbohydrates and proteins, important in maintaining muscle fibers functional integrity, distributing in different sub-compartments (Caierão et al., 2007). Lining externally and maintaining the entire muscle group, epimysium occurs. Connective branches penetrate the musculature, dividing it into fascicles, consisting of the perimysium. The endomysium, on the other hand, individually surrounds each muscle fiber (Gillies and Lieber, 2011). The blood vessels, present in the connective tissue, are responsible for cell oxygenation and the motor nerves that participate in the control mechanism of muscle contraction, in the so-called neuromuscular junction (JNMs) (Bloch-Gallego, 2015).

The diaphragm, characteristic of mammals, is the most important muscle of respiration (Lessa et al., 2012). It consists of a muscular portion that is divided into three parts, called sternal, costal and lumbar, which are inserted in the central tendon, the tendon of this muscle (Helrigle et al., 2013).

Like all the other skeletal muscles, the diaphragm has plasticity, modifying the number and types of fibers, the degree of vascularization and innervation, according to the physiological condition (Silvennoinen et al., 2013). In this context, different pathological situations can modify the histomorphology and the diaphragm function,

including obesity (Ulsenheimer et al., 2017). In a study with animals, it was verified that, in obesity, there is a decreased percentage of connective tissue and an accumulation of intramuscular lipids. Farkas et al. (1994) reported remodeling in types I and IIA fibers. Obesity promotes fat accumulation in the abdominal region, which leads to the restriction in pulmonary mechanics, in order to affect the involved musculature in this mechanism (Delgado and Lunardi, 2011), and the impacts caused by obesity directly on the diaphragm are still unknown.

The adoption of regular physical exercise is considered a good therapeutic strategy for the treatment and prevention of obesity and its comorbidities (Araújo et al., 2012). Nevertheless, excessive accumulation of adipose tissue can hamper the practice of different sports, particularly those that cause greater joint impact (Zottis, 2002). Thus, the vibration platform, as it consists of an electronic device composed of a vibrating base (Casimiro et al., 2015), can be a viable option in the physical rehabilitation of obese people (Junior et al., 2012).

Experiments that investigate the effects of mechanical vibrations on skeletal muscle morphology are still scarce in the literature (Gilsanz et al., 2006), however, some benefits of using the vibration platform are reported, such as improvement of neuromuscular function, balance (Silva and Schnieder et al., 2011), body composition, muscle strength, cardiovascular health (Young et al., 2015), improved blood flow, reduction of swelling as well as of joint and muscle pain (Daltro et al., 2016) in humans, and in animals it led to a decrease in adipogenesis (Maddalozzo et al., 2008).

Due to the relevance of studies that investigate the actions of vibration platform on the diaphragm, and the importance of further studies in the search of knowledge in this area, this work was accomplished with the aim of analyzing the

equipment effects on the morphological structure of the diaphragm muscle fibers and neuromuscular junctions in experimental models, Wistar rats, with monosodium glutamate-induced obesity (MSG).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

A total of 28 male Wistar rats, derived from the Central Bioterium of Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), were kept in the sectoral bioterium of the Study of Injuries and Physiotherapeutic Resources Laboratory, under controlled light (light/dark 12h cycle) and temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) conditions. The animals remained in standard cages (41 cm long x 34 cm wide x 17 cm high), with access to rodent feed (BioBase, Santa Catarina, SC, Brazil) and water *ad libitum*.

All experiments reported in this study were conducted in accordance with national and international legislation [guidelines of the National Council for Animal Experimentation (CONCEA) and the Humanitarian Care and Use of Laboratory Animals Policy (PHS Policy)], and with the approval of the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of UNIOESTE (protocol nº 08/18).

Experimental Groups

The animals were initially divided into two groups: Control (GC, n=14) and Obese (GO, n=14), submitted to the diet-induced obesity protocol. During the five first days of age, the GO offspring received MSG subcutaneous injections, at a dose of 4 mg/g of body weight and, in order to undergo the same stress, the GC received

subcutaneous saline solution at a dose of 1.25 mg/g of body weight (Olney, 1969). The day of birth was considered day zero, and injections started on day one.

At 70 days of age, parts of the GC and GO groups underwent training with the vibration platform, creating two more experimental groups: Control Group Submitted to Vibration Platform (GCP, n=7) and Obese Group Submitted to Vibration Platform (GOP, n=7).

Training Protocol on the Vibration Platform

The platform Vibro Oscilatória Triplanar Profissional, from Akrtus brand, was used in the training sessions, held three times a week for 10 minutes, for eight consecutive weeks. The protocol used was adapted to a frequency of 60 Hz, with an amplitude of two millimeters (Butezloff et al., 2015).

The animals were positioned and contained on the vibration platform, using an adapted white wooden support, made of medium density fiberboard (MDF), with compartments of 13 cm wide, 19 cm long and 25 cm high. In each training session, rotation was performed in the positioning of the animals in the compartments, to minimize the bias resulting from the difference in the amplitude of vibration in different areas of the platform.

Assessment of the Onset of Obesity

Obesity was assessed using the Lee index (IL) (LEE, 1928) and the weight of retroperitoneal and periepididymal fats. Before euthanasia, the animals were weighed and the naso-anal length (CNA) was measured to obtain the IL, which is calculated through the cube root of body weight (g) divided by the CNA (cm).

Diaphragm Collection

At 130 days of age, after the end of training with the vibration platform, the animals were desensitized in the CO₂ chamber and euthanized with the aid of a guillotine. The animals were kept in a ventral position and an incision in the median region was made just below the chest, with subsequent skin and muscles dissection. The diaphragm removal consisted only of its costal part, being divided into right and left antimeres. Each antimere was fragmented into two segments; in the right antimere, the upper fragment was destined for histological processing in paraffin, and the lower fragment was frozen for histological analyzes of muscle fibers. In the left antimere, the lower segment was destined to histochemical study of neuromuscular junctions (JNMs).

Histological Study of Muscle Fibers

The lower fragment of the diaphragm right antimere remained at room temperature for 30 to 40 minutes. After this time, the sample was covered with neutral talc and frozen in liquid nitrogen for later storage in a Biofreezer at -80°C. For processing, the frozen muscle segments were transferred to a cryostat chamber (LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome) at -30°C and kept for 30 minutes. Then, these segments had one of their ends glued to a metallic support, using Tissue Freezing Medium (Leica – Jung – Germany) and cross-sectioned to seven µm thick.

These cross-sections were stained with the Hematoxylin and Eosin technique (HE), dehydrated, diaphanized and mounted with Permount. Ten random visual microscopic fields per animal were used (40X objective) to evaluate general morphology, cross-sectional area, muscle fibers larger and smaller diameters, and

also to quantify the number of muscle fibers and peripheral nuclei, in order to obtain the nucleus/fiber ratio.

Connective Tissue Study

To assess the connective tissue, the upper fragment of the diaphragm right antimere was fixed in metacarn and stored in 70% alcohol, for later histological procedure with an increasing series of alcohol dehydration, diaphanization in N-butyl and inclusion in histological paraffin. Subsequently, a microtomy was done (Leipzig Microtome), with semi-serial sections at seven μm thick, and later stained with Masson's Trichrome Stain (Bancroft and Stevens, 1990), to measure the connective tissue percentage in ten microscopic fields per animal (40X objective).

JNMs Histochemical and Morphometric Study

For the JNMs study, the lower fragment of the diaphragm left antimere was fixed in Karnovski (Karnovski, 1965). Afterward, the longitudinal section of the muscle was made in several slices with a stainless-steel blade, and the obtained cuts underwent a nonspecific esterase reaction (Lehrer and Ornstein, 1959), in order to measure the area and the larger and smaller diameters of 100 JNMs per animal, obtained from microscopic images (20X objective).

Cholinesterase (ChE) Activity Analysis

A part of the sample of the diaphragm right antimere was frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C for later homogenization. The samples were homogenized in 1 mL of Tris HCl pH 7.4 buffer and centrifuged at 12,000 revolutions per minute (rpm), for 10 minutes, at 4°C .

Enzymatic dosage was performed associated with neurotoxicity by ChE activity, by the modified Ellman method (Ellman et al., 1961), whose principle is to measure the thiocholine production when acetylcholine (ACh) is hydrolyzed. This is done by continuously reacting the thiol with the 5:5-dithiobis-2-nitrobenzoate (DNTB) ion to produce the yellow-colored anion of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. The reaction was carried out in triplicate, in 300 μ L of solution, containing 0,05 mM DNTB and 1.5 mM ACh. ChE activity was calculated in relation to protein concentration (mg/mL), using the DNTB molar extinction coefficient ($1.36\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Protein quantification was calculated from the crude sample and the reading was done at 22°C. The results are expressed in $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$.

Image Analysis

All photomicrographs were made from captured images in an Olympus Bx60® microscope, coupled to an Olympus DP71 camera (Tokyo, Japan), with the aid of the DP Controller 3.2.1 276 program, and analyzed using the Image Pro Plus 6.0® program (Media Cybernetics, Maryland, USA).

Statistical Analyzes

The results were expressed as mean \pm standard deviation from the mean. For the statistical assessment, two-way analysis of variance (ANOVA) was used. When it is significant, the differences between the means were evaluated with a corrected p-value for Tukey. The values with $p < 0.05$ were considered significant. The software used for statistical analyzes was GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad software©) (La Jolla, USA).

RESULTS

Macroscopic Parameters

The analyzes showed that monosodium glutamate-induced obesity in animals resulted in a 25% reduction in body weight ($F_1 = 60,59$; $p = < 0,0001$) and a 12% of naso-anal length ($F_1 = 64,66$; $p = < 0,0001$) in the GO and GOP animals, comparing to the GC and GCP groups (Table 1). The exercise application with the vibration platform did not produce significant differences (body weight – $F_1 = 1,230$; $p = 0,2785$; naso-anal length – $F_1 = 0,7164$; $p = 0,4057$), and the interaction between the factors was also not significant (body weight - $F_{1,3} = 1,134$; $p = 0,2975$; naso-anal length – $F_{1,3} = 0,7164$; $p = 0,4057$) (Table 1).

In the case of obesity, weights of retroperitoneal and periedidymal fats were measured, which increased by 74% ($F_1 = 60,16$; $p = < 0,0001$) and by 27% ($F_1 = 8,444$; $p = 0,0078$), respectively, in the GO and GOP groups, when compared to the GC and GCP groups (Table 1). The exercise on the vibration platform did not demonstrate effectiveness in these parameters, since no significant differences were obtained (retroperitoneal fat – $F_1 = 0,02671$, $p = 0,8715$; periepididymal fat – $F_1 = 1,675$; $p = 0,2079$) in the exercised groups (GCP and GOP) and in the non-exercised groups (GC and GO), with no differences in the interaction between the two factors (retroperitoneal fat – $F_{1,3} = 0,07921$, $p = 0,7808$; periepididymal fat – $F_{1,3} = 0,2437$; $p = 0,6260$) (Table 1).

The assessment of the Lee index and the diaphragm weight did not reveal significant difference in any of the studied groups (Table 1).

Morphology and Morphometry of Muscle Fibers and Connective Tissue

The morphology of the diaphragm muscle fibers, in the studied groups, was preserved, with polygonal, multinucleated cells, nuclei located on the periphery, in subsarcolemmal position and organized in fascicles (Figures 1A, 1B, 1C and 1D).

Regarding the measurement of the cross-sectional area, larger and smaller diameters of muscle fibers stained in HE, the GO and GOP groups decreased by 25% in the area ($F_1 = 10,55$; $p = 0,0034$) and by 13% in the larger ($F_1 = 7,724$; $p = 0,0104$) and in the smaller ($F_1 = 8,786$; $p = 0,0068$) diameters, when compared to the GC and GCP groups (Table 2). There were no differences in these parameters comparing to the exercise on the vibration platform (area – $F_1 = 0,02423$; $p = 0,8776$; larger diameter – $F_1 = 0,2862$; $p = 0,3976$; smaller diameter - $F_1 = 0,3504$; $p = 0,5594$), as well as there was no interaction between the two factors (area – $F_{1,3} = 2,050$; $p = 0,1651$; larger diameter – $F_{1,3} = 2,015$; $p = 0,1686$; smaller diameter - $F_{1,3} = 2,701$; $p = 0,1133$) (Table 2).

When counting the muscle fibers, there was a 24% increase ($F_1 = 7,901$; $p = 0,0097$) in the animals of the GO and GOP groups, comparing to the GC and GCP groups, with no effect of the exercise on the vibration platform ($F_1 = 0,8570$; $p = 0,3638$) (Table 2). There were no significant differences in the studied groups, regarding the number of nuclei (Table 2). Nevertheless, when the nucleus/fiber ratio was performed, a 25% reduction was obtained ($F_1 = 13,36$; $p = 0,0013$) in the GO and GOP groups, comparing to the GC and GCP groups without interference from the vibration platform ($F_1 = 0,6230$; $p = 0,4377$), and also without interaction between the two study factors ($F_{1,3} = 1,258$; $p = 0,2731$) (Table 2).

Most of the connective tissue was found in the perimysium, involving the fascicles in all studied groups (Figures 2A, 2B, 2C e 2D). When assessing the

percentage of intramuscular connective tissue, there was a significant difference between the GO and GOP groups, regarding the GC and GCP groups, showing a 26% increase ($F_1 = 4,60$; $p = 0,0444$) (Table 2). The GCP and GOP groups also increased by 28% in the evaluation of this parameter ($F_1 = 5,11$; $p = 0,0352$), when compared to the GC and GO groups, however, no interaction was observed between obesity and vibration platform in the analyzed parameters ($F_{1,3} = 1,64$; $p = 0,2143$) (Table 2).

Morphology and Morphometry of Neuromuscular Junctions (JNMs)

The JNMs present in the diaphragm of the four studied groups were oval, round or elliptical (Figures 3A, 3B, 3C e 3D).

The morphometric analysis declined by 15% in the area ($F_1 = 5,861$; $p = 0,0234$) and by 8% in the JNMs larger diameter ($F_1 = 6,935$; $p = 0,0146$) of the animals from the GO and GOP groups, regarding the animals from the GC and GCP groups (Figures 3F e 3G). In the comparison of the GCP and GOP groups with the GC and GO groups, a 16% decrease was observed in the area ($F_1 = 6,764$; $p = 0,0157$) and a 5% in the smaller diameter ($F_1 = 4,300$; $p = 0,0490$) (Figures 3F e 3H). An interaction was also verified between the factors of obesity and exercise on the vibration platform, in relation to the JNMs smaller diameter, which decreased by 10% ($F_{1,3} = 8,859$; $p = 0,0066$) (Figure 3H).

Cholinesterase Enzyme (ChE) Activity

The analysis of the ChE enzyme activity was not altered when comparing any of the studied groups, as well as there was no interaction between the two study factors ($F_{1,3} = 0,4595$; $p = 0,5027$) (Figure 3E).

DISCUSSION

Obesity was developed in obese groups due to hypothalamic injury caused by MSG, administered in the neonatal period, which in high doses degenerate the arcuate nucleus of the hypothalamus, where the hormones that liberate the growth hormone (GHRH) and the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) are released (Kovancs et al., 2000). As a result of these injuries, the liberation of these hormones is altered, leading to a decrease in growth hormone (GH) concentration and an increase in cortisol levels (Sasaki et al., 1994), which results in growth retardation in these animals, inhibition of muscle mass gain, large fat accumulation and shorter bone length (Kubota et al., 1994). Therewith, regarding the control animals, they show a large amount of body fat, shorter length and also lower weight (Seress, 1982), corroborating our findings; therefore, the MSG obese animals presented a decrease in body weight and in naso-anal length, as well as an increase in the weight of retroperitoneal and periepididymal fats.

The muscle tissue presented high adaptation capacity, which allows it to undergo changes in its composition, due to excess or absence of load (Kunz et al., 2013). In the analysis of the diaphragm weight, no significant differences were observed in the studied groups, nevertheless, in the obese animals there was a reduction in the muscle fibers cross-sectional area and in the larger and smaller diameters, demonstrating that this factor influences the muscle under study. The muscle fibers atrophy is due to this model being related to the decline in GH hormone concentration and elevation of cortisol, which are associated with the protein synthesis and degradation, consequently generating an increase in the

degradation of already formed proteins, and a decrease in new protein synthesis, resulting in weakness and poor muscle development (Clanton and Klawitter, 2001).

There was an increase in the connective tissue percentage, what would justify muscle weight not decreasing. This tissue is responsible for maintaining the muscle fibers morphological and functional integrity, which promotes an intimate association between both, making this proliferation and deposition of connective tissue a response mechanism of fibroblasts for muscle protection (Desmouliere, 1995).

When counting the number of muscle fibers per animal, there was an increase in obese animals, what could be associated with the decreased area and diameters of these fibers, which was also observed in the obese groups, since smaller fibers allow the presence of a greater number of fibers in the microscopic fields. Despite the increase in the number of fibers, this was not accompanied by peripheral nuclei, which did not show changes in their count in any of the studied groups, resulting in a declined nucleus/fiber ratio in the condition of obesity. In the multinucleated muscle fiber, each nucleus controls a portion of the fiber in the so-called nuclear domain, thus, the decrease in the muscle fiber size may be accompanied by a reduction in the total number of nuclei due to the size delimitation of each nuclear domain (Voltarelli et al., 2007).

Physical exercises have the ability to increase the production and the release of the fibroblasts growth factor, which results in connective tissue remodeling (Machado, 2008). It is known that cellular adaptations are generally associated with cell damage (Rocha et al., 2007), and when this occurs, satellite cells are stimulated, which are considered protagonists in the cell regeneration process (Machado, 2008). In the procedure of muscle tissue regeneration, the last phase is remodeling and

repair, one of the characteristics of which is the activation and growth of the extracellular matrix formed by the connective tissue, resulting in the overproduction of various types of collagen, contributing to the formation of scar tissue (Carosio et al., 2011). In our study, the percentage of connective tissue in the animals trained on the vibration platform has increased, which could be the result of the tissue remodeling process due to an injury initially caused by the platform exercise.

The JNMs are the synaptic connection between motor neurons and muscle fibers, with acetylcholine (ACh) as the neurotransmitter (Bloch-Gallego, 2015); cholinesterase is an enzyme responsible for the degradation of this neurotransmitter and also for catalyzing the hydrolysis of ACh in the synaptic cleft, therefore allowing the motor neuron to return to its resting state and avoiding the excessive transmission of acetylcholine to the muscle fiber (Marques et al., 2016). When the activity of the cholinesterase enzyme was assessed, it was not altered in any of the studied groups, but, in obese animals a decrease was observed in relation to the area and the larger diameter of the neuromuscular junctions. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) has an important role in the development and differentiation of myoblasts, and also in the neuromuscular system (Caroni, 1993), with GH as a stimulator for its action and secretion (Gomes et al., 2003), which, in the animals of this study, was reduced due to the obesity model, leading to believe that low levels of GH declines the levels of IGF-1, affecting the JNMs development.

The interaction between the obesity and vibration platform factors was also seen in the JNMs analysis, resulting in a decrease in their smaller diameter. Still on the context of the decline in the GH and IGF-1 secretion, affecting the JNMs development, it is shown in the literature that the exercise has the ability to influence the secretion of these hormones (Romero et al., 2013), however, their increase is

more associated to short duration and high intensity exercises (Kraemer et al., 1995). Gomes et al., (2003) dosed the secretion levels of these two hormones in diabetic rats, trained with swimming exercise, finding no differences in the GH levels, but reporting an IGF-1 increase, which does not seem to have happened in our study, since in the obese and exercised on vibration platform group, the JNMs continued to decline in their structure. The different results may occur due to the difference in the intensity of the training protocols, which in the present study was 10 minutes a day and 3 days a week, and in the study by Gomes et al. (2003), was 60 minutes a day and 5 days a week, in addition to being different exercises.

Nevertheless, there are no studies in the literature demonstrating the effects caused by mechanical vibrations on JNMs. In the present study, the isolated factor vibration platform also had effects on the JNMs, causing a decrease in the area and in the smaller diameter. It is known that the JNMs have adaptations according to the type of fibers they are associated with (Senne et al., 2017), with type 1 fibers having smaller JNMs, whereas type IIB have larger JNMs (Ogata, 1988). Oliveira (2020), in diaphragm analysis, observed a reduction in the number of type IIB fibers in the animals submitted to the exercise on the vibration platform, which could be related to the results seen in this study, as due to the adaptation of the JNMs size, regarding the type of fiber, a declining number of type IIB fibers would allow the visualization of a larger number of smaller JNMs, justifying our result not as a direct action of the platform in the JNMs, but in the muscle fibers.

From this, the obtained results draw us to conclude that the MSG administration in the animals was efficient in inducing obesity, which can cause fat accumulation, as well as causing problems in the development of muscle fibers and JNMs, therefore the exercise on vibration platform was not very efficient in reversing

of these effects caused by obesity, leading to believe that this is not a highly recommended resource in these cases.

REFERENCES

Araújo ACC, Roschel H, Picanço AR, Prado DML, Villares SMF, Pinto ALS, Gualano B. 2012. Similar health benefits of endurance and high-intensity interval training in obese children. *Plos One* 7: 1-8.

Bancroft JD, Steven A. 1990. *Theory and practice of histological techniques*. 3 ed. Churchill Livingstone: Edinburg.

Bloch-Gallego E. 2015. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. *Cell Mol Life Sci* 72: 1029-1046.

Butezloff MM, Zamarioli A, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Volpon JB. 2015. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Acta Cir Bras* 30: 727-735.

Caierão QM, Teodori RM, Minamoto VB. 2007. A influência do imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. *Rev Fisioter Movimento* 20: 87-92.

Caroni, P. 1993. Activity-sensitive signaling by muscle-derived insulin-like growth factors in the developing and regenerating neuromuscular system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 692: 209-222.

Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musaro A. 2011. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev* 10: 35-42.

Casimiro JA, Amaral LEF, Ferreira PC, Coelho MAGM, Borges VS. 2015. Efeitos de um protocolo de exercícios sobre a plataforma vibratória na força muscular, equilíbrio e desempenho de marcha em idosas comunitárias. *Fisioter Bras* 16: 25-31.

- Clanton TL, Klawitter PF. 2001. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia invited review: adaptive responses of skeletal muscle to intermittent hypoxia: the known and unknown. *J Appl Physiol* 90: 2476-2487.
- Daltro AFC, Barreto IC, Rosa FP. 2016. Análise do efeito da plataforma vibratória na regeneração de defeito ósseo. *Rev Ciên Med Biol* 15: 323-329.
- Delgado PM, Lunardi AC. 2011. Complicações respiratórias pós-operatórias em cirurgia bariátrica: revisão de literatura. *Fisioter Pesqui* 18: 388-392.
- Desmouliere A. 1995. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int* 19: 471-476.
- Ellman GL, Courtney KD, Andresm V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- Farkas GA, Gosselin LE, Zhan WZ, Schlenker EH, Sieck GC. 1994. Histochemical and mechanical properties of diaphragm muscle in morbidly obese Zucker rats. *J Appl Physiol* 77: 2250-2259.
- Fronteira WR, Ochala J. 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 96: 183-195.
- Gillies AR, Lieber RL. 2011. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* 44: 318-331.
- Gilsanz V, Wren TA, Sanchez M, Dorey F, Judex S, Rubin C. 2006. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res* 21: 1464-1474.
- Gomes RJ, Caetano FH, Hermeni HÁ, Rogatto GP, Luciano E. 2003. Efeitos do treinamento físico sobre o hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) em ratos diabéticos. *Rev Bras Cien Mov* 11: 57-62.

Helrigle C, Paranaíba JFFS, Pereira KF. 2013. Aspectos estruturais do músculo diafragma de mão-pelada (*Procyon cancrivorus*). Rev Cient Eletrônica Med Vet 20: 1-14.

Junior EG, Baroni BM, Vaz MA. 2012. Efeitos do exercício com vibração corporal total sobre o sistema neuromuscular: uma breve revisão. Rev Bras Prescr Fisiol Exerc 6: 612-622.

Karnovski MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27: 1-149.

Kovacs M, Kineman RD, Schally AV, Flerko B, Frohman LA. 2000. Increase in mRNA concentrations of pituitary receptors for growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogues after neonatal monosodium glutamate treatment. Neuroendocrinol J 12: 335-341.

Kraemer WJ, Aguilera BA, Terada M, Newton RU, Lynch JM, Rosendaal G, McBride JM, Gordon SE, Hakkinen K. 1985. Responses of IGF-1 to endogenous increases in growth hormone after heavy-resistance exercise. J Appl Physiol 79: 1310-1315.

Kubota A, Nagakawa Y, Igarashi Y. 1994. Studies of gene expression in liver of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 and growth hormone (GH) receptor/ GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate. Horm Metab Res 26: 497-503.

Kunz RI, Coradini JG, Rondon CLS, Brancalhão RMC, Bertolini GRF, Ribeiro LFC. 2013. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. Cien Biol Saúde 19: 123-129.

Lee MO. 1928. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. Am J Physiol 89: 24-33.

- Lehrer GM, Ornstein L. 1959. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *Biophys Biochem Cytol* 6: 399-419.
- Lessa TB, Constantino MVP, Silva LCS, Santos PRS, Neto ACA, Miglino MA, Bombonato PP, Ambrósio CE. 2012. Descrição morfológica do diafragma de sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). *Pesq Vet Bras* 32: 553-558.
- Machado M. 2008. Atualidades em fisiologia do músculo esquelético: célula satélite e hipertrofia. *Perspec online* 5: 116-120.
- Maddalozzo GF, Iwaniec UT, Turner RT, Rosen CJ, Widrick JJ. 2008. Whole-body vibration slows the acquisition of fat in mature female rats. *Int J Obes* 32: 1348-1354.
- Marques PV, Caixeta BT. 2016. A importância da avaliação das dosagens das colinesterases em casos de intoxicações por organofosforados. *Psicol Saúde Debate* 2: 1-17.
- Ogata T. 1988. Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscle. *Arch Histol Cytol* 51: 385-424.
- Oliveira MC. 2020. Efeito do tratamento com plataforma vibratória na morfologia do musculo diafragma em ratos obesos através do MSG. Dissertação (Mestrado Em Biociências e Saúde) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel.
- Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- OMS. World Health Organization. 2015. Disponível em: <http://www.who.int> Acesso em: 10 de janeiro de 2020.
- Rocha RSB, Cavallieri AG. 2007. Lesão, plasticidade e reabilitação do sistema muscular. *Rev Bras Cien Mov* 15: 81-85.
- Romero FG, Caperuto EC, Maia AF, Ferreira LG. 2013. Bases moleculares das ações da testosterona, hormônio do crescimento e IGF-1 sobre a hipertrofia

muscular esquelética e respostas ao treinamento de força. *Rev Mackenzie Educ Fís Esp* 12: 187-208.

Sasaki F, Kawai T, Ohta M. 1994. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohipophysial cells. *Anat Rec* 240: 255-260.

Senne T, Umnova M, Kaasik P. 2017. Morphological peculiarities of neuromuscular junctions among different fiber types: effect of exercise. *Eur J Transl Myol* 27: 139-146.

Seress L. 1982. Divergent effects of acute and chronic monosodium L-glutamate treatment on the anterior and posterior parts of the arcuate nucleus. *Neuroscience* 7: 2207-2216.

Silva PZ, Schneider RH. 2011. Efeitos da plataforma vibratória no equilíbrio em idosos. *Rev Acta Fisiátr* 18: 21-26.

Silvennoinen M, Rinnankoski-Tukka R, Vuento M, Hulmi JJ, Torvinen S, Lehti M, Kivela R, Kainulainen H. 2013. High-fat feeding induces angiogenesis in skeletal muscle and activates angiogenic pathways in capillaries. *Angiogenesis* 16: 297-307.

Ulsenheimer BH, Confortim HD, Jeronimo LC, Centenaro LA, Guimarães ATB, Bonfleur ML, Balbo SL, Matheus SMM, Torrejais MM. 2017. Effects of duodenal-jejunal bypass on structure of diaphragm in western diet obese rats. *Acta Cir Bras* 32: 1-13.

Voltarelli FA, Mello MAR, Duarte JAR. 2007. Atrofia muscular esquelética e modelos experimentais: apoptose e alterações histológicas, bioquímicas e metabólicas. *Rev Educ Fís* 8: 85-95.

Young PS, Son WM, Know OS. 2015. Effects of whole body vibration training on body composition, skeletal muscle strength and cardiovascular health. *J Exerc Rehabil* 11: 289-295.

Zottis C, Souza RHS, Burin DAP. 2002. Gastroplastia: uma alternativa para a qualidade de vida no tratamento da obesidade mórbida. [Fortaleza]: Congresso Brasileiro de Enfermagem; 54 p.

TABLES

Table 1. Macroscopic parameters of the diaphragm muscle of 130-day-old Wistar rats from Control (GC), Control Submitted to Vibration Platform (GOP), Obese (GO) and Obese Submitted to Vibration Platform (GOP) groups. Values are expressed as mean \pm standard deviation. Capital and different letters represent isolated significance of the obesity factor; lowercase and different letters indicate isolated significance of the platform factor. Two-way ANOVA analysis of variance test ($p < 0,05$).

Macroscopic parameters (N=7)	GC	GCP	GO	GOP
Body weight(g)	418,3 \pm 38,8 ^{Aa}	417,7 \pm 51,6 ^{Aa}	330,9 \pm 17,04 ^{Ba}	302,6 \pm 16,6 ^{Ba}
Naso-anal length (cm)	25 \pm 1,0 ^{Aa}	25,6 \pm 0,8 ^{Aa}	22,6 \pm 1,0 ^{Ba}	22,6 \pm 0,8 ^{Ba}
Lee index	299,2 \pm 10,9 ^{Aa}	292,1 \pm 15,10 ^{Aa}	306,7 \pm 11,9 ^{Aa}	297,5 \pm 6,20 ^{Aa}
Retroperitoneal fat (mass in % body weight)	1,10 \pm 0,2 ^{Aa}	1,11 \pm 0,12 ^{Aa}	1,94 \pm 0,33 ^{Ba}	1,90 \pm 0,36 ^{Ba}
Periepididymal fat (mass in % body weight)	1,4 \pm 0,3 ^{Aa}	1,50 \pm 0,4 ^{Aa}	1,72 \pm 0,3 ^{Ba}	1,96 \pm 0,4 ^{Ba}
Diaphragm weight (mass in % body weight)	0,08 \pm 0,01 ^{Aa}	0,08 \pm 0,01 ^{Aa}	0,08 \pm 0,01 ^{Aa}	0,08 \pm 0,01 ^{Aa}

Table 1. Microscopic parameters of the diaphragm muscle of 130-day-old Wistar rats from Control (GC), Control Submitted to Vibration Platform (GOP), Obese (GO) and Obese Submitted to Vibration Platform (GOP) groups. Values are expressed as mean \pm standard deviation. Capital and different letters represent isolated significance of the obesity factor; lowercase and different letters indicate isolated significance of the platform factor. Two-way ANOVA analysis of variance test ($p < 0,05$).

Microscopic parameters (N=7)	GC	GCP	GO	GOP
Muscle fiber area (μm^2)	427,8 \pm 126,5 ^{Aa}	380,3 \pm 62,4 ^{Aa}	287,8 \pm 52,7 ^{Ba}	326 \pm 48,7 ^{Ba}
Larger diameter of muscle fiber (μm)	30,7 \pm 4,6 ^{Aa}	29,5 \pm 4,2 ^{Aa}	25,04 \pm 2,3 ^{Ba}	27,7 \pm 2,4 ^{Ba}
Smaller diameter of muscle fiber (μm)	15,9 \pm 2,6 ^{Aa}	15,3 \pm 1,0 ^{Aa}	13,02 \pm 1,4 ^{Ba}	14,4 \pm 1,4 ^{Ba}
Number of muscle fiber	335,1 \pm 110,7 ^{Aa}	350,1 \pm 67,3 ^{Aa}	461,1 \pm 70,7 ^{Ba}	391,1 \pm 54 ^{Ba}
Number of peripheral nuclei Nucleus/fiber ratio	682,3 \pm 118,2 ^{Aa}	661,7 \pm 82,7 ^{Aa}	694,7 \pm 62,1 ^{Aa}	603,4 \pm 51,3 ^{Aa}
Connective tissue (%)	2,18 \pm 0,6 ^{Aa}	1,92 \pm 0,21 ^{Aa}	1,52 \pm 0,14 ^{Ba}	1,57 \pm 0,25 ^{Ba}
	1,47 \pm 0,1 ^{Aa}	2,29 \pm 0,8 ^{Ab}	2,26 \pm 0,8 ^{Ba}	2,49 \pm 0,2 ^{Bb}

FIGURE CAPTIONS

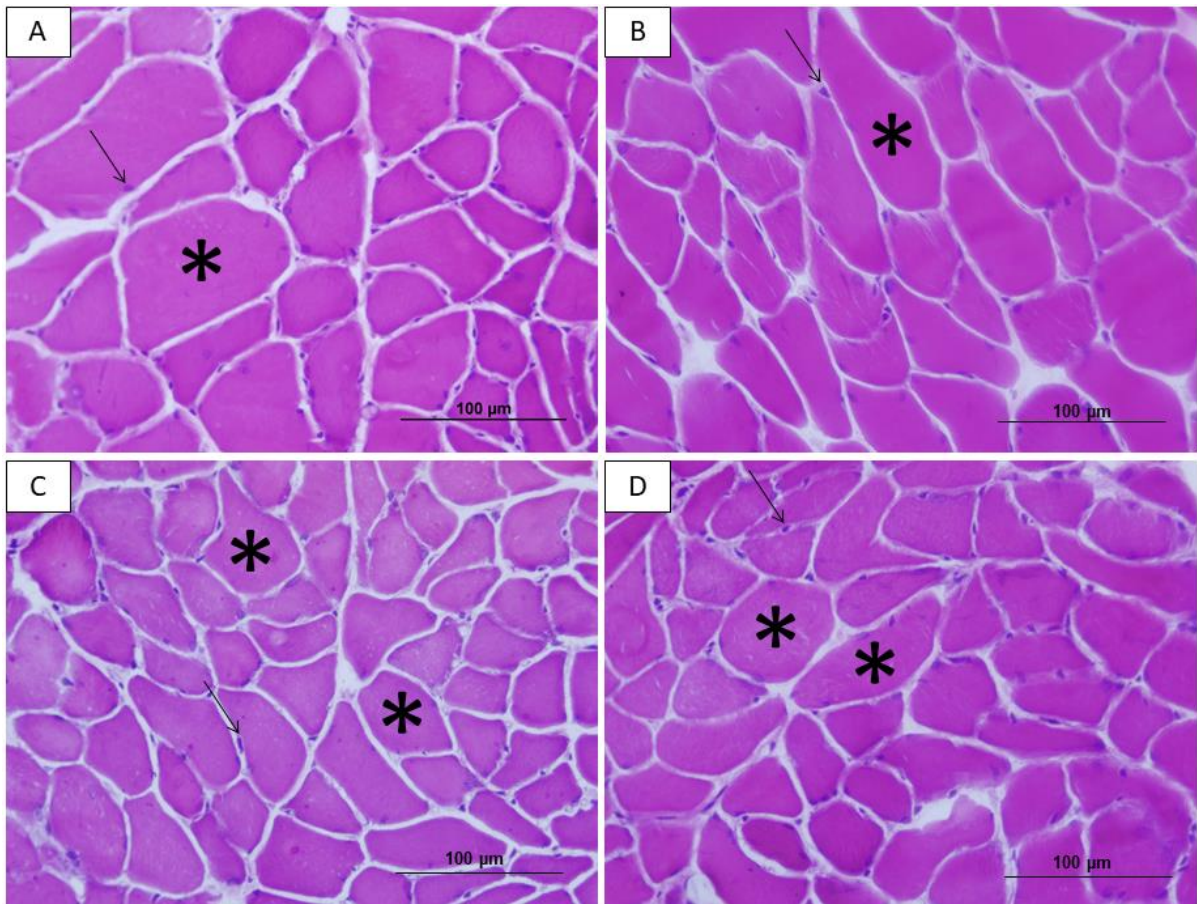


Figure 1. Diaphragm photomicrographs of 130-day-old Wistar rats. Cross-section. Muscle fibers (asterisks) and peripheral nuclei (arrows). Hematoxylin and Eosin. **A:** Control Group (GC). **B:** Control Group Exercised on a Vibration Platform (GCP). **C:** Obese Group (GO). **D:** Obese Group Exercised on a Vibration Platform (GOP).

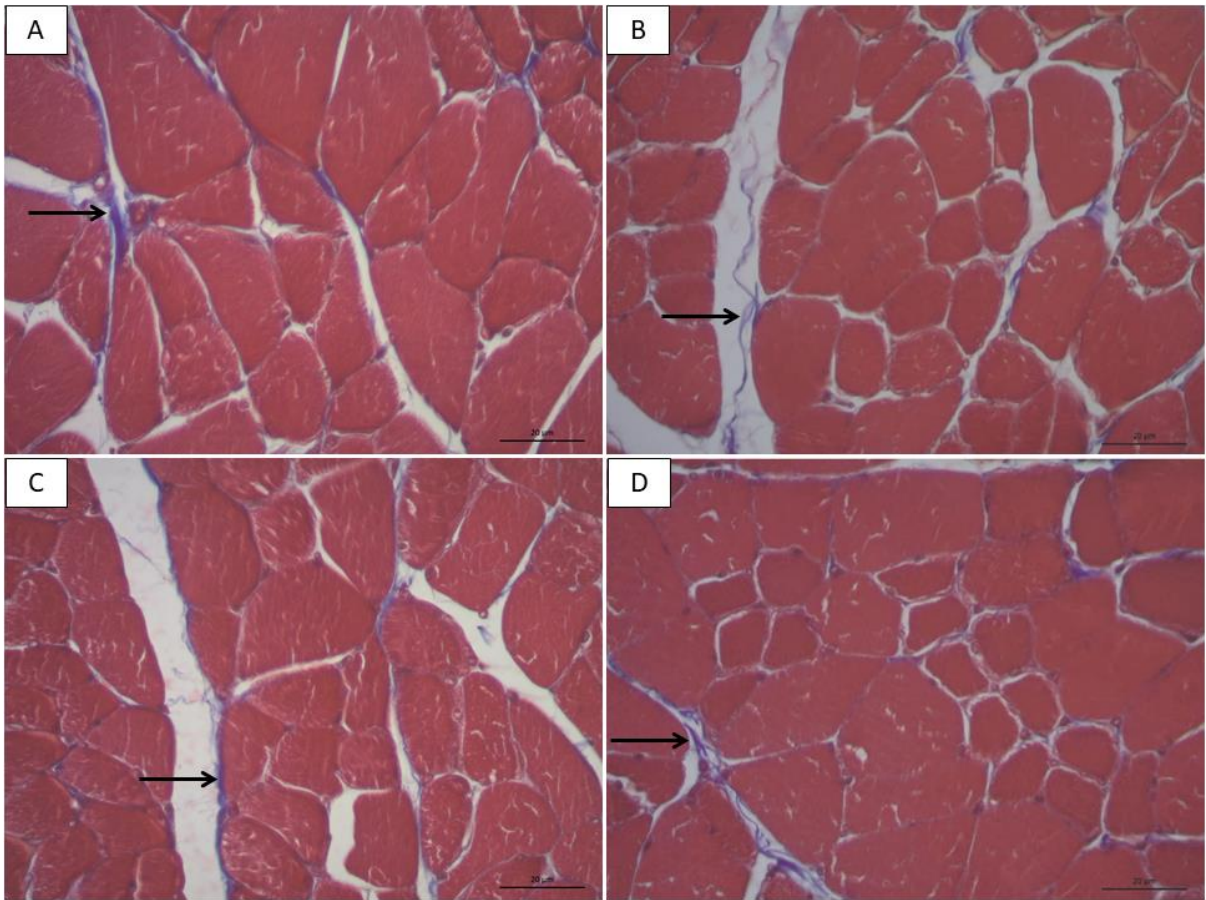


Figure 2. Diaphragm photomicrographs of 130-day-old Wistar rats. Cross-section. Masson's Trichrome Stain. **A, B, C and D:** Perimysium (arrow) of Control (GC), Exercised on a Vibration Platform (GCP), Obese (GO) and Obese Exercised on a Vibration Platform (GOP) groups, respectively.

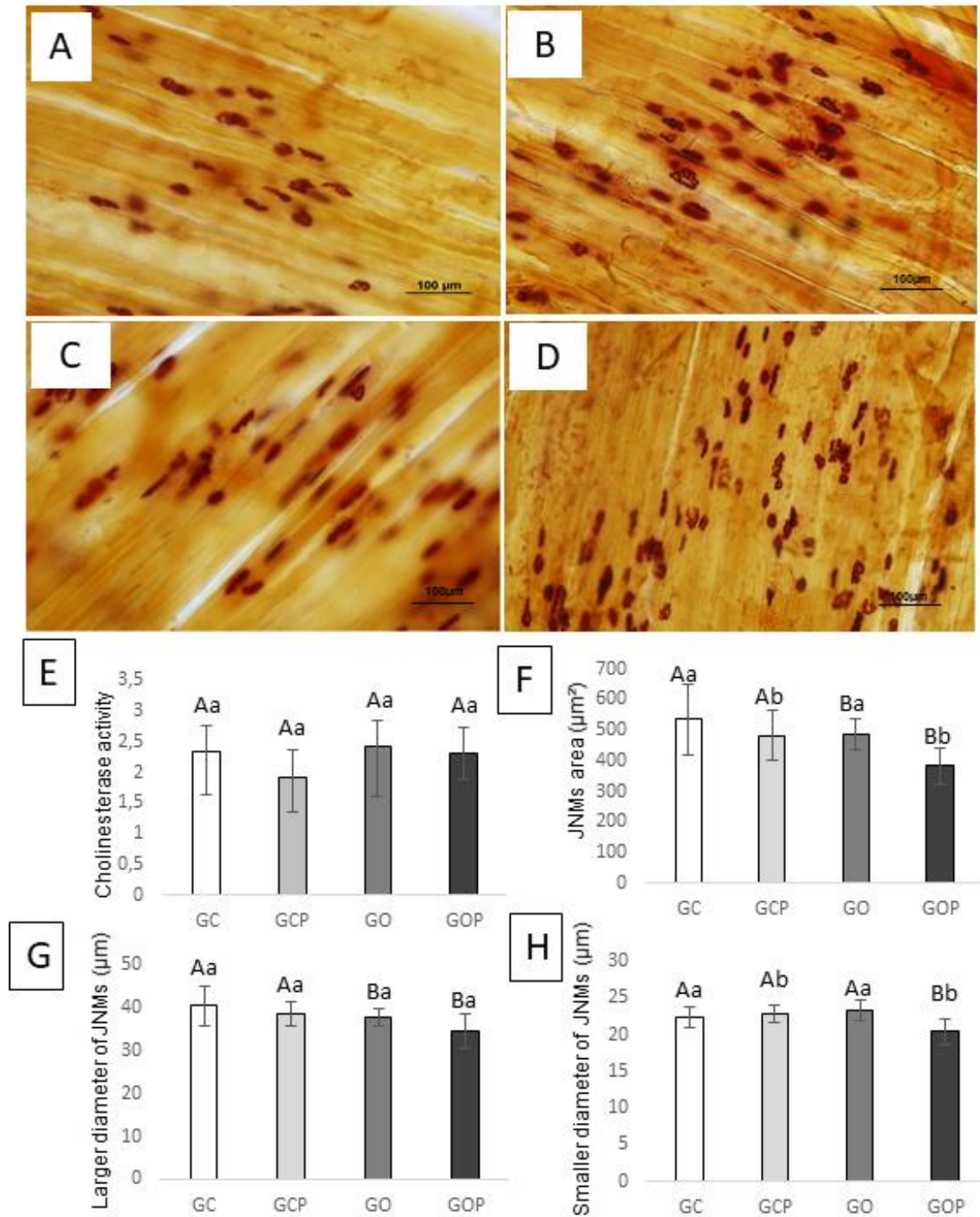


Figure 3. Neuromuscular junctions (JNMs) photomicrographs observed in the diaphragm of 130-day-old Wistar rats. Longitudinal section, Nonspecific Esterase reaction. **A, B, C and D:** JNMs morphological characteristics of the animals in the Control (GC), Control Exercised on a Vibration Platform (GCP), Obese (GO) and Obese Exercised on a Vibration Platform (GOP) groups, respectively. **E, F, G and H:** Cholinesterase enzyme activity, data of area, larger and smaller JNMs diameters of the animals in the GC, GCP, GO e GOP groups, respectively. Values expressed as mean \pm standard deviation. Different letters indicate significant differences. Two-way ANOVA analysis of variance test ($p < 0,05$).

CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS

A administração do MSG produziu acúmulo de gordura nos animais característicos no quadro de obesidade, além de ter provocado efeitos na musculatura, tais como a redução da área de secção transversal das fibras musculares das fibras do tipo IIA e IIB, dos diâmetros maior e menor, o aumento da porcentagem de tecido conjuntivo, a diminuição na atividade da enzima Catalase, a elevação na atividade da enzima GST e a diminuição da área e do diâmetro maior das junções neuromusculares.

A PV não se mostrou muito eficiente na reversão desses efeitos negativos provocados pela obesidade MSG, no entanto, também levou a alguns efeitos como a diminuição no número de fibras do tipo IIB, o aumento do tecido conjuntivo, a elevação da enzima GST e a diminuição na área e no diâmetro menor das junções.

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que a obesidade foi o fator de maior influência nos resultados obtidos e que mais estudos são necessários no tocante ao protocolo utilizado para o exercício com a PV, esclarecendo seus reais efeitos e resultados sobre a morfologia muscular.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABERCROMBY, A.F.J.; AMONETTE, W.E.; LAYNE, C.S.; MCFARLIN, B.K.; HINMAN, M.R.; PALOSKI, W.H. Variation in neuromuscular responses during acute whole-body vibration exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 39, n. 9, p. 1642-1650, 2007.
- ALMEIDA, F. N. **Efeitos do treinamento físico aeróbio e do consumo da dieta de cafeteria após a lactação em características morfológicas e metabólicas apresentadas no fenótipo adulto de ratos *wistar***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 2008.
- ARAUJO, A.C.C.; ROSCHEL, H.; PICANÇO, A.R.; PRADO, D.M.L.; VILLARES, S.M.F.; PINTO, A.L.S.; GUALANO, B. Similar health benefits of endurance and high-intensity interval training in obese children. **Plos One**, v. 7, p. 1-8, 2012.
- AUNE, D.; SEN, A.; PRASAD, M.; NORAT, T.; JANSZKY, I.; TONSTAD, S.; ROMUNDSTAD, P.; VATTEN, L.J. BMI and all cause mortality: systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 million deaths among 30.3 million participants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 353, n. 2156, p. 1-17, 2016.
- BACHA, J.M.R.; CORDEIRO, L.R.; ALVISI, T.C.; BONFIM, T.R. Impacto do treinamento sensório-motor com plataforma vibratória no equilíbrio e na mobilidade funcional de um indivíduo idoso com sequela de acidente vascular encefálico: relato de caso. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 23, n. 1, p. 111-116, 2016.
- BADARO, A.F.V.; SILVA, A.H.; BECHE, D. Flexibilidade versus alongamento: esclarecendo as diferenças. **Saúde**, v. 33, n. 1, p. 32-36, 2007.
- BALBO, S.L.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, R.A.; BONFLEUR, M.L.; GRAVENA, C.; BRITO, M.N.; ANDREAZZI, A.E.; MATHIAS, P.C.F.; TORREZAN, R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, p. 142-148, 2007.
- BATISTA, M. A. B.; WALLERRSTEIN, L. F.; DIAS, R. M.; SILVA, R. G.; UGRINOWITSCH, C.; TRICOLI, V. Efeitos do Treinamento com Plataformas

Vibratórias. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 15, n. 3, p. 103-113, 2007.

BAYOL, S.A.; SIMBI, B.H.; STICKLAND, N.C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism of in rat the offspring at weaning. **The Journal of Physiology**, v. 567, p. 951-961, 2005.

BERNARDES, F.B.; LEITE, V.F.; LIBERALI, R.; NAVARRO, F. Relação da obesidade com diabetes mellitus tipo 2 com ênfase em nutrição e atividade física. **Revista Brasileira de Obesidade Nutrição e Emagrecimento**, v. 3, n. 15, p. 241-250, 2009.

BLAKEMORE, A.I.F.; BUXTON, J.L. Obesity, genetic risk, and environment. **British Medical Journal**, v. 348, 2014.

BLOCH-GALLEGO, E. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. **Cellular and Molecular Life Science**, v.72, n. 6, p. 1029-1046, 2015.

BONFLEUR, M.L.; RIBEIRO, R.A.; PAVANELLO, A.; SOSTER, R.; LUBACZEUSK, C.; ARAUJO, A.C.F.; BOSCHERO, A.C. Duodenal-jejunal by-pass restores insulin action and beta-cell function in hypothalamic-obese rats. **Obesity Surgery**, v. 25, p. 656-665, 2015.

BOSCO, C.R.; COLLI, E.; INTROINI, M.; CARDINALE, O.; TSARPELA, A.; MADELLA, J.; TIHANYI, VIRU, A. Adaptive responses of human skeletal muscle to vibration exposure. **Clinical Physiology**, v.19, p. 183–187, 1999.

BUZZACHERA, C.F.; ELSANGEDY, H.M.; HALLAGE, T.; SILVA, S.G. Parâmetros fisiológicos e perceptivos durante a caminhada de intensidade preferida por mulheres adultas, previamente sedentárias. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 9, p.170-176, 2007.

CASIMIRO, J.A.; AMARAL, L.E.F.; FERREIRA, P.C.; COELHO, M.A.G.M.; BORGES, V.S. Efeitos de um protocolo de exercícios sobre a plataforma vibratória na força muscular, equilíbrio e desempenho de marcha em idosas comunitárias. **Fisioterapia Brasil**, v.16, n.1, p. 25-31, 2015.

CASTELLO, V.; SIMÕES, R. P.; BASSI, D.; MENDES, R. G.; BORGHI-SILVA, A. Respiratory muscle strength is markedly reduced in morbid obese women. **Arquivos Medicos do ABC**, v. 32, n. 2, p. 74-77, 2007.

CASTIGLIONI, R.N; MABEL, H.; QUEIROZ, B.N.; PARESQUE, R.N. Gastrointestinal morphological alteration in obese rats kept under hipercaloric diets. **International Journal of General Medicine**, v.6, p. 479-488, 2013.

COZER, C.; PISCIOLARO, F. Os pilares do tratamento contra a obesidade. **Abeso**, v. 60, p. 16-17, 2012.

DAL PAI-SILVA, M.D.P.; CARVALHO, R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 21-31, 2007.

DALTRO, A.F.C.; BARRETO, I.C.; ROSA, F.P. Análise do efeito da plataforma vibratória na regeneração de defeito ósseo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 3, p. 323-329, 2016.

DAWSON, R.; PELLEYMOUNTER, M.A.; MILLARD, W.J.; LIU, S.; EPPLER, B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 202-206, 1997.

DELGADO, P.M.; LUNARDI, A.C. Complicações respiratórias pós-operatórias em cirurgia bariátrica revisão de literatura. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 18, n. 4, p. 388-392, 2011.

DENIES, M.S.; JOHNSON, J.; MALIPHOL, A.B.; BRUNO, M.; KIM, A.; RIZVI, A.; RUSTICI, K.; MEDLER, S. Diet-induced obesity alters skeletal muscle fiber types of male but not female mice. **Physiological Reports**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2014.

EBERTZ, C.E.; BONFLEUR, M.L.; BERTASSOL, I.M.; MENDES, M.C.; LUBACZELSKI, C.; ARAUJO, A.C.F.; PAES, A.M.; AMORIM, E.M.P.; BALBO, S.L. Duodenal jejunal bypass attenuates non-alcoholic fatty liver disease in western diet-obese rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, p. 608-614, 2014.

EL-KHANI, U.; AHMED, A.; HAKKY, S.; NEHME, J.; COUSINS, J.; CHAHAL, H.; PURKAYASTHA, S. The Impact of obesity surgery on musculoskeletal disease. **Obesity Surgery**, v. 24, n. 12, p. 2175-2192, 2014.

FAGERLUND, M.J.; ERIKSSON, L.I. Current concepts in neuromuscular transmission. **British Journal of Anaesthesia**, v. 103, p. 108-114, 2009.

FARKAS, G.A.; GOSSELIN, L.E.; ZHAN, W.Z.; SCHLENKER, E.H.; SIECK, G.C. Histochemical and mechanical properties of diaphragm muscle in morbidly obese Zucker rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 5, p. 2250-2259, 1994.

FIGUEROA, A.; GIL, R.; WONG, A.; HOOSHMAND, S.; PARK, S.Y.; VICIL, F.; GONZALEZ, M.A.S. Whole-body vibration training reduces arterial stiffness, blood pressure and sympathovagal balance in young overweight/obese women. **Hypertension Research**, v. 35, p. 667-672, 2012.

FILHO, S.D.S.; BERNARDO, R.M.; SANTOS, F.A.; MEYER, P.F.; RONZIO, O.A.; GUEDES, S.S.V.; GASS, R.; CARDOSO, D.M.; SILVA, R.K.; REUTER, E.M.; PAIVA, D.N.; FILHO, M.B. Exercícios de vibração de corpo inteiro em plataformas vibratórias interesse científico. **Saúde**, v. 41, n. 2, p. 19-26, 2015.

FINUCANE, M.M.; STEVENS, G.A.; COWAN, M.; DANAEI, G.; LIN, J.K.; PACIOREK, C.J.; SINGH, G. M.; GUTIERREZ, H. R.; LU, Y.; BAHALIM, A.N., FARZADFAR, F.; RILEY, L. M.; EZZATI, M. National, regional, and global trends in body mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **The Lancet**, v. 12, n. 377, p. 557-567, 2011.

FRONTERA, W.R; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A brief review of structure and function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183-195, 2015.

GIGANTE, D.P.; MOURA, E.C.; SARDINHA, L.M.V. Prevalência de excesso de peso e obesidade e fatores associados, Brasil, 2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 83-89, 2009.

GILLIES, A.R.; LIEBER, R.L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318-331, 2011.

GILSANZ, V.; WREN, T. A.; SANCHEZ, M.; DOREY, F.; JUDEX, S.; RUBIN, C. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 9, p. 1464-1474, 2006.

GUIMARÃES, E.S.G.; JUNIOR, L.C.C.; MUSSO, C.M.; ALMEIDA, M.M.; GONÇALVES, C.F.; PETTERSEN, K.G.; PAES, S.T.; GARCIA, R.M.G.; MATHIAS, P.C.F.; TORREZAN, R.; MOURÃO-JUNIOR, C.A.; ANDREAZZI, A.E. Altered behavior of adult obese rats by monosodium L-glutamate neonatal treatment is related to hypercorticosteronemia and activation of hypothalamic ERK1 and ERK2. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, p. 1-9, 2015.

HALLAL, C. Z.; MARQUES, N. R.; GONÇALVES, M. O uso da vibração como método auxiliar no treinamento de capacidades físicas: uma revisão da literatura. **Motriz**, v. 16, n. 2, p. 527-533, 2010.

HIGA, T.S.; SPINOLA, A.V.; FONSECA, M.H; EVANGELISTA, F.S. Comparison between cafeteria and high fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v.6, p. 47-54, 2014.

HOCHBERG, I.; HOCHBERG, Z. Expanding the definition of hypothalamic Obesity. **Obesity Reviews**, v. 11, p. 709-721, 2010.

HUENCHULLAN, S.M.; MCLENNAN, S.V.; VERHOEVEN, A.; TWIGG, S.M.; TAM, C.S. The emerging role of remodeling the extracellular matrix of striated skeletal muscle in obesity and exercise. **Obesity Review**, v. 18, n. 7, p. 776-790, 2017.

IWASE, M.; ICHIKAWA, K.; TASHIRO, K.; IINO, K.; SHINOHARA, N.; IBAYASHI, S.; YOSHINARI, M.; FUJISHIMA, M. Effects of monosodium glutamate-induced obesity in spontaneously hypertensive rats vs. Wistar Kyoto rats: serum leptin and blood flow to brown adipose tissue. **Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 23, p. 503-510, 2000.

JONES, D.M.B.; FINCH, H.W.; DUGAN, E.L. Comparing the effects of various whole-body vibration accelerations on counter-movement jump performance. **Journal of Sports Science & Medicine**, v. 7, p. 144-150, 2008.

JUNIOR, E.G.; BARONI, B.M.; VAZ, M.A. Efeitos do exercício com vibração corporal total sobre o sistema neuromuscular: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 6, n. 36, p. 612-622, 2012.

JUNIOR, R.C.V.; SILVA, C.M.S.; ARAÚJO, M.B.; GARCIA, A.; VOLTARELLI, V.A.; REIS FILHO, A.D.; VOLTARELLI, F.A. Treinamento aeróbico de natação aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculo esquelético de ratos. **Ciencia do Exercício e do Esporte**, v. 19, n. 3, p. 204-208, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Kooban, 2013.

KANASAKI, K.; KOYA, D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-11, 2011.

KEMP, J.G.; BLAZEY, R.; STEPHENSON, D.G.; STEPHENSON, G.M.M. Morphological and biochemical alterations of skeletal muscles from the genetically obese (ob/ob) mouse. **International Journal of Obesity**, v. 31, p. 831-841, 2009.

KUBOTA, A.; NAGAKAWA, Y.; IGARASHI, Y. Studies of gene expression in liver of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 and growth hormone (GH) receptor/ GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate. **Hormone and Metabolic Research**, v. 26, n. 11, p. 497-503, 1994.

LEE, S.R.; KHAMOUI, A.V.; JO, E.; PARK, B.S.; ZOURDOS, M.C.; PANTON, L.B., ORMSBEE, M.J.; KIM, J.S. Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 4, p. 403-411, 2015.

LEMOES, T.V.; PEREIRA, L.M. Efeitos da plataforma vibratória no sistema musculoesquelético. **Revista Movimenta**, v. 5, n. 3, p. 257-265, 2012.

LESSA, T.B.; CONSTANTINO, M.V.P.; SILVA, L.C.S.; SANTOS, P.R.S.; NETO, A.C.A.; MIGLINO, M.A.; BOMBONATO, P.P.; AMBRÓSIO, C.E. Descrição morfológica do diafragma de sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 553-558, 2012.

LINHARES, R.S.; HORTA, B.L.; GIGANTE, D.P.; DIAS-DA-COSTA, J.S.; OLINTO, M.T.A. Distribuição de obesidade geral e abdominal em adultos de uma cidade no Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 438-448, 2012.

LORENZO, A.; SOLDATI, L.; SARLO, F.; CALVANI, M.; LORENZO, N.; RENZO, L. New criteria for obesity classification as a tool for indication of bariatric surgery. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 681-703, 2016.

LUCIANO, E.; MELLO, M.A.R. Efeitos do exercício físico crônico sobre as proteínas no diafragma de ratos diabéticos. **Motriz**, v.5, n.2, p. 146-151, 1999.

MADDALOZZO, G.F.; IWANIEC, U.T.; TURNER, R.T.; ROSEN, C.J.; WIDRICK, J.J. Whole-body vibration slows the acquisition of fat in mature female rats. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 1348-1354, 2008.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L.E.; MARTIN, J.B.; KOENIG, J.I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing

hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, p. 1100-1106, 1991.

MARTYM, J.A.J.; FAGERLUND, M.J.; ERIKSSON, L.I. Basic principles of neuromuscular transmission. **Anaesthesia**, v. 64, p. 1-9, 2009.

MINAMOTO, V.B. Classificação das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 12, p. 50-55, 2005.

MIZUNO, M. Human respiratory muscles fibre morphology and capillary supply. **European Respiratory Journal**, v. 4, p. 587-601, 1991.

MURARA, J.R.; MACEDO, L.L.B.; LIBERALI, R. Análise da eficácia da cirurgia bariátrica na redução do peso corporal e no combate a obesidade mórbida. **Revista Brasileira de Obesidade Nutrição e Emagrecimento**, v. 2, n. 7, p. 87-99, 2008.

NAGARAJAN, P.; KUMAR, M.J.M.; VENKATESAN, R.; MAJUNDAR, S.S.; JUVAL, R.C. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.18, p.1141-1153, 2012.

NAGATA, M.; SUZUKI, W.; IIZUKA, S.; TABUSHI, M.; MARUYAMA, H.; TAKEDA, S.; ABURADA, M.; MIYAMOTO, K. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. **Experimental Animals**, v. 55, p. 109-115, 2006.

NARDELLI, T.R.; RIBEIRO, R.A.; BALBO, S.L.; VANZELA, E.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; BONFLEUR, M.L. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino Acids**, v. 41, p. 901-908, 2011.

NASCIMENTO, A.F.; SUGISAKI, M.M.; LEOPOLDO, A.S.; LEOPOLDO, A.P.L.; LUVIZOTTO, R.A.M.; NOGUEIRA, C.R.; CICOGNA, A.C. A hypercaloric cycle of pelleting diet induces obesity and comorbidities in wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, p. 968-974, 2008.

OLIVEIRA, L.H.; ALMEIDA, P. Obesidade: aspectos gerais dos fatores, tratamento e prevenção. **Revista Polidisciplinar Eletrônica da Faculdade Guaicará**, v. 4, p. 34-46, 2012.

OLIVEIRA, R.A.R.; JUNIOR, R.J.M.; TAVARES, D.D.F.; MOREIRA, O.C.; LIMA, L.M.; AMORIM, P.R.S.; BRITTO, R.R.; MARINS, J.C.B. Prevalence of 41 obesity and

association of body mass index with risk factors in public school teachers. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 17, n. 6, p. 742-752, 2015.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, n. 164, p. 719-721, 1969.

OMS. World Health Organization. 2015. Disponível em: <http://www.who.int> Acesso em: 24 de julho de 2019.

PIMENTA, F.B.C.; BERTRAND, E.; MOGRABI, D.C.; SHINOHARA, H.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. The relationship between obesity and quality of life in Brazilian adults. **Frontiers in Psychology**, v. 6, n. 966, p. 1-7, 2015.

POLESE, D.; SILVA, A.I. Análise da relação do índice de massa corporal versus capacidades motoras em alunos do projeto criança feliz de Ponta Grossa. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n.3, p. 1-6, 2016.

POLLA, B.; ANTONA, G. D.; BOTTINELLI, R.; REGGIANI, C. Respiratory muscle fibres: specialization and plasticity. **Thorax**, v. 59, p. 808-817, 2004.

PRADA, P.O.; ZECCHIN, H.G.; GASPARETTI, A.L.; TORSONI, M.A.; UENO, M.; HIRATA, A.E.; AMARAL, M.E.C.; HOER, N.F.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.A. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1 ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, p. 1576-1587, 2005.

RAVELLI, M.N.; MERHI, V.A.L.; MONACO, D.V.; ARANHA, N. Obesidade, cirurgia bariátrica e implicações nutricionais. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 20, p. 259-266, 2007.

REID, W.D.; SHANKS, J.; SAMRAI, B. Regional and fiber-type percentages and sizes in the hamster diaphragm after swim training. **Physical Therapy**, v. 77, n.2, p. 178-186, 1997.

RIBEIRO, R.A.; BALBO, S.L.; ROMA, L.P.; CAMARGO, R.L.; BARELLA, L.F.; VANZELA, E.C.; MATHIAS, P.C.F.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; BONFLEUR, M.L. Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n.3, p. 4521-4528, 2013.

RISSI, R.; LEMOS, G.A.; IDE, B.N.; CAMARGO, R.L.; BRANCO, R.C.S.; MORATO, P.N.; PALOMARI, E.T. Joint immobilization: effects on muscular 42 tissue of obese and malnourished mice. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2016.

ROELANTS, M; DELECLUSE, C; GORIS, M; VERSCHUEREN, S. Effects of 24 weeks of whole body vibration training on body composition and muscles strength in untrained females. **International Journal of Sports Medicine**, v. 25, p. 1-5, 2004.

ROSSINI, T. C.; DA SILVA, A. S. R.; DE MORAIS, C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, p. 383-387, 2012.

SALOME, C.M.; KING, G.G.; BEREND, N. Pathophysiology of obesity and effects on lung function. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, p. 206-211, 2010.

SANDE-LEE, S.V.; VELLOSO, L.A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 6, p. 341-350, 2012.

SANT'ANNA, S.; CAIADO, N.M.; SILVA, L.J. Neuromodulação hipotalâmica: uma proposta terapêutica para obesidade. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 3, n. 2, p. 192-204, 2014.

SANTOS, F.M.; RODRIGUES, R.G.S.; TRINDADE-FILHO, E.M. Exercício físico versus programa de exercício pela eletroestimulação com aparelhos de uso doméstico. **Revista Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 117-122, 2008.

SASAKI, F.; KAWAI, T.; OHTA, M. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohypophysial cells. **Anatomical Record**, v. 240, p. 255-260, 1994.

SERESS, L. Divergent effects of acute and chronic monosodium L-glutamate treatment on the anterior and posterior parts of the arcuate nucleus. **Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 2207-2216, 1982.

SILVA, P.Z.; SCHNEIDER, R.H. Efeitos da plataforma vibratória no equilíbrio em idosos. **Revista Acta Fisiátrica**, v. 18, n. 1, p. 21-26, 2011.

SILVA, U.; FONTELA, P.C.; BONAMIGO, E.C.B.; WINKELMANN, E.R. Efeitos a curto prazo da plataforma vibratória e oscilatória em indivíduos saudáveis. **Ciência & Saúde**, v. 8, n. 3, p. 99-106, 2015.

SILVENNOINEN, M.; RINNANKOSKI-TUIKKA, R.; VUENTO, M.; HULMI, J.J.; TORVINEN, S.; LEHTI, M.; KIVELÄ, R.; KAINULAINEN, H. High-fat feeding induces angiogenesis in skeletal muscle and activates angiogenic pathways in capillaries. **Angiogenesis**, v. 16, n. 2, p. 297-307, 2013.

SISHI, B.; LOOS, B.; ELLIS, B.; SMITH, W.; TOIT, E.F.; ENGELBRECHT, A.M. Diet-induced obesity alters signalling pathways and induces atrophy and apoptosis in skeletal muscle in a prediabetic rat model. **Experimental Physiology**, v. 96, p. 179-193, 2010.

SOUZA, M.V.G.; CORDEIRO, E.M.; RAMOS, V.W.; OLIVEIRA, G.V.; PEREIRA, W.L. Obesidade e suas implicações á saúde exercício como um fator interveniente. **Revista de Trabalhos Acadêmicos**, v. 2, n. 6, p. 1-16, 2016.

SOUZA, R.G.M.; GOMES, A.C.; PRADO, C.M.M.; MOTA, J.F. Métodos de análise da composição corporal em adultos obesos. **Revista de Nutrição**, v. 27, p. 569-583, 2014.

TEIXEIRA, V.S.S.; FONSECA, B.C.A.; PEREIRA, D.M.; SILVA, A.B.K.; REIS, F.A. Avaliação do efeito da obesidade infantil e a do adolescente sobre as propriedades ventilométricas e força muscular do sistema respiratório. **ConScientia e Saúde**, v. 8, n. 1, p. 35-40, 2009.

ULSENHEIMER, B.H.; CONFORTIM, H.D.; JERONIMO, L.C.; CENTENARO, L.A.; GUIMARÃES, A.T.B.; BONFLEUR, M.L.; BALBO, S.L.; MATHEUS, S.M.M.; TORREJAIS, M.M. Effects of duodenal-jejunal bypass on structure of diaphragm in western diet obese rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.32, p. 1-13, 2017.

VEDANA, E.H.B.; PERES, M.A.; NEVES, J.; ROCHA, G.C.; LONGO, G.Z. Prevalência de obesidade e fatores potencialmente causais em adultos em região do sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n.7, p. 1156-1162, 2008.

VISSERS, D.; VERRIKEN, A.; MERTENS, I.; VAN GILS, C.; VAN DE SOMPEL, A.; TRUIJEN, S.; VAN GAAL, L. Effect of long-term whole body vibration training on visceral adipose tissue a preliminary report. **Obesity Facts**, v. 3, p. 93-100, 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 31 de maio de 2018.

WU, H.; XIONG, W.C.; MEI, L. To construct a synapse signaling pathway in the assembly of the neuromuscular junction. **Development**, v. 137, p. 1017-1033, 2010.

WHO. World Health Organization. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 21 de janeiro de 2020.

YOUNG, P.S.; SON, W.M.; KNOW, O.S. Effects of whole body vibration training on body composition, skeletal muscle strength and cardiovascular health. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 11, p. 289-295, 2015.

ZOTTIS, C.; SOUZA, R.H.S.; BURIN, D.A.P. Gastroplastia: uma alternativa para a qualidade de vida no tratamento da obesidade mórbida. In: Congresso Brasileiro de Enfermagem, 2002, Fortaleza. Anais do Congresso Brasileiro de Enfermagem, 2002. p. 54.

ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética



**Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa Nº
08/18 - CEUA**

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da plataforma vibratória em ratos Wistar obesos – análises funcionais e morfológicas”, registrada com o número “17/17”, sob a responsabilidade de “Gladson Ricardo Flor Bertolini”, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (UNIOESTE), em reunião de 08/06/2018.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2017 - 31/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos: <i>Rattus norvegicus</i> Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	10
Peso/idade	250g/60 dias
Sexo	Feminino

Nº de animais	40
Peso/idade	10g/filhotes
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central da Unioeste, campus de Cascavel

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA UNIOESTE
Portaria nº3730/2016

ANEXO 02 – NORMAS ARTIGO CIENTÍFICO 01

REVISTA SCIENTIA MÉDICA

EDITORIAL POLICIES

Scientia Medica follows the general principles of the *Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*, of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE): <http://www.icmje.org/recommendations/>

Authors are invited to read the **Policies** section of Scientia Medica, found in the "ABOUT" menu, for information about FOCUS and SCOPE, SECTION POLICIES and PEER-REVIEW PROCESS:

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies>

Authorship and Researchers Responsibilities

Please read more details about CRITERIA FOR AUTHORSHIP, CONFLICT OF INTERESTS and RESEARCHERS RESPONSIBILITIES in the section **Principles of Ethics and Best Practices in Scholarly Publishing**:

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies#custom-1>

- Authors need to state their contribution to the study, which will be displayed in the published article. This information should be included in the cover page, which must be downloaded from: <http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/periodicos/ScientiaMedica/coverpage.docx>
- To be named as authors, researchers must have made a substantial contribution to the conception of the work, or acquisition, or analysis, or interpretation of data.
- Additionally, the submitted document must have been critically revised by all authors, who agree that the manuscript represents their work. Each author is accountable for the accuracy and integrity of all parts of the work.
- Contributors who do not meet all of the above criteria for authorship should be acknowledged.

- The corresponding author must be the same who makes the submission.
- Authors must inform their ORCID. If necessary, please register at: <https://orcid.org/signin>
- At least one of the authors must have at least a specialist degree. Articles written by undergraduate students are not accepted.

About Copyright, please see the Copyright Notice:

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/submissions#copyrightNotice>

Originality, Ineditism and Updating

- When submitting a document, the authors must assure that it has not been published previously and that it is not being simultaneously evaluated by another journal.
- Verbatim copies of published texts are not acceptable, except in very occasional citations (see rules for literal citations, below).
- Scientia Medica uses a software for identifying similarity: a paper with copied texts will be identified and will be returned to authors.
- At the time of submission, the authors assume responsibility for not use falsified or copied data.
- Data collection must have been completed no more than two years before January of the current year, and the literature search must be updated the semester preceding the submission date.

Rules for Literal Citations

Both in original and in review articles, citations should be avoided, even if accompanied by the reference of the original author. It is not acceptable that a text is written based on citations. In exceptional cases, where it is really necessary to copy the words of another author, use the following rules: after mentioning the name of the author, followed by the corresponding reference number, a citation of up to three lines can be placed between quotation marks. Largest source excerpts need to be highlighted with a two points smaller font and an indented paragraph (3 cm at the left).

Ethics Approval for Research with Human Beings and Animals

- Original articles and case reports must state in the Methods section that the ethical standards for human experimentation were followed, and the study protocol was approved by an Institutional Research Ethics Board. Inform the name of the institution and the number of the approval document in the manuscript, and submit the document of approval as a complementary file.
- If pertinent, state that informed consent was obtained from all adult participants and/or from parents or legal guardians of minors or incapacitated adults, and assent terms were obtained from adolescents and children.
- In case of experimental study with animals, inform that the maintenance and care of experimental animals complies with the guidelines of country or institution's authority or agency for the human use of animals in research.

PREPARATION OF THE PAPER

Documents to be submitted

At least 3 files must be transferred: a COVER PAGE, the MAIN DOCUMENT, and the ETHICS APPROVAL document. Other supplementary documents, as image files, may be required.

COVER PAGE

Download the template from:

<http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/periodicos/ScientiaMedica/coverpage.docx>

Fill and upload the document at the time of submission, as a supplementary document. The cover page is separated from the article, and will not be available to reviewers, because Scientia Medica uses a double-blind system of peer-review, as informed in the Editorial Policies.

Warning: filling the cover page does not exempt the author who makes the submission from completely fill the metadata on the webpage. It is especially important to enter full names of all the authors and their e-mails in the electronic metadata.

MAIN DOCUMENT

Languages

Articles can be written in Portuguese or English. The style must be clear and concise.

Organization of the Manuscript

The manuscript is organized in the following order: TITLE, ABSTRACT, KEYWORDS, MAIN TEXT, REFERENCES, TABLES/CHARTS, and FIGURES. Instructions for preparation of each one are provided below, in "TEXTUAL ELEMENTS". Headings should not be numbered.

Some General Publishing Rules

- Numbers from one to nine should be spelled out, except when followed by unit of measure or when composing a series. Units of measure should follow the International System of Measurements.
- Foreign terms and names of microorganisms and animal and plant species should be in italics.
- Abbreviations can be used if the term appears at least five times in the text. At first use of the term in the text, spell it out and introduce the abbreviation parenthetically. Do not use abbreviations in the abstract.
- In the mention of commercial brands, the name of the manufacturer and its location (city, country), should be given parenthetically.

Format of the Document

Manuscripts must be typed in Word (Microsoft Office), on page A4 size and margins of 2.5 cm. The size of each document must not exceed 2 MB.

Preferably use the "Style" from Word. Apply the "Normal" style throughout the document. To set it, click with the right mouse button on "¶ Normal" and with the left button in "Modify". Choose the following settings:

- Font: Times New Roman 12.
- Paragraph: justified alignment, indentation of first line by 1.25 cm, with no space before or after, double spacing between lines.
- Do not use spaces or tabs to create first line indent; use only the configuration of the paragraph.

- Paragraph style in references and tables must be configured in a different way, as follows.

Textual Elements

Abstract

The Abstract should be limited to 340 words. All information presented in the Abstract must appear in the article. Abstracts are structured according to the chart below.

Keywords

Keywords are terms used in the indexing of an article so that it may be located by subject, by way of electronic search engines. Submission of correct descriptive words is fundamental for a publication to be easily found by other researchers. Scientia Medica uses the health sciences descriptors MeSH - Medical Subject Headings of the U.S. National Library of Medicine, developed with the purpose of permitting the use of common terminology for searching, providing a consistent and unique environment for the retrieval of information. They can be found on the following websites:

<https://www.nlm.nih.gov/mesh/> or <http://decs.bvs.br/l/homepagei.htm>, which includes the Health Sciences Descriptors in three languages – English, Portuguese and Spanish.

Main Text

- Sections should not be numbered.
- Eventually, there may be sub-sections in Methods and Results of an Original Article.
- In Original Articles, Scientia Medica does not accept combined Results and Discussion; two different sections are required. Conclusions, however, should not be a separate item, constituting the last paragraph of the Discussion. Rather, in review articles, conclusions may be the last subtitle, which can alternatively be called "Discussion" or "Final Comments".

Note that Scientia Medica is not accepting review articles other than by invitation.

For a definition of the different types of journal articles, please go to **Section Policies**: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies#sectionPolicies>

Acknowledgments, contributions of each author, financial support and conflicts of interest disclosure

Acknowledgments must be short and objective and should only include individuals or institutions that contributed to the study. They should be submitted on the cover page, as well as the statements on contributions of each author, financial support and presence of conflicts of interest. These statements will be placed by the text editor at the end of the article, when it is prepared for the final layout.

Please read more on these statements and other guidelines on publishing ethics in the "ABOUT" menu, section "**Principles of Ethics and Best Practices in Scholarly Publishing**":

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies#custom-1>

Tables

Tables and its legends should be presented in Word (Microsoft Office), and placed after the list of references, one in each page. Unlike the main text, tables are best viewed with left alignment, no first-line indent, and single space between lines. Select each table and apply these format settings.

All tables must be numbered in the order in which they appear in the article. The title is placed above the table, preceded by the word, "Table", followed by the sequential number in which the table appears in the text, in Arabic numerals (e.g.: Table 1, Table 2, etc.). Tables should include information regarding statistical approach.

Legends should be concise and self-explanatory, in order to allow understanding of the tables without reference to the text. Explanations must be displayed as footnotes, and not in the title, and are identified with symbols in the following order: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Do not underline or draw lines inside tables and do not use spaces to separate columns. Do not use spaces on either side of the symbol ±.

Illustrations

Illustrations (or figures) comprise graphs, drawings, flowcharts, photographs, organization charts, etc. An original illustration is preferred, but in case it was previously published, even if in your own work, the original source must be credited and permission from the copyright holder (publisher, journal or author) to reproduce the illustration must be supplied. The letter of permission should be submitted at the time the revised manuscript is submitted.

All illustrations must be numbered in the order in which they appear in the article. Figures should be placed after the tables, in the end of the document, and the legend should appear below the illustration, preceded by the word, "Figure," followed by the sequential number in which the illustration appears in the text, in Arabic numerals, including the respective title (e.g.: Figure 1, Figure 2, etc.). When produced in a text file (for example, using Word graphs or flowcharts), figures should be sent in their original format, so that they may be edited.

Photographs and some complex images must be uploaded as supplementary documents, in form of image file (preferably JPG), with a minimum resolution of 300 dpi for better visualization, without exceed 2 MB. The legends for these figures should be placed in the main text after the References and the Tables, with their numbers, and additionally must be uploaded in the metadata of the supplementary document, according the instructions which will appear in the moment of submission. *Legends should be brief, but* must contain all the information to make the illustration comprehensible without taking recourse to the text.

References

In the text, reference numbers are placed after the corresponding paragraph, between square brackets and before punctuation. More than one number are separated by comma and space. If there are more than two consecutive numbers, put only the first and the last, separated by a hyphen; if there are only two consecutive numbers, separate with a comma.

All references cited in the text and they alone, appear in the reference list. The reference numbering follows the order of appearance in the text. The list may be numbered manually, or using the numbered markers of Word, or by a reference manager. Paragraph with left alignment and 1.5 space.

Scientia Medica uses the **Vancouver style**. Examples of the most used types of references are provided below.

INSTRUCTIONS FOR SUBMISSION

To begin the submission process, go to Online Submissions through the link: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/about/submissions>

Initial presentation by default of the website of Scientia Medica is in English. To submit an article in Portuguese select the Portuguese language, so that items of submission function correctly. If the article is in English, the submission may follow the initial interface.

To begin the submission, you must register yourself as an author at the journal's webpage, where a user name and a password will be chosen. Enter your data in the appropriated fields and check "Author" at the bottom of the registration form, besides "Reader", which is checked by default. Once registered, you can enter the system at any time, with your login and password (in ACCESS, on the top of the webpage).

Automatically, after completing the initial registration process, or when a previously registered user enter with login and password, the system refers to the "User Home", which lists the roles that the person can play in the journal. Clicking in the author role, a list with the active submissions appears, and a new submission may be initiated.

The author does not need to complete the steps of submission at once. It is possible to return at any time to the submissions listed as "incomplete" in the list of active submissions. It is essential to follow the instructions that will appear in the five steps of the submission.

Choice of Section

Starting the submission, the author chooses the section in which the article should be inserted. In addition to the instructions already given in these Guidelines for Authors, specific information about each type of article are in the "**Section Policies**" of Scientia Medica:

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/scientiamedica/ojs/index.php/scientiamedica/about/editorialPolicies#sectionPolicies>

Submission Checklist

The author who is doing the submission must check several items by which all authors take responsibility to meet the standards and guidelines of Scientia Medica.

Copyright Notice

The authors declare to accept copyright policy practiced by the journal. Submission of originals to Scientia Medica implies the transfer by authors of the right for printed and digital publication. Authors retain copyright and grant the journal the right for first publication. If authors wish to include the same data into another publication, they must cite Scientia Medica as the site of original publication. As this is an open access journal, articles are allowed for free use in scientific, educational, non-commercial applications, with citation of the source. Content of Scientia Medica is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International license (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>

Inclusion of Metadata

- Metadata must be carefully filled. Please follow these instructions.
- The names of **ALL** authors of the article must be added to the submission site, in the authorship order and the same they appear on the cover page, as well as their **e-mails**.
- Author's institutions, which will appear in the publication, as well as their titles and functions, should be informed in the Cover Page and should also be typed in the "Bio statement" field of the metadata.

It is very important that the person making the submission enter valid e-mail addresses for all authors, in the specified fields.

When finished filling the data in English, click the menu "Enter the information in additional languages" (**not the same menu of initial language interface**), located at the top center of the metadata page, and choose "Português" to include the title, abstract and key words in Portuguese. If the authors are not Brazilian or Portuguese, this step can be skipped.

Identify the language in which the main text is drafted. If the article is written in English, mark "en"; if it is in Portuguese, set "pt", and in Spanish, set "es". Identification of the language is important for article indexing in databases.

Transfer of Manuscript

Browse the main document on your computer and transfer it.

Transfer of Supplementary Files

The cover page, completed according to the instructions provided, and the Ethics Approval document should be transferred at this time.

If there are image files or additional documents, they should also be transferred as supplementary documents. The system allows the inclusion of multiple documents.

ANEXO 3 – NORMAS ARTIGO CINÉTICO 02

REVISTA THE ANATOMICAL RECORD

AAA JOURNALS SUPPORT AUTHORS VIA SUBMISSION TO PUBMED

CENTRAL : AAA journal authors whose research is funded by NIH will not have to worry about submitting their accepted manuscripts to PubMed Central (PMC). AAA's publisher, Wiley-Blackwell, will support authors by posting the accepted version of articles by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance by the journal. The accepted version is the version that incorporates all amendments made during peer review, but prior to the publisher's copy-editing and typesetting. This accepted version will be made publicly available on PMC 12 months after publication. The Anatomical Record is already freely available one year following publication on Wiley Online Library. The NIH public access mandate applies to all articles based on research that has been wholly or partially funded by the NIH and that are accepted for publication on or after April 7, 2008. In addition to depositing manuscripts on behalf of NIH-funded authors, Wiley has reached an agreement with the Howard Hughes Medical Institute (HHMI) to make post-peer reviewed articles publicly available six months after final publication. HHMI will cover the cost of this service. For other authors of primary research articles whose funding agency requires earlier public access, Wiley-Blackwell offers a \$3,000 funded access option for public availability in PubMed Central and on the journal's website immediately upon publication. Details are available at [Author Resources - Funded Access](#).

The Anatomical Record is an official publication of the [American Association for Anatomy](#). *The Anatomical Record's* purpose is to publish new discoveries in the morphological aspects of molecular, cellular, organ systems, whole-organism, and evolutionary biology. Areas of particular interest include: studies using an integrative approach that incorporates methods and technologies from different disciplines; hypothesis-driven studies; studies that use imaging approaches in contemporary biological, biomedical, and evolutionary biology research, particularly when framed in the context of experimental models or questions. *The Anatomical Record* is particularly interested in the morphological

consequences of normal growth, disease, and/or interventions such as gene disruption, activation or over-expression on cell, tissue, organ, or whole-organism architecture. Submission of new findings made through the use of imaging modalities ranging from real-time signaling processes to gene or protein expression in individual cells, tissues or whole organisms to structural assessment of organ systems or whole-organism phenotype are also strongly encouraged.

In recognition and support of the growing importance of imaging, we are pleased to cover costs for use of color illustrations and images. High-quality, glossy paper is used for each journal issue, making color figures large and brilliant. The journal also does not charge for printed pages.

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS CONSIDERED FOR PUBLICATION

The Anatomical Record accepts four categories of publications:

1. Full-Length Papers
2. Reviews
3. Commentaries
4. Letters to the editor.

Full length papers present results or original studies dealing with morphological aspects of any vertebrate or invertebrate molecular pathway, cell type, organ system, whole-organism, or evolutionary biology. Inclusive topics are developmental, comparative, or evolutionary biology. With respect to developmental biology, our sister journal [*Developmental Dynamics*](#) focuses on biochemical and molecular mechanisms of vertebrate and invertebrate development. Thus, some overlap exists between the two journals. However, the area of coverage for developmental biological studies published in *The Anatomical Record* will be directed primarily to the organ, organ system, or whole-organism level, where descriptive studies of normal and abnormal development may become an important consideration in characterizing phenotypes.

Reviews of topics related to imaging or morphological aspects of any vertebrate or invertebrate molecular pathway, cell type, organ system, whole-organism, or topics

in evolutionary biology are encouraged, either through invitation or original submission. Educational topics dealing with the anatomical disciplines will be referred to our sister journal *Anatomical Sciences Education*. The criteria for acceptance of all review papers are the quality of the writing, originality, and significance.

Commentaries are welcome from the readership. **Commentaries** should be focused to highlight a topic or controversy, and may include references and figures. These contributions will be peer-reviewed by the Editorial Board and/or Board of Reviewers.

Letters to the editor also are welcome from the readership. **Letters** should be focused to highlight a topic or controversy, and may include references. These contributions will be peer-reviewed by the Editorial Board and/or Board of Reviewers.

No paper having appeared previously will be accepted, regardless of the language in which the previous publication was written. Simultaneous publication elsewhere will not be considered. All submissions will be evaluated for plagiarism. If plagiarism is discovered, management of the manuscript will stop while the Editorial Office communicates with the authors.

PROCESS

Submission of Manuscripts: Each manuscript must be accompanied by a cover letter which includes the following elements:

- The category of manuscript (full-length papers)
- The names, e-mail addresses, telephone, and fax numbers of the authors
- The title of the paper and a statement of its specific results and significance
- A statement that the material has not been published and is not under current consideration elsewhere
- The names, addresses, telephone numbers, and fields of interest of three to five persons outside your institution who are qualified to referee the paper. Similarly, identify those whom you would not want to referee the paper.

NOTE: submissions that do not include at least three (3) potential reviewers will be delayed in the review process while the editorial office communicates with the corresponding author to provide at least three (3) potential reviewers.

ALSO INCLUDE WITH THE MANUSCRIPT:

- Any paper that is in press or being considered elsewhere and includes information that would be helpful in evaluating the work submitted to *The Anatomical Record*.
- Written permission from any author whose work is cited as a personal communication, unpublished work or work in press, who is not an author of your manuscript. **Please contact the Editorial Office if you have an element which requires permission; the Editorial Office will supply you with the proper permission form to use when soliciting written permission.**

SUBMISSION PROCESS: Online submission of manuscripts is required at [ScholarOne Manuscripts](#). Check for an existing account. If you are submitting for the first time, and you do not have an existing account, create a new account.

Submit manuscript and all figures as separate files. DO NOT MAIL ANY PAPER COPIES. At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at ts.mcsupport@clarivate.com.

Notice of Wiley's Compliance with NIH Grants and Contracts Policy. The National Institutes of Health (NIH) has requested that its grantees submit copies of manuscripts upon their acceptance for publication to PubMed Central (PMC), a repository housed within the National Library of Medicine. On behalf of our authors who are also NIH grantees, Wiley will deposit in PMC at the same time that the article is published in our journal the peer-reviewed version of the author's manuscript. Wiley will stipulate that the manuscript may be available for public access in PMC 12 months after the date of publication. By assuming this responsibility, Wiley will ensure that authors are in compliance with the NIH request, as well as make certain that the appropriate version of the manuscript is deposited. When an NIH grant is mentioned in the Acknowledgements or any other section of a manuscript, Wiley will assume that the author wants the manuscript deposited in PMC, unless the author states otherwise. The author can communicate this via email, or a note in the manuscript. The version of the manuscript that Wiley sends to PMC will be the accepted version, i.e., the version that the journal's Editor-in-Chief sends to Wiley for publication. Wiley

will notify the author when the manuscript has been sent to PMC. Wiley reserves the right to change or rescind this policy. For further information, please get in touch with your editorial contact at Wiley, or see the NIH Policy on Public Access, located at: <http://www.nih.gov/about/publicaccess/>.

FORM

Manuscripts should have uniform style according to *The Anatomical Record*, as detailed below. Manuscripts should be written in English and be as concise as possible, without omitting relevant methods or results. Literature surveys or extensive bibliographies will not be published.

The Anatomical Record limits supplemental material to large tables of data. Please contact the editorial office staff regarding supplemental material.

A publishing innovation of *The Anatomical Record* is video figures and interactive 3D PDF figures. This innovation is referred to as AR WOW Video Papers. The video and interactive 3D PDF figures are embedded in the electronic paper, just as traditional static figures are embedded. The video and interactive 3D PDF figure call-outs in the electronic version are active hyperlinks to the figures. The hyperlinks are printed in the call-out so that the print version of the paper has the URL listed to the video figures and interactive 3D PDF figures. The important advantage of embedded video and interactive 3D PDF figures is permanency. This is different than supplemental material, which eventually may be made inaccessible because of limits to server space. Not so for AR WOW video figures and interactive 3D PDF figures; they are part of the permanent record of the published paper.

Text should be supplied in a format compatible with Microsoft Word for Windows. Mac users are asked to save their files with their appropriate file extension (i.e., .doc, .xls, .tif, .eps, etc.). For example, when saving a Word document on a Mac, please add a suffix of ".doc". **ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) does NOT accept .pdf files.**

Abbreviations and style of references are contained in the current edition of the CBE style manual (sixth edition, 1994, Council of Biology Editors, Inc., Suite 230 N. Michigan Ave., Chicago, IL 60601). Spelling reference is to the current edition of Webster's International Dictionary. In items of nomenclature, this journal adheres to

the principles specified in Nomina Anatomica, Nomina Embryologica, Nomina Anatomica Veterinaria, and Nomina Anatomica Avium, where appropriate.

Manuscripts should be subdivided into the following sequence:

Title Page

Abstract

Text

Acknowledgments

Literature Cited

Footnotes

Tables

Figure Legends

Each subdivision should start on a new page.

Title page: The first page of the manuscript should include:

Title of paper

Full name of author(s)

Institutional affiliation and complete address

Telephone and facsimile numbers and e-mail address of the corresponding author

Running title not to exceed 45 letters and spaces

Individual and address to whom correspondence concerning manuscript should be sent

All grant information in the following format: Grant sponsor(s): _____; Grant number(s): _____.

Abstract: Submit an abstract of 250 words or less that will serve in lieu of a concluding summary. The abstract must be written in complete sentences. It should concisely state the significant findings without reference to the rest of the paper. Append three to eight key words at the end of the abstract for the purposes of citing your work by the secondary services.

Text: This is divided into an Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion sections.

Literature Cited: Text references to literature should be arranged chronologically by author's name followed by year of publication:

. . . studies by Gheerbrandt et al., (2005) reveal
 . . . studies by Geisler and Uhen (2005) shown
 . . . a recent report (Buchholtz, 2007)
 . . . (Uhen, 2007)

When references are made to more than one paper by the same author, published in the same year, they are to be designated in the text as (Kelley, 1970a,b) and in the literature list as follows:

Kelley RO. 1970a. An electron microscopic study of mesenchyme during development of interdigital spaces in man. *Anat Rec* 168:43-54.
 Kelley RO. 1970b. Fine structure of apical, digital and interdigital cells during limb morphogenesis in man. In: *Proceedings of the VIIth International Congress of Electron Microscopy*. Vol. III: p 381-382.

Footnotes: Number footnotes to the text consecutively. The corresponding reference numbers must be clearly indicated in the text. Additional references to the identical footnote must be numbered with the next consecutive number, for example:

¹ Material used for this experiment was . . .
² provided by . . .
³ See footnote 2, page . . .

Type table footnotes directly beneath the table and number them 1, 2, 3 etc. They must not be numbered in sequence with text footnotes.

Tables: All tables must be cited in the text and have titles. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes. Since tabular matter is expensive to reproduce, it should be simple and uncomplicated with as few vertical and horizontal rules as possible.

Figure legends: All figures must be cited in the text and must have legends. Number figures, including charts and graphs, consecutively throughout the text. Give text references to figures only in terms of the figure number. Whenever possible, integrate figures into the text. Group figures to fit a single page with their appropriate legend. References to relevant text passages can often reduce the length of legends and avoid redundancy.

Abbreviations: Spell out all nonstandard abbreviations the first time used. Abbreviations for all figures should be listed alphabetically and placed before the first figure in which they are mentioned, e.g.,

Digital Illustrations: *The Anatomical Record* is known for its free-of-charge publication of high-quality figures. To maintain this level of quality, it is necessary to require images to be submitted and processed with this goal in mind. Therefore, when preparing digital art, please submit figures in separate .tif or .eps file formats, with the following attributes:

- CMYK format for color figures (color figures are FREE to all authors)
- 300 DPI/PPI for picture-only (without text of any kind) figure files
- 600 DPI/PPI for figures containing pictures and line elements (i.e., text labels, thin lines, arrows, etc.)
- 1200 DPI/PPI for black and white images such as line drawings, graphs, or charts

Scaling, cropping, and rotating should be performed in the originating application. To ensure that your figures will not be too large to upload, be sure to adjust the height and width to approximately 2500 pixels. If the figure(s) does not meet the specifications shown above (including not exceeding the maximum size of 2500 pixels), please use graphics software (e.g., Adobe Photoshop or Illustrator) to modify the figure(s).

ATTENTION AUTHORS: Please verify that figure files meet the printer's specifications for format and resolution, at the time that you submit the original version of your manuscript. **Note that .tif (or .eps) file formats for figures (black and white, color, and grayscale) is recommended.** We recommend creating your graphics, with all fonts and scale bars included, using Photoshop, Illustrator, or Freehand and then uploading the figure files into ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central). File formats that are NOT acceptable are JPG/JPEG, GIF, ONG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel.

Cover Illustrations: Authors are encouraged to submit CMYK color figures for consideration as cover illustrations. These figures must be submitted with the manuscript, preferably sized to 21 x 26 cm, with 600 DPI/PPI resolution.

Care and Use of Experimental Animals: *The Anatomical Record* and the American Association for Anatomy require that all studies involving experimental animals be conducted in a humane manner and in accordance with all local, state and federal guidelines for the care and utilization of laboratory animals. Husbandry of the animals must meet the [NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory](#)

Animals. Each manuscript must include details of the a) food and water regimen, b) light cycles, c) appropriate tranquilizers, analgesics, anesthetics, and care performed in association with all surgical procedures, d) manner by which the animals were euthanized, including drugs and their dosages, and e) written assurance that an Institutional Animal Care and Use Committee (or equivalent) approved the protocol.

Protection of Human Subjects: *The Anatomical Record* and the American Association for Anatomy also require that all studies involving human subject adhere to the principles of the Declaration of Helsinki or research in Human Beings. Each manuscript must include details of the a) number of subjects, b) age, c) gender, d) women, children and other minorities, e) inclusion and exclusion criteria, and f) written assurance that an Institutional Review Board (or equivalent) approved the protocol.

AAA Guidelines for Research Involving Human Subjects and Vertebrate Animals: The authors signify by submission of their manuscript that research involving use of human subjects—including research for educational studies—has been conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and [Title 45, U.S. Code of Federal Regulations, Part 46, Protection of Human Subjects, Revised November 13, 2001](#), unless regulated by more restrictive state or local laws. Research involving vertebrate animals must adhere to [AAA's Guiding Principles in the Care and Use of Animals](#). For investigations involving human subjects or vertebrate animals, a statement of protocol approval from an Institutional Review Board (IRB) or Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or its equivalent, respectively, must be included in the Methods section of the paper. Editors/Associate Editors are expected to refuse papers in which evidence of adherence to these principles is not stated explicitly.

MISCELLANEOUS

- Do not hyphenate words at the end of the lines.
- Corrections to the manuscript should be typed or printed legibly in ink.
- Do not begin sentences with abbreviations.
- Spell out the word Figure in the text except when it appears in parentheses: Figure 2, (Figs. 4-6).
- Always spell out numbers when they stand as the first word in a sentence, abbreviations cannot follow such numbers. Numbers indicating time, weight

and measurements are to be in Arabic numerals when followed by abbreviations (e.g., 2mm; 1sec; 3ml). In general, write out the numbers one to ten in the text. All higher numbers should be given as numerals.

- The metric system should be used for all measurements, weights, etc.
- The author will be asked to sign a [Copyright Transfer Agreement](#) transferring rights to the publisher, who reserves copyright.
- It is the current policy to underwrite all normal black-and-white tabular and illustration costs.

Proofs: A single set of page proofs will be sent via E-mail to the corresponding author. All corrections should be marked clearly directly on page proofs.

Reprints: Reprints may be purchased at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=ar>. It is important to order initially a sufficient quantity of reprints, since the price is substantially higher if they are ordered after the paper has been published.

COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT POLICY

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the non-standard CTA

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with *The Anatomical Record* non-standard CTA to sign. The terms and conditions of the non-standard CTA can be previewed below: [Terms and Conditions](#). Please do not complete this PDF until you are prompted to login into Author Services as described above.

Note to Contributors on Deposit of Accepted Version

Funder arrangements

Certain funders, including the NIH, members of the Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust require deposit of the Accepted Version in a repository after an embargo period. Details of funding arrangements are set out at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. Please contact the Journal production editor if you have additional funding requirements.

Institutions

Wiley has arrangements with certain academic institutions to permit the deposit of the Accepted Version in the institutional repository after an embargo period. Details of such arrangements are set out at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Visit the new [Author Services](#) today! Features include:

- **Free access** to your article for 10 of your colleagues; each author of a paper may nominate up to 10 colleagues. This feature is retrospective — even articles already published offer this feature for free colleague access
- Access in perpetuity to your published article
- Production tracking for your article and easy communication with the Production Editor via e-mail.
- A list of your favorite journals with quick links to the Editorial Board, Aims & Scope, Author Guidelines, and the Online Submission website. Journals in which you have tracked production of an article are automatically added to your Favorites.
- Guidelines on [optimizing your article](#) for maximum **discoverability**.

Data Sharing and Data Accessibility

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.