

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

ANA LUIZA PERETTI

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E DO ESTRESSE
OXIDATIVO DO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS WISTAR
OOFORECTOMIZADAS E SUBMETIDAS À VIBRAÇÃO
MECÂNICA**

CASCAVEL – PR
Fevereiro/2018

ANA LUIZA PERETTI

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E ESTRESSE OXIDATIVO DO
MÚSCULO SÓLEO DE RATAS WISTAR OOFORECTOMIZADAS
E SUBMETIDAS À VIBRAÇÃO MECÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível 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: Processo saúde-doença.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gladson Ricardo
Flor Bertolini

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Lucinéia
de Fátima Chasko Ribeiro

CASCADEL – PR
Fevereiro/2018

DEDICATÓRIA

À minha família e amigos, com amor e gratidão por esses dois e todos os outros anos de compreensão, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus dois orientadores, Prof. Dr. Gladson Ricardo Flor Bertolini e Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro por todos os ensinamentos, sempre pacientes e dispostos a contribuir com meu crescimento profissional e, até mesmo, pessoal.

À Prof. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão por repassar seus conhecimentos e permitir o desenvolvimento de todos os meus trabalhos junto ao Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional da universidade. Às professoras Marcia Miranda Torrejais e Ana Tereza B. Guimarães pelos ensinamentos e auxílio na realização das análises do trabalho.

Em geral, a todos os colegas do laboratório. Camila Mayumi, por dividir toda a pesquisa comigo, das preocupações e medos até os acertos. Alana e Maria Luiza por auxiliarem em toda a execução e manejo com os animais. Bárbara, Matheus, Ana Caroline, Taciane e Gustavo, obrigada pela convivência diária no laboratório e amizade. Juliana Souza, Fernando, Assis, José Fernando, Pamela S., Juliana Roncini, Pamela B. e Camila Kunh pelo auxílio nas coletas e análises.

Aos demais professores do programa de pós-graduação pelos ensinamentos e funcionários da instituição. A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO GERAL

Durante a menopausa, há um decréscimo na produção e secreção do hormônio estrogênio, que pode atuar na fisiopatologia de doenças inflamatórias e crônico-degenerativas, muitas das quais podem provocar alterações no tecido muscular. Buscando prevenir perturbações nesses tecidos, o uso de vibrações mecânicas vem crescendo, visando promover o ganho de força muscular. Dessa forma, este trabalho objetivou analisar e comparar os efeitos do tratamento com plataforma vibratória, em diferentes períodos, no tecido muscular de ratas *Wistar* ooforectomizadas, modelo que simula a privação hormonal. Para tal, 72 animais foram randomizados nos grupos Pseudooforectomia (GP) e Ooforectomia (GO). Decorridos 60 dias do pós-operatório, os animais foram submetidos a intervenções terapêuticas e divididos em oito subgrupos: animais que não realizaram nenhum tratamento e eutanasiados, após quatro (GP4 e GO4) e oito (GP8 e GO8) semanas, e animais tratados durante os mesmos períodos (GPT4, GOT4, GPT8 e GOT8) semanas. O tratamento consistiu no uso de plataforma vibratória, utilizando frequência de 60Hz e duração de 10 minutos, três vezes por semana, durante quatro ou oito semanas. Acabados os tratamentos, os animais foram eutanasiados e os músculos sóleos coletados e processados. Os dados foram analisados quanto à normalidade e análise da variância de três vias, adotando-se nível de significância de 5%. Na análise morfológica, os grupos ooforectomizados, especialmente GO8, apresentaram hipotrofia muscular; já os grupos que realizaram o tratamento, revelaram fibras maiores que os que não o realizaram, bem como GOT4 e GOT8 assemelharam-se aos animais dos grupos pseudo-ooforectomia. Em relação à área de secção transversa, GPT4 teve valores maiores que GP4 e GPT8, enquanto que GO8 foi menor que GO4, GP8 e GOT8; para maior e menor diâmetros das fibras musculares, os animais que não passaram pela ooforectomia possuíram valores maiores que os que foram submetidos ao procedimento, bem como os que realizaram o tratamento em relação aos que não o realizaram. Para a relação núcleos/fibra, GP4 e GO4 possuíram médias maiores em relação à GPT4 e GOT4 e, ao comparar-se o tempo, a relação é maior, em quatro semanas do que em oito. Não houve diferença estatística entre a relação capilares/fibra e porcentagem de tecido conjuntivo. Em relação ao estresse oxidativo, houve aumento da lipoperioxidação nos grupos GO8 e GOT8, com o tratamento não sendo eficaz na reversão desse dano; para as demais variáveis SOD, CAT e ChE não houve diferença significativa. Para avaliação, apenas dos grupos de quatro semanas, GO4 apresentou área das junções neuromusculares, menor que GP4, porém, o GOT4 igualou-se ao GPT4. Para o maior diâmetro das junções, GO4 também se apresentou diferente dos demais, porém, os animais do GOT4 foram maiores que GPT4. Houve predominância de fibras oxidativas no músculo sóleo. Com este trabalho, pode-se atribuir à privação hormonal a hipotrofia muscular nos grupos ooforectomizados, principalmente, em GO8, e a reversão desse processo e hipertrofia muscular nos grupos que realizaram o tratamento com plataforma vibratória.

Palavras-chave: privação hormonal; vibração de corpo inteiro; musculoesquelético.

GENERAL ABSTRACT

During menopause, there is a decrease in the production and secretion of the estrogen hormone, which may act on the pathophysiology of inflammatory and chronic-degenerative diseases, many of which can cause changes in muscle tissue. Seeking to prevent disturbances in these tissues, the use of mechanical vibrations has been increasing, aiming to promote the gain of muscle strength. In this way, the objective was to analyze and compare the effects of the whole body vibration treatment at different periods in the muscle tissue of oophorectomized Wistar rats, a model that simulates hormonal deprivation. For this, 72 animals were randomized into the Pseudo-oophorectomy (GP) and Oophorectomy (GO) groups. After 60 postoperative days, the animals were submitted to therapeutic interventions and divided into eight subgroups: animals that did not undergo any treatment and euthanized after four (GP4 and GO4) and eight (GP8 and GO8) weeks and animals treated during the same periods (GPT4, GOT4, GPT8 and GOT8). The treatment consisted of the use of vibratory platform, using 60Hz frequency and duration of 10 minutes, three times a week for four or eight weeks. At the end of the treatments, the animals were euthanized and the soleus muscles were collected and processed. The data were analyzed for normality and analysis of the three-way variance, adopting a significance level of 5%. In the morphological analysis, the oophorectomized groups, especially GO8, presented muscular hypotrophy and the groups that performed the treatment demonstrated larger fibers than those that did not, as well as GOT4 and GOT8 resembled the animals of the pseudo-oophorectomy groups. Regarding the cross-sectional area, GPT4 had values higher than GP4 and GPT8 whereas GO8 was lower than GO4, GP8 and GOT8; for larger and smaller diameters of muscle fibers, animals that did not undergo oophorectomy had higher values than those who underwent the procedure, as well as those who performed the treatment in relation to those who did not. For the number of nuclei/fiber, GP4 and GO4 had higher mean values in relation to GPT4 and GOT4 and, when compared to time, the number was higher in four weeks than in eight. There was no statistical difference between the number of capillary/fiber and the percentage of connective tissue. In relation to oxidative stress, there was an increase in lipoperoxidation in the GO8 and GOT8 groups, with the treatment not being effective in reversing this damage; for the other SOD, CAT and ChE variables there was no significant difference. For groups of only four weeks, GO4 presented a neuromuscular junction area smaller than GP4, but GOT4 matched GPT4. For the larger diameter of the junctions, GO4 also presented different ones than the others, however, the GOT4 animals were larger than GPT4. There was predominance of oxidative fibers in the soleus muscle. To sum up, this work can be attributed to the hormonal deprivation muscular hypotrophy in the oophorectomized groups, mainly in GO8, and the reversion of this process and muscular hypertrophy in the groups that performed the treatment with whole body vibration.

Key words: hormonal deprivation; whole body vibration; skeletal muscle.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
OBJETIVOS.....	13
REVISÃO GERAL DA LITERATURA.....	14
Tecido muscular.....	14
Menopausa e pós menopausa.....	17
Déficit de estrogênio no tecido muscular.....	18
Intervenções terapêuticas e a plataforma vibratória.....	20
Efeitos da plataforma vibratória no tecido muscular.....	21
Tratamento das doenças relacionadas às perdas hormonais.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
ARTIGO CIENTÍFICO 01.....	27
ARTIGO CIENTÍFICO 02.....	44
ANEXOS.....	69
Aprovação no Comitê de Ética.....	69
Normas da revista – Artigo 01.....	70
Normas da revista – Artigo 02.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da estrutura do músculo esquelético.....	15
Figura 2 - Ilustração dos componentes da fibra muscular.....	15
Figura 3 - Ilustração do mecanismo do Reflexo Tônico de Vibração.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ER α - Receptor de Estrogênio Alfa

ER β - Receptor de Estrogênio Beta

Hz - Hertz

JNM – Junção neuromuscular

JNMs – Junções neuomusculares

RVT - Reflexo de Vibração Tônico

INTRODUÇÃO

A menopausa atinge mulheres no mundo todo, independentemente de origem étnica, cor ou fatores sócio-demográficos, com sua intensidade e sintomas variados entre os indivíduos. Primordialmente, a função do estrogênio era exclusivamente sexual, porém, atribui-se a ele atuação na etiologia e fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias e crônico-degenerativas. Após a menopausa, a redução da secreção e produção dos hormônios implica na alteração de diversas células do corpo provocando modificações vasomotoras, sexuais e também queixas músculo-articulares (CASTROGIOVANNI et al., 2016; MAKARA-STUDZIŃSKA; KRYŚ-NOSZCZYK; JAKIEL, 2014; MARTÍN-MILLÁN; CASTÁNEDA, 2013).

As mudanças musculares evidenciam a redução da massa e força, sendo agravadas em mulheres após a menopausa (BRAGGION et al. 2016) pois o estrogênio controla a proliferação e diferenciação de mioblastos, diminui a apoptose de células, atuando assim no desempenho e estrutura muscular em mulheres por existirem receptores de estrogênio específicos nas células do tecido muscular (MARTÍN-MILLÁN; CASTÁNEDA, 2013).

Com o aumento da expectativa de vida atual, presume-se que muitas mulheres serão atingidas por essas alterações, o que poderá se tornar problema de saúde pública (BROTTO; BONEWALD, 2015). Não necessariamente todos os indivíduos na menopausa irão desenvolver essas alterações, todavia, mudanças no status hormonal podem interagir com fatores de risco como idade, doenças hereditárias e a redução da atividade física para induzir a doença ou influenciar os sintomas (CASTROGIOVANNI et al., 2016; REN et al., 2015; WATT, 2016). Dessa forma, é necessária a intervenção nos fatores modificáveis, destacando-se a realização de atividade física, o que pode ser capaz de melhorar a gravidade e frequência de quedas, força e flexibilidade muscular (GUPTA; MARCH, 2016).

Há evidências de que o exercício de vibração de corpo inteiro pode auxiliar no treino de força, uma vez que, fisiologicamente, é capaz de potencializar a contração muscular ao ativar o fuso muscular e órgão tendinoso de Golgi (CERCIELLO et al., 2016; PARK; SON; KWON, 2015; ANWER et al., 2016). Esse tipo de terapia também pode racionar tempo, sendo seguro e útil para pacientes com agravos da idade e

portadores de doenças, as quais os incapacitam de participar de modalidades ativas de exercício (PARK et al., 2013). O uso da plataforma vibratória como tratamento para osteoporose é conhecido (BUTEZLOFF et al., 2015; CASTROGIOVANNI et al., 2016; CERCIELLO et al., 2016), no entanto, há escassez na literatura sobre seus efeitos no tecido-alvo desse estudo, além de não haver um consenso sobre o melhor protocolo a ser utilizado no tratamento dessas alterações.

O uso da plataforma vibratória como tratamento para osteoporose é conhecido (BUTEZLOFF et al., 2015; CASTROGIOVANNI et al., 2016; CERCIELLO et al., 2016), no entanto, há escassez na literatura sobre seus efeitos no tecido alvo desde estudo, além de não haver um consenso sobre o melhor protocolo a ser utilizado no tratamento destas alterações.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar e comparar os efeitos do tratamento com plataforma vibratória, aplicada durante 4 e 8 semanas, no tecido muscular e articular de ratas *Wistar* ooforectomizadas.

Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do músculo sóleo, bem como quantificar os tipos de fibras musculares e analisar quantitativamente os receptores das junções neuromusculares.
- Avaliar o estresse oxidativo no tecido em relação à privação hormonal e ao tratamento com vibração mecânica.

REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura deste trabalho está organizada em tópicos que irão abordar os temas relevantes à pesquisa. Inicialmente, será discorrido sobre o tecido muscular de uma forma geral, abrangendo organização e funcionamento. Em seguida, será apresentado um tópico sobre a privação hormonal e posteriormente sobre as alterações deste período e, por fim, será abordado o uso da plataforma vibratória.

Tecido muscular

A massa muscular magra representa de 35-40% da massa corporal em mulheres e, em suma, o tecido é formado por um feixe de fibras musculares contráteis, multinucleadas (CARSON; MANOLAGAS, 2015; LAMOUNIER; MENETREY, 2016). O sistema músculo esquelético é responsável pela locomoção e atua no metabolismo energético. Os músculos fornecem carga aos ossos, nos quais estão fixos (CARSON; MANOLAGAS, 2015) e tal tecido é caracterizado por contrações rápidas e voluntárias. Seus componentes possuem nomenclatura especial, sendo a membrana celular, denominada de sarcolema; o citoplasma, de sarcoplasma, e o retículo endoplasmático liso de retículo sarcoplasmático. Os núcleos celulares localizam-se próximos ao sarcolema (FRONTERA; OCHALA, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As fibras musculares se organizam em grupos de feixes. O músculo como um todo é recoberto por uma camada de tecido conjuntivo, o epimísio. Dividindo as fibras em fascículos há o perimísio, outra camada de tecido conjuntivo que se dirige para a parte interna do músculo até outra camada denominada como endomísio, que reveste cada fibra individualmente (figura 1), sendo esta formada por miofibrilas. Este tecido conjuntivo que recobre o músculo é responsável pela união das fibras, permitindo a transmissão das forças para o músculo como um todo, fixando o músculo aos tendões e ossos, além de ser por entre ele que vasos sanguíneos possam manter as necessidades metabólicas do tecido (FRONTERA; OCHALA, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

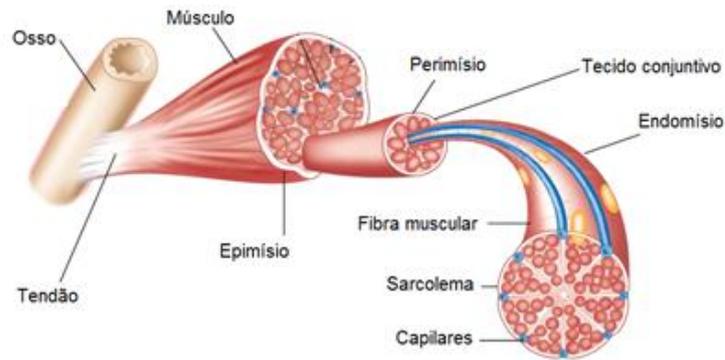


Figura 1: Ilustração da estrutura do músculo esquelético (STAUGAARD-JONES, 2011).

Nas miofibrilas são encontrados os sarcômeros, as unidades contráteis do músculo, nas quais estão dispostos filamentos de proteínas que atuam na realização da contração muscular. As quatro principais proteínas são a miosina, actina, tropomiosina e troponina. Para que a contração ocorra, há a liberação de acetilcolina (figura 2) na fenda sináptica, que irá iniciar a propagação do potencial de ação pela membrana, induzindo o retículo sarcoplasmático a liberar cálcio pelos túbulos T. A troponina é responsável por expor a actina que, ao se combinar com a miosina, possibilita suas sobreposições e formação de pontes cruzadas, permitindo assim a contração muscular. Os íons de cálcio são novamente bombeados para o retículo sarcoplasmático e armazenados, cessando a contração até um novo impulso (FRONTERA; OCHALA, 2015; GUYTON; HALL, 2008).

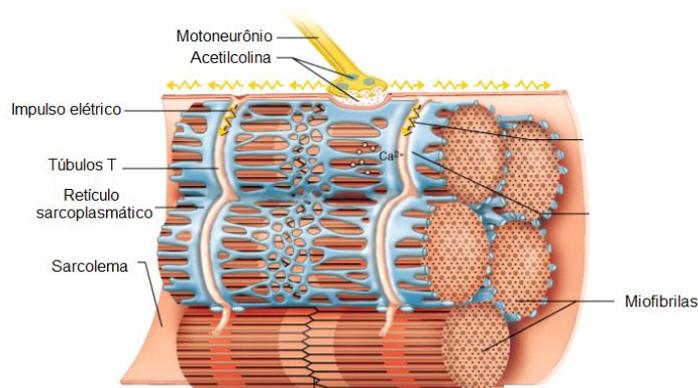


Figura 2: Ilustração dos componentes da fibra muscular (Acesso em: <http://www.fmh.utl.pt/cinesiologia/PDFs/TD2_OCM_1.pdf>).

Para que ocorra a contração muscular descrita acima, é necessária a liberação de acetilcolina. Esse neurotransmissor é liberado na junção neuromuscular (JNM), local em que ocorre a sinapse entre o sistema nervoso periférico e as fibras

musculares. Nas junções neuromusculares (JNMs), há uma fenda sináptica, entre as membranas pré (axônio) e pós-sináptica (fibra muscular). Os componentes das junções são o axônio, células de Schwann, vesículas e receptores de acetilcolina, além da enzima acetilcolinesterase, que desencadeará a liberação do neurotransmissor (GONZALEZ-FREIRE et al., 2014; NETO et al., 2015).

As JNMs são alvos de plasticidade, com o decorrer da idade, sofrendo desnervação com o tempo e podendo ser estimuladas para prevenir ou reverter esse processo, com base no exercício físico (NETO et al., 2015). As estruturas das JNMs são influenciadas pela inervação e pelo tipo de fibra muscular (GONZALEZ-FREIRE et al., 2014). As fibras podem ser classificadas em sua estrutura e composição molecular, de acordo com as isoformas da cadeia pesada de miosina e a atividade metabólica, podendo ser fibras do tipo I (lentas) e tipo II (rápidas). As primeiras são vermelhas, ricas em mioglobina e mitocôndrias, responsáveis pelas contrações contínuas, resistentes à fadiga e utilizando energia de ácidos graxos. As fibras musculares do tipo II, responsáveis por contrações rápidas, são classificadas como brancas, fadigáveis e utilizam a glicose como energia, sendo ainda subdivididas em fibras do tipo IIA, IIB e IIx (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PIOVESAN et al. 2009; TALBOT; MAVES, 2016).

Nos grupos musculares, há proporções variáveis do tipo de fibra, podendo ser remodeladas de acordo com o estímulo (TALBOT; MAVES, 2016). Esse sistema muscular possui uma alta plasticidade, ou seja, possui capacidade adaptativa, podendo ser regenerado depois de uma lesão não destrutiva e hipertrofiar-se, após um estímulo (BROTTO; BONEWALD, 2015; CARSON; MANOLAGAS, 2015). Por serem células pós-mitóticas, as fibras musculares fisiologicamente não possuem a capacidade de divisão celular, sendo o reparo, depois de uma lesão, realizado pelas células satélites, localizadas entre a membrana sarcoplasmática das miofibrilas e a lâmina basal (CORONA; GREISING, 2016; LAMOUNIER; MENETREY, 2016).

Essas células satélites são quiescentes no tecido, podendo representar de 5-10% das células do tecido musculoesquelético, dependendo da idade, espécie e tipo muscular. Quando ocorre um estímulo lesivo, primariamente, irá ocorrer um processo inflamatório, mediado por células inflamatórias, levando à formação de um hematoma. Após a fagocitose do tecido lesionado, haverá a regeneração das miofibrilas, depois

da ativação das células satélites que se proliferam e formam os mioblastos, seguida da remodelação e recuperação das fibras (LAMOUNIER; MENETREY, 2016).

Menopausa e pós-menopausa

A menopausa é caracterizada pelo fim do período reprodutivo e função menstrual da mulher, resultando na involução de células germinais e células produtoras dos hormônios femininos (HALLAL, 2015), sendo a definição da Organização Mundial da Saúde para este período como o término definitivo da menstruação provocado pela perda da atividade folicular do ovário (DAAN; FAUSER, 2015).

Durante o desenvolvimento embrionário, há a formação das células germinais femininas, porém, com interrupção da meiose dessas células até a puberdade. Nessa fase, inicia-se a maturação dos ovócitos e a liberação dos gametas femininos a cada menstruação. Ao longo do tempo, ocorre um declínio no número de ovócitos femininos, que culmina na menopausa, quando o número dessas células se finda. O término da fase reprodutiva não é abrupto, e sim, gradativo, com declínio na quantidade e qualidade dos ovócitos. Então, o desenvolvimento folicular torna-se ocasional até a progressão dos níveis hormonais estarem baixos (DAAN; FAUSER, 2015).

Esse período da vida da mulher pode iniciar entre os 40 até os 60 anos de idade, confirmado, após 12 meses de amenorréia, ou seja, a ausência da menstruação na exclusão de causas fisiológicas ou patológicas. Após a fase reprodutiva da mulher, irá ocorrer a transição da menopausa e, assim, a pós-menopausa, sendo esse período de transição caracterizado principalmente pelo início dos sintomas vasomotores (DAAN; FAUSER, 2015; ROBERTS; HICKEY, 2016). Essa transição atinge cerca de 1,5 milhões de mulheres por ano, envolvendo, além dos incômodos vasomotores, alterações sexuais, distúrbios do sono, alterações mentais e musculoesqueléticas, dependentes do estado psicológico, físico e social, além dos níveis de hormônios sexuais das mulheres (MAKARA-STUDZIŃSKA; KRYŚ-NOSZCZYK; JAKIEL, 2014; SANTORO; EPPERSON; MATHEWS, 2015).

A diminuição dos hormônios sexuais femininos, presentes no organismo, leva à perda da integridade e função em qualquer tecido (CARSON; MANOLAGAS, 2015). Em longo prazo, esse hipoestrogenismo atinge o sistema musculoesquelético, pois,

uma vez que esses tecidos possuem receptores-alvo para o hormônio, sua ação também irá ser afetada (SIPILÄ; FINNI; KOVANEN, 2015).

As principais alterações provocadas são a diminuição da massa muscular, limitações funcionais e incapacidades físicas (SIPILÄ; FINNI; KOVANEN, 2015). Além disso, há a influência hormonal na formação do esqueleto e sua homeostase, somado a mecanismos intrínsecos, como a senescência das células no tecido ósseo, atividade celular na cartilagem articular e perturbações no volume de proteínas e metabolismo energético dos músculos (CARSON; MANOLAGAS, 2015; WATT, 2016).

Estima-se que, em 2050, cerca de 20% da população terá mais que sessenta anos de idade. Com esse crescente aumento da expectativa de vida e buscando diminuir as consequências para a saúde pública e economia, faz-se necessário intervir em doenças individuais, como a diminuição da força e massa muscular, doenças resultantes do envelhecimento e alterações hormonais (BROTTO; BONEWALD, 2015).

O estrogênio no tecido muscular

Embora o declínio da função muscular inicie por volta dos 35 anos de idade, o envelhecimento do tecido pode levar à atrofia das fibras, perda de unidades motoras, fibrose e acúmulo intramuscular de gordura, influenciando a massa, além da força muscular ser acometida pela disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e senescência celular (CARSON; MANOLAGAS, 2015). Essas alterações afetam a funcionalidade, já que se relacionam com deficiências físicas, fragilidade, diminuição da mobilidade e, ainda, aumentam as incidências de hospitalização (EDWARDS et al., 2015).

Essas alterações podem associar-se com a redução dos hormônios sexuais circulantes (BRAGGION et al., 2016; CARSON; MANOLAGAS, 2015; MARTÍN-MILLÁN; CASTÃNEDA, 2013). Os estrógenos são capazes de influenciar o crescimento muscular, após o período pós-natal, além de serem responsáveis pelo dimorfismo sexual. Não só fatores de crescimento, citocinas e o suporte de carga influenciam a massa e função muscular, mas os hormônios sexuais são capazes de promover efeitos benéficos na função metabólica e regeneração dos músculos esqueléticos (CARSON; MANOLAGAS, 2015).

Existem receptores estrogênicos específicos, como o Receptor de Estrogênio Alfa (ER α) e o Receptor de Estrogênio Beta (ER β), além do receptor de estrogênio-1,

acoplado a G-proteína (GPER1) (SIPILÄ; FINNI; KOVANEN, 2015), expressos em células do sistema muscular, como as células satélites, miofibrilas e células endoteliais. Embora todos estejam presentes no tecido, atribui-se ao ER α as principais mudanças na massa e propriedades contráteis musculares (CARSON; MANOLAGAS, 2015).

As células satélites expressam receptores para andrógenos e estrógenos e esses hormônios podem estimular a atividade de tais células, dos fatores de regulação miogênica, como a proliferação e diferenciação dos mioblastos, dos fatores regulatórios do ciclo celular, bem como diminuir a apoptose de células musculares e atrofia, além de melhorar o desempenho e estrutura muscular em mulheres (CARSON; MANOLAGAS, 2015; MARTÍN-MILLÁN; CASTÁÑEDA, 2013).

O estrogênio pode interferir nos níveis de proteínas musculares, metabolismo energético e função mitocondrial. Como há ER β na membrana celular, citoplasma e membrana nuclear, essa alteração nos níveis de estrogênio parece desregular os níveis de proteína, pois, dentre outras, ele pode diminuir a fosforilação de AKT, uma proteína que é capaz de regular o crescimento celular e síntese de glicogênio, podendo afetar, assim, a recuperação do tecido após atrofia por desuso. Essas alterações nos níveis de AKT, por consequência, podem afetar a síntese de proteínas musculares, degradação e sobrevivências de células (CARSON; MANOLAGAS, 2015; MESSIER et al., 2011).

Os efeitos negativos sobre a massa muscular desse hipoestrogenismo, embora não bem compreendidos, podem relacionar-se com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa e interleucina-6, por exemplo, que irão coadjuvar o catabolismo muscular (MESSIER et al., 2011). Também é possível que ocorra o acúmulo de radicais livres, potencializando o estresse oxidativo, assim como alterações mitocondriais e aumento da atividade apoptótica. O metabolismo energético depende do tipo de fibra, expressão de enzimas metabólicas e abundância de substratos, sendo afetado por essa deficiência hormonal e podendo resultar em alterações no metabolismo oxidativo e volume de proteínas com ER α e ER β , regulando a síntese mitocondrial (CARSON; MANOLAGAS, 2015; MESSIER et al., 2011).

Essa alteração nas proteínas parece afetar também a absorção das mesmas e, dessa maneira, modificar a estimulação neurogênica de fibras musculares tipo II,

responsáveis pela contração rápida, provocando uma perda acelerada das unidades motoras rápidas, com uma conversão para fibras do tipo I, fibras lentas (DUTRA et al., 2016; ILICH et al., 2015). A perda da força muscular ocorre de duas a cinco vezes mais rapidamente do que a perda de massa muscular (MOKHTARZADEH; ANDERSON, 2016), devido a esse aumento no número de fibras lentas e perda das fibras rápidas (MESSIER et al., 2011).

Embora as evidências não sejam tão elucidadas, assume-se que as alterações dos hormônios sexuais femininos, somados ao envelhecimento, a diminuição da atividade física e a nutrição prejudicada possam atuar no desenvolvimento dessas alterações (MESSIER et al., 2011). Outro fator a ser analisado no tecido muscular é que mudanças nesse tecido ainda podem ser consequência indireta da osteoporose e suas morbidades, uma vez que a diminuição da densidade óssea de tal doença pode provocar fraturas, afetando a homeostase muscular, com declínio da sua função, devido ao desuso (EDWARDS et al., 2015).

Intervenções terapêuticas e a plataforma vibratória

Devido aos sintomas provocados pela entrada da menopausa e suas consequências na pós-menopausa, é necessário diminuir ou tratar as manifestações desse período. Para tal, é necessário compreender os sintomas e minimizar os fatores de risco, para melhor entender e atuar no tratamento das mulheres que são afetadas (SANTORO; EPPERSON; MATHEWS, 2015). Dessas alterações, destacam-se morbidades associadas à mobilidade e, dessa forma, o tratamento de tais doenças gera benefícios econômicos para a sociedade (PARK; SON; KWON, 2015), visto que alterações no sistema musculoesquelético também geram cuidados hospitalares por longos períodos (EDWARDS; REILLY, 2015).

Após a instalação de alguma patologia, há a comprovação de que estímulos mecânicos atuam na manutenção dos tecidos ósseo, muscular, articular e nervoso (CERCIELLO et al., 2016). Para manter ou então melhorar esses tecidos, há casos em que exercícios intensos são contraindicados, pois há o risco de provocarem quedas ou fraturas, além do fato de indivíduos, que já possuem mobilidade limitada, não poderem realizar determinados tipos de exercício físico (EDWARDS; REILLY, 2015; PARK; SON; KWON, 2015).

Dentre as modalidades utilizadas para o tratamento dessas alterações,

destaca-se o crescimento do uso da plataforma vibratória, em distúrbios do sistema musculoesquelético (EDWARDS; REILLY, 2015), sendo um método considerado com menor tempo de tratamento que outros programas de treino de resistência (ANWER et al., 2016).

O tratamento com a plataforma vibratória pode ser explicado segundo as leis de Isaac Newton, em que a força (F) de um objeto é igual à sua massa (M), multiplicado por sua aceleração (A), expressa na fórmula “ $F = M \times A$ ” e, dessa forma, pode-se potencializar a força desse corpo, aplicando-se aceleração ao manter a massa constante. As plataformas vibratórias são capazes de promover oscilações e vibrações senoidais, exigindo adaptações do corpo para manter o indivíduo posicionado sobre a mesma, podendo, ainda, serem realizados exercícios estáticos e dinâmicos sobre ela (PARK; SON; KWON, 2015).

Os estímulos entregues que possuem maiores benefícios são feitos com plataformas vibratórias de baixas magnitudes e altas intensidades. As vibrações podem ser entregues para o corpo inteiro ou de forma localizada, aplicada diretamente sobre um determinado músculo, por exemplo. A estimulação mecânica é dada com uma determinada frequência em hertz (Hz), ou seja, a repetição de ciclos de oscilações e amplitude de oscilações, dadas pelo deslocamento de pico a pico da plataforma em milímetros, com diferentes valores para cada quadro clínico desejado (CERCIELLO et al., 2016; EDWARDS; REILLY, 2015; PARK; SON; KWON, 2015).

As plataformas vibratórias, utilizadas atualmente, podem ter deslocamento horizontal (com vibrações lado a lado), vertical (vibrações uniformes para cima e para baixo) e rotação ou triplanar (envolvendo os planos anterior e posterior, lado a lado e para cima e para baixo) (PARK; SON; KWON, 2015). Sua aplicação pode ser variada, como para a melhora da força e flexibilidade muscular, controle da dor, reduzir o início da fadiga e acelerar a reabilitação, bem como atuar na densidade mineral óssea (CERCIELLO et al., 2016). Seu uso possui contraindicações em casos de cânceres, diabetes *melittus* grave e cirurgias ou implantações recentes (EDWARDS; REILLY, 2015).

Efeitos da plataforma vibratória no tecido muscular

Os estímulos mecânicos da plataforma vibratória são capazes de alterar o comprimento musculotendíneo, após a percepção dos estímulos por receptores, que

irão detectar os reflexos de estiramentos e ativar os fusos musculares, sensíveis às alterações no comprimento das fibras musculares (PARK; SON; KWON, 2015). Essa contração voluntária pode ser explicada pelo Reflexo de Vibração Tônico (RVT), em que a vibração irá promover estímulos aferentes nos fusos musculares (respondendo com base nas fibras aferentes Ia), havendo a ativação proprioceptiva do sistema sensorial e consequente contração muscular (CERCIELLO et al., 2016).

Além dos fusos musculares, motoneurônios alfa irão ser estimulados, potencializando o recrutamento de fibras musculares. Assim, esses motoneurônios também poderão inibir a coativação de antagonistas, aumentando, dessa forma, a força muscular do agonista. O estímulo da vibração também pode induzir uma estimulação da medula e, com isso, proporcionar um melhor controle nervoso desse recrutamento muscular. Com as contrações e após captar variações nas tensões, os órgãos tendinosos de Golgi (fibras aferentes Ib) também poderão ser estimulados, promovendo, portanto, uma atividade cíclica entre contrações excêntricas e concêntricas (figura 3) (CERCIELLO et al., 2016; HALLAL; MARQUES; GONÇALVES, 2010; VEGAR; IMTIYAZ, 2014).

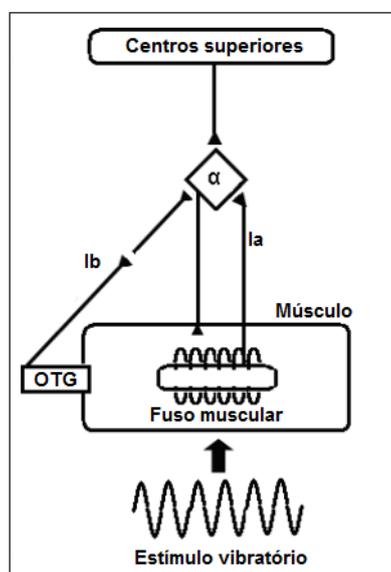


Figura 3: Ilustração do mecanismo do Reflexo Tônico de Vibração (Adaptado de: HALLAL; MARQUES; GONÇALVES, 2010).

O RTV é dependente da duração e intensidade do estímulo. Em uma sessão, pode-se observar um acréscimo na força muscular máxima, potência e salto, entretanto, sessões contínuas e exposições prolongadas podem ser nocivas ao músculo e apresentar efeitos negativos, como a redução da força e a fadiga muscular

(CERCIELLO et al., 2016).

Com o uso da plataforma vibratória, o ganho de força e potência muscular leva, possivelmente, ao aumento da área de secção transversa das fibras musculares, denotando hipertrofia. A própria estimulação proprioceptiva do RTV também é responsável pelo acréscimo na produção dessa força (PARK; SON; KWON, 2015).

É comprovado que o treino de vibração aumenta a atividade eletromiográfica e, por exigir contrações, logo, o consumo de oxigênio, o fluxo sanguíneo e a temperatura muscular também serão afetados, sendo proporcionalmente diretos à vibração (VEGAR; IMTIYAZ, 2014). Há indícios de que, devido às contrações musculares, a vibração pode atingir e promover modificações nos vasos sanguíneos, visto que a vasodilatação auxilia a nutrição dos tecidos e remoção de produtos, resultantes do metabolismo celular, além de aumentar a velocidade média do fluxo sanguíneo pela diminuição da viscosidade do sangue, promovida pela vibração (PARK; SON; KWON, 2015).

Tratamento das doenças relacionadas às perdas hormonais

Além das alterações descritas acima, há ainda a grande incidência de osteoporose em mulheres na menopausa. As alterações no tecido muscular também podem ser consequências indiretas da osteoporose e suas morbidades, uma vez que a diminuição da densidade óssea dessa doença pode provocar fraturas, afetando a homeostase muscular, com declínio da sua função, devido ao desuso (EDWARDS et al., 2015). Assim, a prevenção, controle e tratamento dessas doenças devem envolver uma equipe interdisciplinar, com a atuação de várias profissões, procurando uma melhor qualidade de vida para os indivíduos afetados. Tanto médicos, fisioterapeutas e educadores físicos devem atuar na prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças, mas tal acompanhamento ainda deve estender-se a assistentes sociais e psicológicos, a fim de verificar as comorbidades de hospitalizações e alterações no âmbito familiar, proporcionando contato com nutricionistas, os quais podem especificar uma dieta adequada; além disso, é preciso haver outros profissionais e áreas, buscando maximizar os benefícios para as pacientes.

REFERÊNCIAS

- ANWER, S.; ALGHADIR, A.; ZAFAR, H.; AL-EISA, E. Effect of whole body vibration training on quadriceps muscle strength in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. **Physiotherapy**, v. 102, p. 145–151, 2016.
- BRAGGION, G. F.; ORNELAS, E.; CURY, J. C. S.; LIMA, N. E. A.; AQUINO, R. C.; FONSECA, F. L. A.; MAIFRINO, L. B. M. Morphological and Biochemical Effects on the Skeletal Muscle of Ovariectomized Old Female Rats Submitted to the Intake of Diets with Vegetable or Animal Protein and Resistance Training. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-10, 2016.
- BROTTO, M.; BONEWALD, L. Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. **Bone**, v. 80, p. 109-114, 2015.
- BUTEZLOFF, M. M.; ZAMARIOLI, A.; LEONI, G. B.; SOUSA-NETO, M. D.; VOLPON, J. B. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 727-735, 2015.
- CARSON, J. A.; MANOLAGAS S. C. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. **Bone**, v. 80, p. 67-68, 2015.
- CASTROGIOVANNI, P.; TROVATO, F. M.; SZYCHLINSKA, M. A.; NSIR, H.; IMBESI, R.; MUSUMECI, G. The importance of physical activity in osteoporosis. from the molecular pathways to the clinical evidence. **Histology and Histopathology**, v. 17, 2016.
- CERCIELLO, S.; ROSSI, S.; VISONÀ, E.; CORONA, K.; OLIVA, F. Clinical applications of vibration therapy in orthopaedic practice. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 6, n. 1, p. 147-156, 2016.
- CORONA, B. T.; GREISING, S. M. Challenges to acellular biological scaffold mediated skeletal muscle. **Biomaterials**, n. 104, p. 238-246, 2016.
- DAAN, N. M. P.; FAUSER, B. C. J. M. Menopause prediction and potential implications. **Maturitas**, v. 82, p. 257-265, 2015.
- DUTRA, M. C.; OLIVEIRA, M. L.; MARIN, R. V.; KLEINE, H. C. R.; SILVA, O. L.; CASTRO, M. L. Whole-body vibration improves neuromuscular parameters and functional capacity in osteopenic postmenopausal women. **Menopause**, v. 23, n. 8, p. 1-6, 2016.
- EDWARDS, J. H.; REILLY, G. C. Vibration stimuli and the differentiation of musculoskeletal progenitor cells: Review of results in vitro and in vivo. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 568-582, 2015.

EDWARDS, M. H.; DENNISON, E. M.; AIHIE SAYER, A. A.; FIELDING, R.; COOPER, C. Osteoporosis and sarcopenia in older age. **Bone**, v. 80, p. 126-130, 2015.

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.

GONZALEZ-FREIRE, M.; CABO, R.; STUDENSKI, S.A.; FERRUCCI, L. The neuromuscular junction: aging at the crossroad between nerves and muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, 2014

GUPTA, A.; MARCH, L. Treating osteoporosis. **Australian Prescriber**, v. 39, n. 2, 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

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.

ILICH, J. Z.; INGLIS, E.; KELLY, O. J.; MCGEE, D. L. Osteosarcopenic obesity is associated with reduced handgrip strength, walking abilities, and balance in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 26, p. 2587–2595, 2015.

JUNQUEIRA, A. L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 3, p. 466–470, 2012.

LAMOUNIER, T.; MENETREY, J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 3, n. 15, p.1-9, 2016.

MAKARA- STUDZIŃSKA¹, M. T.; KRYŚ-NOSZCZYK, K. M.; JAKIEL, G. Epidemiology of the symptoms of menopause – an intercontinental review. **Przegląd Menopauzalny**, v. 13, n. 3, p. 203-211, 2014.

MARTÍN-MILLÁN, M.; CASTÁNEDA, S. Estrogens, osteoarthritis and inflammation. **Joint Bone Spine**, v. 80, p. 368–373, 2013.

MESSIER, V.; RABASA-LHORET, R.; BARBAT-ARTIGAS, S.; ELISHA, B.; KARELIS, A. D.; AUBERTIN-LEHEUDRE. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. **Maturitas**, v. 68, p. 331-336, 2011.

MOKHTARZADEH, H.; ANDERSON, D. E. The Role of Trunk Musculature in Osteoporotic Vertebral Fractures: Implications for Prediction, Prevention, and Management. **Current Osteoporosis Reports Journal**, v. 14, p. 67-76, 2016.

NETO, W.K.; CIENA, A.P.; ANARUMA, C.A.; SOUZA, R.R.; GAMA, E.F. Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: systematic review of animal experimental studies. **BMC Research Notes**, v.8, 2015

PARK, Y. G.; KWON, B. S.; PAR, J. W.; CHA, D. Y. NAM, K. Y.; SIM, K. B. et al. Therapeutic Effect of Whole Body Vibration on Chronic Knee Osteoarthritis. **Annals of Rehabilitation Medicine**, v. 37, n. 4, p. 505-515, 2013.

PARK, S. Y.; SON, W. M.; KWON, O. S. Effects of whole body vibration training on body composition, skeletal muscle strength, and cardiovascular health. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 11, n. 6, p. 289-295, 2015.

PIOVESAN, R. F.; MARTINS, M. D.; FERNANDES, K. P. S.; BUSSADORID, S. K.; ARAÚJO, H. S. S.; FERRARI, R. A. M. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. **Fisioterapia em Movimento**, v. 22, n. 2, p. 211-220, 2009.

REN, Y. TAN, B.; YAN, P.; YOU, Y.; WU, Y.; WANG, Y. Association between polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 16, p. 1-10, 2015.

ROBERTS, H.; HICHEY, M. Managing the menopause: An update. **Maturitas**, v. 86, p. 53-58, 2016.

SANTORO, N.; EPPERSON, C. N.; MATHEWS, S. B. Menopausal Symptoms and Their Management. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, n. 44, p. 497-515, 2015.

SIPILÄ, S.; FINNI, T.; JOVANEN, V. Estrogen Influences on Neuromuscular Function in Postmenopausal Women. **Calcified Tissue International**, v. 96, p. 222-233, 2015.

TALBOT J.; MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v.5, n.4, p. 518–53, 2016.

VEGAR, Z.; IMTIYAZ, S. Vibration therapy in management of Delayed Onset Muscle Soreness (DOMS). **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 6, p.LE01-LE04, 2014.

WATT, F. Hand osteoarthritis, menopause and menopausal hormone therapy. **Maturitas**, v. 83, p. 13–18, 2016.

ARTIGO CIENTÍFICO 01

**EFEITOS DA VIBRAÇÃO MECÂNICA NAS JUNÇÕES
NEUROMUSCULARES E TIPO DE FIBRA DO MÚSCULO SÓLEO DE
RATAS WISTAR OOFORRECTOMIZADAS**

**REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA
NORMAS DA REVISTA: ANEXO 02**

ARTIGO CIENTÍFICO 01

EFEITOS DA VIBRAÇÃO MECÂNICA NAS JUNÇÕES NEUROMUSCULARES E TIPO DE FIBRA DO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS WISTAR OOFORRECTOMIZADAS

EFEITO DA VIBRAÇÃO MECÂNICA E OOFORRECTOMIA NO MÚSCULO SÓLEO

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Campus Cascavel, Paraná, Brasil

Ana Luiza Peretti¹, Camila Mayumi Martin Kakahata¹, Maria Luiza Serra Dourada Wutze¹, Alana Ludemila de Freitas Tavares², Márcia Miranda Torrejais³, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro³ e Gladson Ricardo Flor Bertolini³

1 Fisioterapeutas formadas pela UNIOESTE e mestrandas em Biociências e Saúde pela mesma instituição, Cascavel, PR - Brasil

2 Acadêmica de Fisioterapia da UNIOESTE, Cascavel, PR - Brasil

3 Professores doutores na UNIOESTE, Cascavel, PR - Brasil

Laboratórios de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos e de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Campus Cascavel.

Autor responsável: Gladson Ricardo Flor Bertolini

Endereço eletrônico: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Endereço para correspondência: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Rua Universitária, 2069 / Clínica de Fisioterapia, JD Universitário

85819110 - Cascavel, PR – Brasil

Telefone: (45) 3220-3157

Conflito de interesse e agências financiadoras

Não há conflitos de interesse. A pesquisa foi realizada com financiamento próprio dos autores e recursos da universidade.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar as junções neuromusculares e o tipo de fibras musculares do sóleo de ratas *Wistar* ooforectomizadas e submetidas a um protocolo de vibração mecânica. Foram utilizadas 36 ratas randomizadas, nos grupos pseudooforectomia sem (GP) e com tratamento (GPT) e ooforectomia sem (GO), além de tratamento (GOT). O tratamento foi realizado com plataforma vibratória, frequência de 60 Hertz e duração de 10 minutos, três vezes por semana, durante quatro semanas. Ao término do período de intervenção, os animais foram eutanasiados e os músculos sóleos coletados e processados para análise das junções neuromusculares e tipo de fibra. Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e análise da variância de três vias, utilizando o teste de acompanhamento de Tukey-HSD, quando necessário, e adotado o nível de significância de 5%. Na análise das junções neuromusculares, o GO apresentou área menor que GP, porém, o GOT igualou-se ao GPT. Para o maior diâmetro das junções, GO também se apresentou diferentes dos demais, todavia, os animais do GOT foram maiores que GPT. Não houve distinção dos tipos de fibras, com o músculo apresentando fibras do tipo oxidativas. Pode-se concluir que a privação hormonal reduziu a área e diâmetro das junções neuromusculares, com reversão desse processo nos grupos que realizaram o tratamento com plataforma vibratória, durante quatro semanas e, ainda, tanto cirurgia quanto tratamento não influenciaram no tipo de fibra do músculo sóleo, composto por fibras oxidativas.

Palavras-chave: privação hormonal; vibração de corpo inteiro; junção neuromuscular; tipo de fibra;

INTRODUÇÃO

A junção neuromuscular (JNM) permite a comunicação entre o sistema nervoso periférico e as fibras musculoesqueléticas, tendo como função transmitir os impulsos elétricos dos neurônios motores às miofibrilas conectadas, as quais são responsáveis pelo desenvolvimento da força contrátil^{1,2}. A JNM é composta pelos compartimentos pré e pós-sinápticos, tendo como componentes o axônio periférico, sua bainha de

mielina e células de Schwann, vesículas e receptores de acetilcolina, a enzima acetilcolinesterase e a membrana basal muscular³.

Em mamíferos, as fibras musculares podem ser divididas em oxidativas (ou tipo I), oxidativas-glicolíticas (ou tipo IIa) e glicolíticas (ou tipo IIb e IIx), classificadas de acordo com a atividade metabólica⁴. As JNMs são dependentes do tipo de fibra muscular e, como no caso do músculo sóleo, as fibras oxidativas são inervadas por motoneurônios de velocidade de condução lenta, capazes de sustentar a tensão por maiores períodos¹.

Uma vez que o tecido muscular é um tecido plástico, o mesmo pode sofrer modificações de características e tamanho como resposta a estímulos^{5,6}. O estrogênio é um hormônio presente em ambos os sexos, no entanto, mais característico no feminino. O sistema musculoesquelético também apresenta receptores de estrogênio e, quando as concentrações do hormônio se encontram fora da homeostase, há efeitos celulares como alteração na transcrição de proteínas, genes e efeitos apoptóticos, que irão afetar, conseqüentemente, a estrutura, desempenho e força muscular⁴.

Outro estímulo, que interfere no tecido muscular, é o exercício físico, capaz de promover modificações tanto no tipo de fibra quanto nas junções neuromusculares, promovendo a conversão do tipo de fibra e aumentando o número de componentes pré e pós-sinápticos, respectivamente^{5,6}. Em suma, o exercício físico é utilizado como tratamento para mulheres no período pós-menopausa, a fim de melhorar a capacidade funcional, coordenação, força muscular e, conseqüentemente, a qualidade de vida^{7,8}.

Uma modalidade de tratamento de alterações no sistema muscular é a utilização de vibrações mecânicas. Para ofertar essas vibrações, são utilizadas plataformas vibratórias que se apresentam como um método de fácil aplicabilidade e menor tempo de duração, quando comparado a outras modalidades de exercício⁹. No tecido muscular, essas vibrações objetivam, após alterações no comprimento músculo-tendíneo, o ganho de força máxima, potência e hipertrofia muscular, ao exigir a contração e manutenção da postura durante a realização do exercício, sendo um método que pode ser eficaz no tratamento de alterações decorrentes da privação hormonal no tecido muscular^{10,11}.

No entanto, há uma escassez de dados na literatura referente aos efeitos da privação hormonal nas junções neuromusculares e tipos de fibras musculares, assim

como das possíveis alterações que a vibração mecânica pode causar nessas estruturas. Ainda, soma-se a busca por informações relevantes para o tratamento de distúrbios provenientes da privação hormonal, processo inerente às mulheres, no sistema muscular. Dessa forma, o presente estudo avaliou as junções neuromusculares e o tipo de fibras musculares do sóleo de ratas *Wistar* ooforectomizadas e submetidas a um protocolo de vibração mecânica, durante quatro semanas.

MATERIAIS E MÉTODO

O presente estudo teve caráter experimental, transversal e quantitativo, desenvolvido no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos e no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel – Paraná.

Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, com o grupo amostral composto por 36 ratas fêmeas da linhagem *Wistar*, nulíparas, com peso médio de 177 ± 15.8 gramas e idade inicial de oito semanas, obtidas do Biotério Central da UNIOESTE e mantidas no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura de $23 \pm 1^{\circ}$ C, com fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*.

Previamente ao início dos procedimentos desse trabalho, as ratas passaram pelo período de aclimação no biotério setorial, durante uma semana. O processo de desenvolvimento do estudo foi realizado a partir da realização da cirurgia de ooforectomia e pseudo-ooforectomia nos animais, seguindo com o tratamento de plataforma vibratória, durante quatro semanas, findando com a eutanásia e coleta do material biológico para análises.

Os animais foram randomizados em quatro grupos (n=9 cada), sendo eles: grupo Pseudo-Ooforectomia (GP), animais submetidos apenas à cirurgia de pseudo-ooforectomia; Pseudo-ooforectomia Tratamento (GPT), submetidos ao tratamento de vibração mecânica; Ooforectomia (GO), cujas ratas passaram pela cirurgia de remoção dos ovários e Ooforectomia Tratamento (GOT), animais submetidos à cirurgia de ooforectomia e tratados com vibração mecânica.

As cirurgias de pseudo-ooforectomia e ooforectomia¹² foram realizadas em todos os animais, na oitava semana de vida dos mesmos. Para tanto, foram devidamente anestesiados, com injeção intraperitoneal de Dopalen® 80 mg/kg e Anasedan® 20 mg/kg (Paulínea, São Paulo, Brasil); para o procedimento cirúrgico, realizou-se a tricotomia e a assepsia, com álcool iodado na região de baixo ventre e, em seguida, foi feita uma incisão cirúrgica longitudinal, com lâmina de bisturi número 11. Após acessar a cavidade peritoneal, foi afastado o tecido adiposo até identificação das tubas uterinas e ovários e, posteriormente, efetivou-se sutura com fio catgut 4.0 simples, na área dos cornos uterinos, promovendo a ressecção dos ovários bilateralmente. Ao final do procedimento, foram feitas suturas internas com fio reabsorvível catgut 4.0 simples e as externas com fio de nylon 4.0.

A pseudo-ooforectomia consistiu na realização de todas as etapas cirúrgicas, semelhantes à ooforectomia, com exceção da remoção dos ovários, sendo que tais animais foram utilizados como grupo de controle. Subsequente à cirurgia, as ratas permaneceram oito semanas sem qualquer intervenção, livres na gaiola para o período de indução dos efeitos da privação hormonal¹².

Para o tratamento com vibração dos animais dos grupos GPT e GOT, foi utilizado o modelo de plataforma Vibro Oscilatória triplanar profissional, da marca Arktus® (Santa Tereza do Oeste, Paraná, Brasil) (Figura 9A). O protocolo utilizado foi adaptado de Butezloff; Zamarioli; Leoni et al.¹³, utilizando uma frequência de 60Hz e vibrações alternadas com uma amplitude de 2 milímetros, durante 10 minutos, três vezes por semana. O tratamento iniciou a partir da 8ª semana pós-operatória, quando os 60 dias de privação hormonal foram completados e teve duração de quatro semanas.

Para a realização do tratamento em plataforma comercial, utilizou-se um suporte desenvolvido pelos pesquisadores, de acordo com as dimensões do aparelho. O uso de um suporte teve como finalidade conter o animal durante o tratamento com a vibração e possibilitar a realização do treinamento com vários animais, de forma simultânea, otimizando-se o tempo¹⁴. Esse suporte, confeccionado com madeira MDF, da cor branca, permitiu posicionar oito animais concomitantemente em baias com 13 centímetros de largura, 19 centímetros de comprimento e altura de 25 centímetros (figura 1B e 1C). Ainda, para minimizar um possível viés sobre pontos distintos de aceleração e amplitude sobre a plataforma vibratória¹⁵, foi elaborado um

rodízio entre as baias, fazendo com que os animais alternassem o local em que foram alojados durante o treino ao longo dos dias.

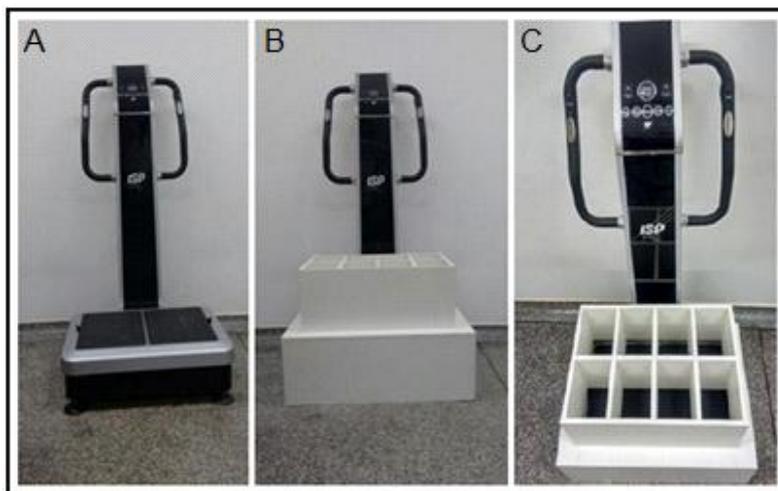


Figura 1: Fotografias da plataforma vibratória utilizada (A) e suporte desenvolvido em uma vista frontal (B) e superior (C).

Após o período de tratamento, os animais foram devidamente anestesiados, via intraperitoneal, e eutanasiados por overdose de anestésico, ao final da 12^a semana pós-operatória, após intervenção ou não com a plataforma vibratória. Os músculos sóleos direitos e esquerdos foram dissecados, limpos, pesados e seccionados em fragmentos, com uma lâmina de inox para posterior realização das análises.

Para o estudo das JNMs, foram utilizados os fragmentos distais dos antímeros direitos, removidos e imersos no fixador Karnovsky¹⁶, em temperatura ambiente. Os músculos foram cortados longitudinalmente em quatro ou cinco porções com lâminas de inox e os cortes obtidos foram submetidos à reação Esterase Inespecífica¹⁷. Na análise morfométrica das JNMs, foram mensuradas a área e maior diâmetro de 150 JNMs por animal estudado, obtidas a partir de imagens microscópicas no aumento de 200 vezes.

O fragmento distal do antímero esquerdo foi coletado e mantido em temperatura ambiente durante 40 minutos¹⁸. Após esse período, para a preservação do tecido, o material foi coberto com talco neutro, de acordo com a técnica de Moline e Glenner¹⁹, congelado em nitrogênio líquido, durante dois minutos, acondicionados em criotubos e armazenado em Biofreezer a -80 °C, para análise histoenzimológica. Os segmentos musculares congelados foram transferidos para câmara de criostato

(LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome), a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidos durante 30 minutos. Em seguida, os segmentos tiveram a extremidade colada a um suporte metálico, utilizando-se Tissue Freezing Medium (Leica - Jung - Germany), e foram seccionados transversalmente a $7\text{ }\mu\text{m}$ de espessura. Para análise do metabolismo oxidativo e glicolítico das fibras musculares, as secções transversais foram submetidas à reação NADH-TR (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazolium Reductase), conforme técnica de Pearse²⁰, modificada por Dubowitz e Brooke²¹. Essa análise busca quantificar e mensurar em porcentagem os diferentes tipos de fibras musculares (I, IIa e IIb), de acordo com a tonalidade apresentada nas fibras após a reação enzimática. Para cada animal, foram escolhidos três campos microscópicos, aleatoriamente, no aumento de 200 vezes.

A análise dos dados foi realizada por meio da estatística descritiva, avaliação da normalidade dos resíduos pelo teste de *Shapiro-Wilk*, com posterior análise da variância de três vias. Em caso de significância estatística ($p < 0.05$), foi realizado o teste Tukey-HSD, com auxílio do pacote ExpDes.pt do programa R (R Core Team, 2017).

RESULTADOS

Junções neuromusculares

Quanto à área das JNMs, houve interação significativa entre ooforectomia e tratamento ($F = 4.99$, $p = 0.03$). Houve diferença entre GP e GO, demonstrando que a cirurgia de ooforectomia exerce efeitos, tal como esperado, com diminuição dos valores da área das JNMs ($F = 15.07$, $p < 0.001$). Já o tratamento com plataforma normalizou esses valores, uma vez que GOT e GPT possuem médias equivalentes ($F = 0.52$, $p = 0.4$), também comprovado pela diferença entre GO e GOT ($F = 5.44$, $p = 0.02$).

Para o maior diâmetro das JNMs, também houve interação significativa entre ooforectomia e tratamento ($F = 27.05$, $p < 0.001$). O grupo GO é diferente de GP ($F = 26.6$, $p < 0.001$) e GPT ($F = 7.06$, $p = 0.01$), significando que a privação hormonal também influencia no diâmetro das junções. Os grupos GO e GOT apresentaram diferença ($F = 22.09$, $p < 0.001$), sendo GOT maior que GO. Além disso, nessa variável, os valores de GOT foram maiores que os de GPT ($F = 26.6$, $p < 0.001$), reforçando um possível efeito da plataforma vibratória no diâmetro (tabela 1). Essas alterações

morfométricas também são visualizadas na figura 2, representando a morfologia dessas JNMs.

Tabela 1: Área e maior diâmetro dos receptores das junções neuromusculares do músculo sóleo de ratas *Wistar*.

		Área	Maior diâmetro
GRUPOS	GP	5.80±0.2 ^a	4.25±0.1 ^b
	GPT	5.65±0.4 ^a	4.03±0.17 ^b
	GO	5.2±0.40 ^b	3.82±0.25 ^c
	GOT	5.54±0.2 ^a	5.54±0.13 ^a

Legenda: GP: grupo pseudo-ooforectomia; GPT: grupo pseudo-ooforectomia tratado; GO: grupo ooforectomia; GOT: grupo ooforectomia tratado. Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes representaram diferença estatisticamente significativa.

A figura 2 ilustra as JNMs nos grupos utilizados neste trabalho, com as mesmas possuindo formas elípticas e ovais. Morfologicamente, é possível verificar a diminuição da área e conseqüente menor diâmetro das JNMs do grupo GO (figura 2C), comprovado também pela morfometria (tabela 1).

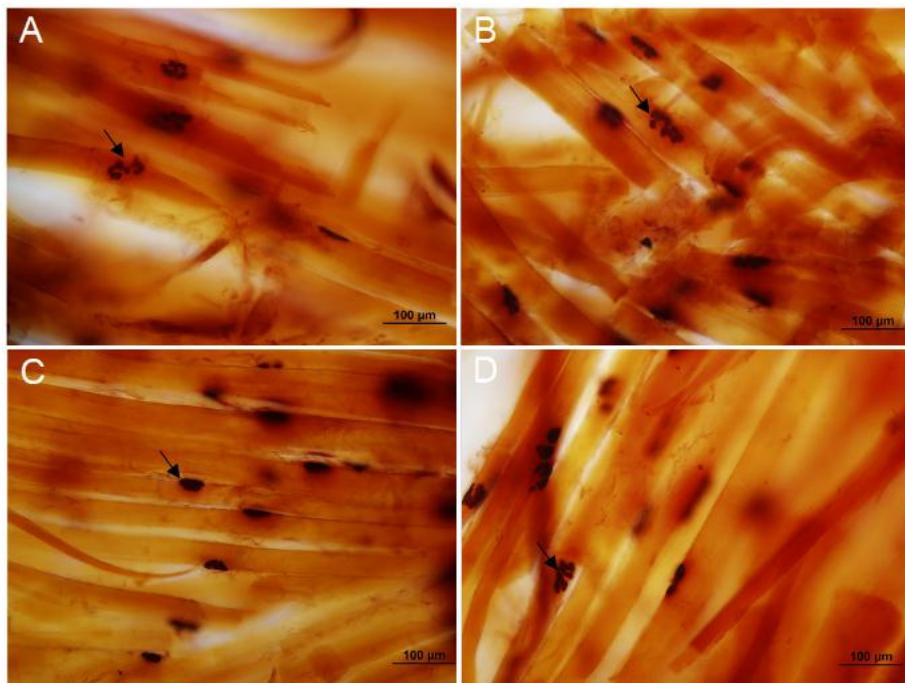


Figura 2: Fotomicrografias dos receptores de junções neuromusculares do músculo sóleo de ratas *Wistar* após Reação de Esterase Inespecífica. Em **A**, Grupo Pseudo-ooforectomia (GP); **B**, Grupo Pseudo-ooforectomia tratado (GPT); **C**, Grupo Ooforectomia (GO) com diminuição da área e diâmetro das junções neuromusculares quando comparado morfologicamente com os demais grupos; **D**, Grupo Ooforectomia tratamento (GOT). Ponta de seta representa os receptores das junções neuromusculares marcados com a técnica.

Tipo de fibras musculares

Analisando os músculos sóleos após a técnica NADH-TR (figura 3), foi evidenciado que não houve diferenciação das fibras musculares oxidativas (I), intermediárias (IIa) e glicolíticas (IIb), uma vez que não houve alternância entre a intensidade das colorações características da técnica.

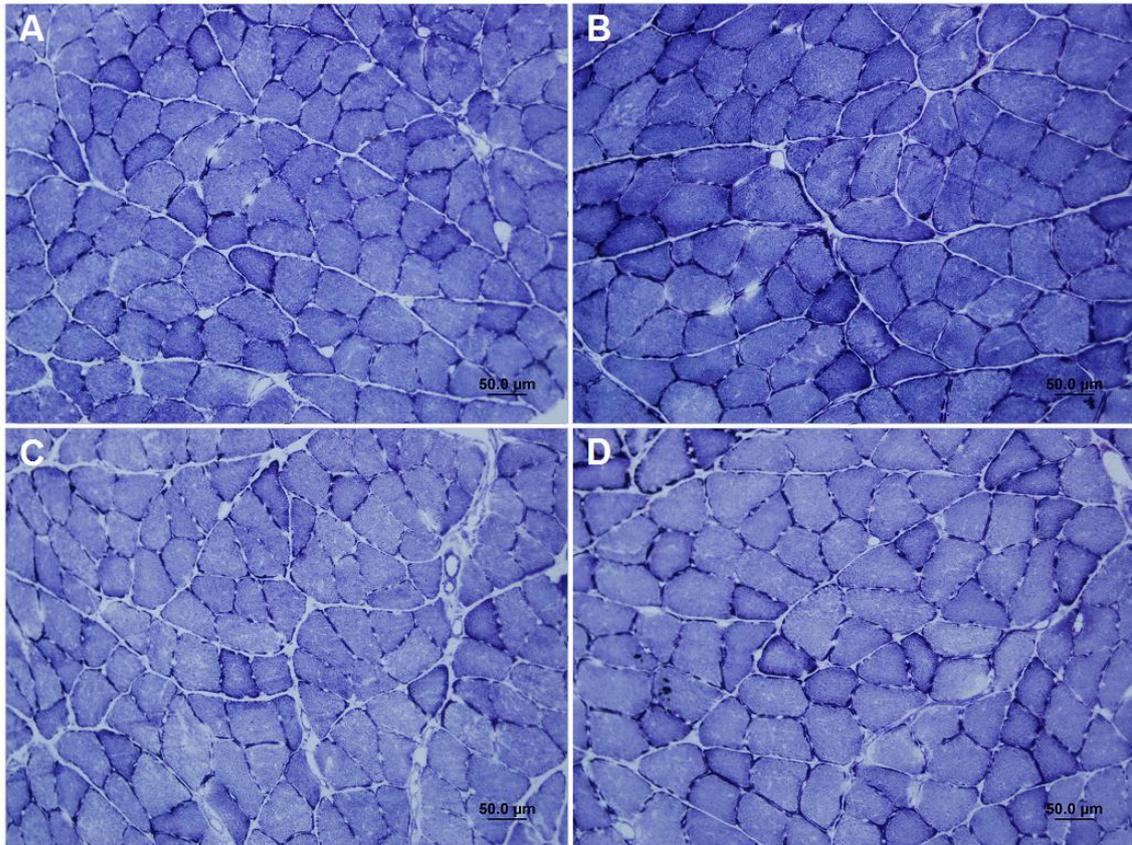


Figura 3: Fotomicrografias do músculo sóleo de ratas Wistar, corte transversal, reação enzimática NADH. Em **A**, Grupo Pseudo-ooforectomia (GP); **B** Grupo Pseudo-ooforectomia tratado (GPT); **C** grupo Ooforectomia (GO) e **D**, grupo Ooforectomia tratado (GOT). Não houve diferenciação entre a coloração das fibras musculares nesta técnica, com as fibras apresentando-se em sua totalidade como fibras do tipo I.

DISCUSSÃO

Como resultado, foi possível observar que a cirurgia de ooforectomia e o tratamento com a plataforma vibratória foram capazes de influenciar apenas a morfometria e morfologia das junções neuromusculares, não afetando o tipo de fibra muscular do sóleo das ratas. Em relação à análise das junções neuromusculares, foi possível observar que o efeito da privação hormonal, obtido pela cirurgia de ooforectomia, exerceu influência sobre essas estruturas, com diminuição dos valores, tanto de área quanto diâmetro. Embora não haja estudos que avaliem especificamente

as junções neuromusculares na privação hormonal, a presença de receptores sensíveis ao estrogênio nos tecidos relacionados⁴ pode justificar alterações observadas nesse modelo experimental.

Ainda não há consenso sobre efeitos patológicos do estrogênio no tecido nervoso e existe uma hipótese de que ele possa exercer influência, atuando no processamento sensorial e na modulação da transmissão nociceptiva²². Contudo, não se pode afirmar que as alterações, encontradas nas JNMs nesse trabalho, são decorrentes do tecido nervoso, uma vez que as mesmas podem ser afetadas fisiopatologicamente, tanto por entrada pré quanto pós-sináptica²³⁻²⁵. Dessa forma, a própria degeneração da JNM pode ter sido desencadeada pela perturbação no metabolismo muscular, seguida de alterações nas unidades motoras^{26,27}.

O déficit de estrogênio, causado experimentalmente pela cirurgia de ooforectomia, pode estar relacionado com algumas perturbações no metabolismo muscular, que culminam no aumento de marcadores inflamatórios e alteração no metabolismo mitocondrial²⁸, podendo levar a uma sensibilização e perda de unidades motoras, diminuição da massa e atrofia muscular²⁹, pela degeneração das JNMs^{26,27}, corroborando com os achados desse estudo.

Deschenes et al.² investigaram os efeitos do gênero e da diminuição da descarga de peso, após duas semanas de elevação do membro posterior. Como resultado, concluíram que as JNMs não diferiram entre os sexos masculino e feminino, nos grupos controle, com condições fisiológicas padrão, e o período de duas semanas de intervenção não influenciou a morfometria e morfologia das JNMs, nos músculos sóleo, extensor longo dos dedos e plantar, sendo a transmissão sináptica equivalente nos dois sexos em condições normais. De forma contrária, em nosso estudo, as JNMs foram afetadas no grupo que sofreu privação hormonal. Assim, é possível assumir que as alterações são dependentes do tempo em que o estímulo é mantido, uma vez que, em um trabalho anterior do mesmo grupo de pesquisa, Deschenes et al.³⁰ verificaram que quatro semanas de diminuição da descarga foi capaz de ocasionar mudanças nas JNMs.

Também não existem dados na literatura do comportamento das JNMs, frente à vibração mecânica. Entretanto, com esse estudo, foi possível verificar que o tratamento com a plataforma vibratória foi eficaz na reversão dos efeitos deletérios da privação hormonal, uma vez que o GOT se apresentou semelhante aos grupos

pseudo-ooforectomia, na variável área e até maior que os mesmos em relação ao diâmetro. Tanto a diminuição quanto o aumento da atividade física são capazes de ocasionar mudanças nas JNMs, influenciando a área e o comprimento dos ramos e, conseqüentemente, a relação pré e pós-sináptica, havendo uma hipertrofia das JNMs compensatória ao exercício¹. O treinamento de resistência, realizado por Deschenes et al.²⁵, com seis semanas de esteira, foi capaz de promover a remodelação das JNMs do músculo plantar, mas não do extensor longo dos dedos, ou seja, houve efeitos no músculo mais recrutado durante o exercício executado, sugerindo que os resultados também são dependentes do recrutamento muscular utilizado.

De acordo com Nishimune, Stanford e Mori²³, o músculo sóleo é muito utilizado em estudos para verificar as adaptações das JNMs, perante o exercício físico, devido à homogeneidade na composição do tipo de fibra muscular e à função antigraavitacionária, com os resultados dependentes do tipo, intensidade e finalidade do exercício com o tipo de músculo. Seene, Umnova e Kaaski¹ buscaram avaliar as diferenças entre as JNMs de fibras oxidativas e glicolíticas, bem como o comportamento das mesmas durante o exercício físico. Nas fibras glicolíticas, os terminais e fibras axônicas são elípticas e maiores que os de fibras lentas, ocupando uma maior área no sarcoplasma. Já nas fibras oxidativas, mais presentes no músculo sóleo, os terminais axônicos são curtos, redondos e morfologicamente semelhantes, com também maior número de mitocôndrias. Os dois tipos de fibras são afetados com o treinamento, todavia, para esse estudo de seis semanas de caminhada em esteira, houve maior remodelação das JNMs nas fibras oxidativas, provavelmente, devido à modalidade do exercício escolhido exigir mais dessas fibras.

Ainda, esses mesmos autores^{1,23} também utilizaram as técnicas de imunofluorescência e citofluorescência, verificando que o exercício físico proporcionou acréscimo no número de vesículas nos terminais axônicos, isso atribuído à ressíntese de acetilcolina após a sinapse, proporcionando a remodelação das junções. Apesar da modalidade de exercício ter sido outra, os efeitos benéficos do tratamento com a plataforma vibratória também podem basear-se nessa hipótese da literatura, entretanto, são necessárias metodologias mais específicas para confirmação.

De acordo com Haizlip, Harrison e Leinwand⁴, há uma prevalência de fibras oxidativas no sexo feminino, quando comparado ao masculino. Essa característica

promove maior desempenho, resistência e melhor recuperação em resposta ao exercício e fadiga muscular. Embora apenas fêmeas tenham sido avaliadas em nosso estudo, a informação citada reforça os resultados do tratamento. Ainda que o presente artigo tenha sido realizado com modalidades diferentes de exercício, o protocolo de exercício com a vibração mecânica utilizada exigia a manutenção da postura dos animais durante exposição à vibração mecânica e, conseqüentemente, esse padrão de recrutamento pode explicar os resultados positivos encontrados.

Diante do exposto, é visto que o exercício físico possui demasiada importância na manutenção da funcionalidade física das JNMs. Outra possível explicação da adaptação das JNMs, frente ao tratamento com a plataforma vibratória, pode ser pelo fato da contração muscular, exigida pelo exercício interferir na regulação e expressão proteica de moléculas e fatores de crescimento, como o fator neurotrófico, derivado de células da glia (GDNF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e interleucinas, como a IL1-Ra, IL-10 e até mesmo a IL-6, levando à adaptação, melhora da transmissão e hipertrofia das JNMs^{3,23,31}.

Em relação ao tipo de fibra, o músculo sóleo é composto principalmente por fibras do tipo I, em todos os grupos, tendo esse tipo de fibra maior capacidade de respiração mitocondrial³, com a técnica de NADH-TR, sendo utilizada para determinar o funcionamento oxidativo das mitocôndrias, por meio da coloração, após a reação enzimática³². A cirurgia de ooforectomia também não afetou as porcentagens de cada tipo de fibra no músculo sóleo de camundongos, no trabalho de Moran et al.³³, porém, com análise imunohistoquímica, foram encontrados os diferentes tipos de fibras. Haizlip; Harrison e Leinwand⁴ também concluíram que, em modelos de ooforectomia, não houve alterações no tipo de fibra e somente mudanças no tamanho e diâmetro muscular. Embora em menor número, essa diferenciação poderia ter sido encontrada utilizando técnicas mais específicas, como por exemplo, imunofluorescência e atividade da ATPase.

Assim como a cirurgia de ooforectomia, o tratamento com a plataforma vibratória não alterou o tipo de fibra muscular com a análise utilizada, embora a literatura aponte que o exercício físico também é capaz de promover alterações no tipo de fibra¹. Camargo Filho et al.³⁴ analisaram a resposta do músculo sóleo frente ao exercício de esteira e exposição ao cigarro. Foram observados diferentes níveis de atividade enzimática das fibras, entretanto, assim como neste estudo, a reação de

NADH-TH identificou, em sua maioria, fibras oxidativas. No trabalho de Deschene et al.², avaliando também o músculo sóleo, não houve mudanças no tipo de fibra, uma vez que, mais de 95% das fibras musculares desse músculo, para ambos os sexos, eram compostas por fibras do tipo I. A pequena porcentagem de fibras do tipo II do sóleo não apresentou efeitos significativos para o sexo e tratamento.

Músculos posturais profundos podem expressar um maior número de fibras com fenótipo oxidativo (fibras I e IIa), diferentemente de músculos mais superficiais, como o gastrocnêmio (fibras IIx e IIb)⁴. No presente trabalho, utilizou-se o músculo sóleo e atribui-se às características dele ser o principal músculo postural e oxidativo no rato³, dessa forma, não foram encontrados diferentes tipos de fibra.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, foi possível concluir que a área e diâmetro das junções neuromusculares foram afetadas, tanto pela cirurgia de ooforectomia quanto pelo tratamento com a plataforma vibratória, sendo capaz de reverter alterações morfométricas e morfológicas. Ainda, conclui-se que o músculo sóleo de ratas *Wistar* é predominantemente composto por fibras oxidativas que não foram alteradas com o modelo experimental de privação hormonal e tratamento com vibração mecânica.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, ao Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela possibilidade de realização do estudo, aos recursos financeiros da Fundação Araucária (edital 09/2016 - Pesquisa Básica e Aplicada) e ao CNPq pela concessão de bolsa para auxílio da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Seene T, Umnova M, Kaasik P. Morphological peculiarities of neuromuscular junctions among different fiber types: effect of exercise. *European Journal of Translational Myology* 2017; 27(3):139-146.
2. Deschenes MR, Adan MA, Kapral MC, Kressin KA, Leathrum CM, Seo A, Li S, Schaffrey EC. Neuromuscular adaptability of male and female rats to muscle unloading. *Journal of Neuroscience Research* 2017; 1:1-13.

3. Krause Neto WK, Ciena AP, Anaruma CA, Souza RR. Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: systematic review of animal experimental studies. *BMC Research Notes* 2015; 8.
4. Haizlip KM, Harrison BC, Leinwand LA. Sex-based differences in skeletal muscle kinetics and fiber-type composition. *Physiology* 2015; 30:30-39.
5. Baehr LM, West DWD, Marcotte G, Marshall AG, Sousa LGS, Baar K, Bodine SC. Age-related deficits in skeletal muscle recovery following disuse are associated with neuromuscular junction instability and ER stress, not impaired protein synthesis. *Aging* 2016; 8(1):127-146.
6. Pour AB, Joukar S, Hovanloo F, Najafipour H. Long-term low-intensity endurance exercise along with blood-flow restriction improves muscle mass and neuromuscular junction compartments in old rats. *Iranian Journal of Medical Sciences* 2017; 42(6):569-576.
7. Radominski SC, Bernardo W, Paulac AP, Albergariad B, Moreira C, Fernandes CE et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Reumatol* 2017; 57(S2):S452-S466.
8. Caputo EL, Costa MZ. Influência do exercício físico na qualidade de vida de mulheres pós-menopáusicas com osteoporose. *Rev Bras Reumatol* 2014; 54(6):467-473.
9. Anwer S, Alghadir A, Zazar H, Al-eisa E. Effect of whole body vibration training on quadriceps muscle strength in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Physiotherapy* 2016; 102:145–151.
10. Park SY, Son WM, Kwon OS. Effects of whole body vibration training on body composition, skeletal muscle strength, and cardiovascular health. *Journal of Exercise Rehabilitation* 2015; 11(6): 289-295.
11. Cerciello S, Rossi S, Visonà E, Corona K, Oliva F. Clinical applications of vibration therapy in orthopaedic practice. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2016; 6(1):147-156.
12. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52(3):466-470.
13. Butezloff MM, Zamarioll A, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Volpon JB. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2015; 30(11):727-735.
14. Brouwers, J. E. M.; Rietbergen, B. V.; Ito, K.; Huiskes, R. Effects of vibration treatment on tibial bone of ovariectomized rats analyzed by in vivo micro-CT. *Journal of Orthopaedic Research* 2010; 28:62-69.
15. Alizadeh-Meghrazi M, Zariffa K, Masana K, Popovic MR, Craven BC. Variability

of vibrations produced by commercial whole-body vibration platforms. *Journal of Rehabilitation Medicine* 2014; 46:937-940.

16. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 1965; 27: 1A-149A.

17. Lehrer GM, Ornstein L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *Biophysical and Biochemical Cytology* 1959; 6:399-419.

18. Khan MA. The histoenzymology of striated muscle fibers an overview. *Molecular Biology of the Cell* 1977; 22:383-393.

19. Moline SW, Glenner GG. Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen. *Journal of Histochemistry e Cytochemistry* 1964; 12:777-778.

20. Pearse AGE. *Histochemistry: theoretical and applied*. 3. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1972.

21. Dubowitz V, Brooke M. *Muscle biopsy: a modern approach*. London: Saunders, 1973.

22. Amandusson A, Blomqvist A. Estrogenic influences in pain processing. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2013; 34:329-349.

23. Nischimune H, Stanford JA, Mori Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. *Muscle and Nerve* 2014; 49(3):315-24.

24. Rudolf R, Khan MM, Labeit S, Deschenes MR. Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2015; 6.

25. Deschenes, M. R.; Kressin, K. A.; Garrat, R. N.; Leathrum, C. M.; Shaffrey, E. C. Effects of exercise training on neuromuscular junction morphology and pre to post synaptic coupling in young and aged rats. *Neuroscience* 2016; 1(316):167-177.

26. Messier V, Rabasa-Lhoret R, Barbat-Artigas S, Elisha B, Karelis AD, Aubertin-Leheudre M. Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. *Maturitas* 2011; 68:331-336.

27. Sipilä S, Finni T, Jovanen V. Estrogen Influences on Neuromuscular Function in Postmenopausal Women. *Calcified Tissue International* 2015; 96:222-233.

28. Gonzales-Freire M, Cabo R, Studenski SA, Ferrucci L. The neuromuscular junction: aging at the crossroad between nerves and muscle. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2014; 6.

29. Carson JA, Manolagas SC. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone* 2015; 80:67-68.

30. Deschenes, M.R.; Wilson, M. H. Age-related differences in synaptic plasticity

following muscle unloading. *Journal of Neurobiology* 2003; 57:246–256.

31. Terra R, Silva SAG, Pinto VS, Sutra PML. Effect of exercise on the immune system: response, adaptation and cell signaling. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 2012; 18:208-214.

32. Braggion GF, Ornelas E, Cury JCS, Lima NEA, Aquino RC, Fonseca FL, Maifrino LBM. Morphological and biochemical effects on the skeletal muscle of ovariectomized old female rats submitted to the intake of diets with vegetable or animal protein and resistance training. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016.

33. Moran AL, Nelson SA, Landisch RM, Warren GL, Lowe DA. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *Journal of Applied Physiology* 2007; 102(4):1387-1393.

34. Camargo Filho JCS, Garcia BC, Kodama FY, Bonfim MR, Vanderlei LCM, Ramos EMC et al. Efeitos do exercício aeróbio no músculo esquelético de ratos expostos à fumaça de cigarro. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 2011; 17(6):416-419.

ARTIGO CIENTÍFICO 02

**AÇÃO DA VIBRAÇÃO MECÂNICA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS
WISTAR OOFORRECTOMIZADAS: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA
E DO ESTRESSE OXIDATIVO**

**SCANDINAVIAN JOURNAL OF MEDICINE & SCIENCE SPORTS
NORMAS DA REVISTA: ANEXO 03**

ARTIGO CIENTÍFICO 02

AÇÃO DA VIBRAÇÃO MECÂNICA NO MÚSCULO SÓLEO DE RATAS WISTAR OOFORECTOMIZADAS: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E DO ESTRESSE OXIDATIVO

VIBRAÇÃO MECÂNICA EM MODELO DE OOFORECTOMIA

Ana Luiza Peretti¹, Camila Mayumi Martin Kakihata¹, Alana Ludemila de Freitas Tavares¹, Maria Luiza Serra Dourada Wutze¹, Camila Maria Toigo de Oliveira¹, Ana Tereza Bittencourt Guimarães¹, Rose Meire Costa Brancalhão¹, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro¹ e Gladson Ricardo Flor Bertolini¹

¹ Laboratórios de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos e de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Campus Cascavel.

Autor responsável: Gladson Ricardo Flor Bertolini

Endereço eletrônico: gladson_ricardo@yahoo.com.br

Endereço para correspondência: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Rua Universitária, 2069 / Clínica de Fisioterapia, JD Universitário

85819110 - Cascavel, PR – Brasil

Telefone: (45) 3220-3157

RESUMO

Objetivou-se analisar os efeitos da vibração mecânica na histomorfometria e estresse oxidativo de ratas ooforectomizadas. Setenta e duas ratas *Wistar* foram randomizadas nos grupos Pseudooforectomia (GP) e Ooforectomia (GO) e subdivididas (n=9) em animais sem tratamento e eutanasiados após quatro (GP4 e GO4) e oito (GP8 e GO8) semanas e animais tratados durante quatro (GPT4 e GOT4) e oito (GPT8 e GOT8) semanas. O tratamento consistiu no uso de plataforma vibratória, frequência de 60 hertz durante 10 minutos, três vezes por semana. Após a eutanásia, o músculo sóleo foi coletado. Os dados foram analisados quanto à normalidade e análise da variância de três vias e nível de significância de 5%. Morfologicamente, os grupos ooforectomizados apresentaram hipotrofia muscular e o tratamento nestes animais denotou hipertrofia muscular. Em relação à área de secção transversa, GPT4 apresentou valores maiores que GP4 e GPT8 enquanto que GO8 foi menor que GO4, GP8 e GOT8; para os diâmetros das fibras, os animais ooforectomizados possuíam valores menores que os pseudo-ooforectomizados e os tratamentos valores maiores que os que não tiveram tratamento. Para a relação núcleos/fibra, GP4 e GO4 possuíam médias maiores em relação à GPT4 e GOT4. Não houve diferença na relação capilares/fibra e tecido conjuntivo. No estresse oxidativo, GO8 e GOT8 apresentaram maior lipoperioxidação, sem alterações para as atividades da superóxido dismutase, catalase e colinesterase. Conclui-se que a privação hormonal provocou hipotrofia muscular nos animais ooforectomizados de oito semanas, com reversão deste processo e hipertrofia muscular nos grupos que realizaram o tratamento com plataforma vibratória.

Palavras-chave: privação hormonal; plataforma vibratória; musculoesquelético.

INTRODUÇÃO

A menopausa inicia entre os 45 e 55 anos de idade na vida da mulher, ocorrendo de maneira gradual e marcando o declínio da fertilidade e produção dos hormônios sexuais femininos. Além de outros hormônios, há um declínio na síntese do estrogênio, hormônio lipofílico que atua tanto no sistema reprodutor feminino quanto em outros tecidos. Em menores concentrações, ele é associado a efeitos

nocivos cardiovasculares, vasomotores e no sistema musculoesquelético, tanto no tecido ósseo quanto muscular^{1,2}. As principais mudanças que a privação hormonal provoca no sistema muscular são a diminuição da massa e força muscular, pois o estrogênio atua nos receptores (alfa e beta) presentes nas fibras musculares e, com declínio da expressão do hormônio, afeta a atividade de células satélites, fatores de regulação miogênica, níveis de proteínas e função mitocondrial^{3,4}.

Com o déficit na produção hormonal, a menopausa é acompanhada por aumento no estresse oxidativo tecidual⁵. Os radicais livres são mediadores nas transferências de elétrons em várias reações químicas de funções biológicas e, em excesso, essas espécies reativas de oxigênio (EROS) podem levar a danos oxidativos. Todavia, existem defesas antioxidantes no organismo para limitar e controlar suas ações e o estresse oxidativo ocorre quando há falha entre os compostos oxidantes e antioxidantes, devido ao excesso na geração de EROS ou diminuição na remoção dos mesmos, levando ao desequilíbrio homeostático e potencial lesivo^{6,7}.

Buscando prevenir ou tratar as alterações no tecido muscular advindas da privação hormonal, estratégias terapêuticas são utilizadas como o uso de exercícios³. Para a realização do exercício físico, é necessária a contração muscular que, associada a uma frequência de realização, se torna estímulo para adaptações funcionais e remodelação⁸. Em virtude de algumas modalidades de exercício serem contraindicadas para indivíduos que já apresentem limitações funcionais, são necessárias medidas que busquem prevenir novas perdas ou tratar disfunções⁹. Para tal, a plataforma vibratória pode ser indicada para disfunções do tecido muscular¹⁰.

Por meio de vibrações mecânicas, as plataformas vibratórias têm sido citadas para promover o ganho de força após ativação dos fusos musculares, exigindo a contração muscular e adaptações do corpo para manter o posicionamento durante a terapia^{10,11}. Entretanto, ainda não há um consenso na literatura sobre os efeitos e parâmetros deste tipo de tratamento. Desta forma, objetivou-se analisar e comparar os efeitos do tratamento com plataforma vibratória, aplicada durante quatro e oito semanas, na histomorfometria e estresse oxidativo do tecido muscular de ratas *Wistar* ooforectomizadas.

MATERIAIS E MÉTODO

O presente estudo teve caráter experimental, transversal e quantitativo, desenvolvido após aprovação no Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, sendo conduzido segundo as normas internacionais de ética em experimentação animal.

Foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2. O grupo amostral foi composto por 72 ratas fêmeas da linhagem *Wistar*, nulíparas, com peso médio de 177 ± 15.8 gramas e idade inicial de oito semanas, mantidas em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*.

O cálculo amostral foi realizado no programa GPower 3.1.9.2, assumindo para o cálculo a família de testes de distribuição F, com tamanho de efeito de 0.4 (efeito grande), erro tipo 1 de 0.05 e poder de 0.92, o que gerou uma amostra de 72 observações.

Previamente ao início dos procedimentos desse trabalho, as ratas passaram pelo período de aclimação no biotério setorial, durante uma semana. O processo de desenvolvimento desse estudo foi realizado a partir da realização da cirurgia de ooforectomia e pseudo-ooforectomia nos animais, seguindo com o tratamento de plataforma vibratória, durante quatro e oito semanas, findando com a eutanásia e coleta do material biológico para análises. Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos pseudo-ooforectomia (GP) e ooforectomia (GO), ambos com 36 animais cada. Esses dois grupos ainda foram divididos em dois subgrupos (figura 1).

- GP (n=36): animais pseudo-ooforectomizados e subdivididos:
 - GP4 (n=9): eutanasiados em quatro semanas.
 - GP8 (n=9): eutanasiados em oito semanas.
 - GPT4 (n=9): tratamento com plataforma vibratória durante quatro semanas.
 - GPT8 (n=9): tratamento com plataforma vibratória durante oito semanas.

- GO (n=36) – submetidos à ooforectomia e subdivididos:
 - GO4 (n=9): eutanasiados em quatro semanas.
 - GO8 (n=9): eutanasiados em oito semanas.

- GOT4 (n=9): tratamento com plataforma vibratória durante quatro semanas.
- GOT8 (n=9): tratamento com plataforma vibratória durante oito semanas.

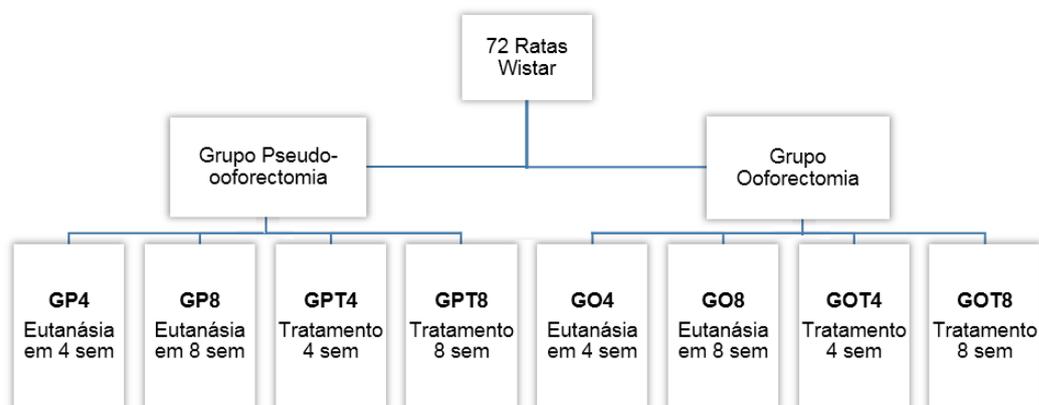


Figura 1: Esquema de distribuição dos grupos experimentais. Legenda: GP – Grupo Pseudooforectomia; GO – Grupo Ooforectomia; letra “T” refere-se ao tratamento com plataforma vibratória e os números “4” e “8” ao tempo de intervenção, em semanas.

Protocolo de Ooforectomia e Pseudo-ooforectomia

Para a realização da cirurgia e eutanásia, as ratas foram pesadas e submetidas à anestesia com injeção intraperitoneal de Dopalen® 80 mg/kg e Anasedan® 20 mg/kg (Paulínia, São Paulo, Brasil).

Os procedimentos de ooforectomia e pseudo-ooforectomia foram realizados na 8ª semana de vida dos animais. Após anestesia, realizou-se a tricotomia e a assepsia com álcool iodado na região de baixo ventre e, em seguida, foi feita a incisão cirúrgica longitudinal, com lâmina de bisturi número 11. Após acessar a cavidade peritoneal, foi afastado o tecido adiposo até identificação das tubas uterinas e ovários. Posteriormente, foi realizada sutura com fio catgut 4.0 simples, na área dos cornos uterinos, promovendo a ressecção dos ovários bilateralmente. Ao final do procedimento, foram feitas suturas internas com fio reabsorvível catgut 4.0 simples e as externas, com fio de nylon 4.0¹².

A pseudo-ooforectomia consistiu na realização de todas as etapas cirúrgicas semelhantes à ooforectomia, com exceção da remoção dos ovários. Subsequente à cirurgia, as ratas permaneceram oito semanas, livres na gaiola sem qualquer intervenção para o período de indução dos efeitos do déficit hormonal.

Tratamento com plataforma vibratória

Previamente ao início do trabalho, foi realizado um projeto piloto para verificação do comportamento dos animais sobre a plataforma vibratória, a fim de

identificar possíveis vieses da pesquisa, sendo possível adequar a plataforma vibratória com a confecção de um suporte e parâmetros de uso.

Para o tratamento com vibração, foi utilizado o modelo de plataforma Vibro Oscilatória triplanar profissional da marca Arktus® (Santa Tereza do Oeste, Paraná, Brasil). O protocolo considerado foi adaptado de Butezloff et al.¹³, utilizando uma frequência de 60 Hertz (Hz) e vibrações alternadas, com uma amplitude de 2 milímetros, durante 10 minutos, três vezes por semana. O tratamento iniciou a partir da 8ª semana pós-operatória, quando o período de indução da privação hormonal foi completado e teve duração de quatro semanas para o GPT4 e GOT4 e oito semanas para o GPT8 e GOT8.

Para a realização do tratamento, utilizou-se um suporte, desenvolvido pelos pesquisadores, de acordo com as dimensões da plataforma vibratória. O suporte teve a finalidade de conter o animal durante o tratamento e possibilitar a realização do treinamento com vários animais de forma simultânea, otimizando-se o tempo¹⁴. Esse suporte permitiu posicionar oito animais concomitantemente em baias. Buscando minimizar um possível viés sobre pontos distintos de aceleração e amplitude sobre a plataforma vibratória¹⁵, foi elaborado um rodízio entre as baias, fazendo com que os animais alternassem o local em que foram alojados durante os treinos.

Eutanásia dos animais e análises

Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico, sendo os grupos GP4, GPT4, GO4 e GOT4 eutanasiados ao final da 12ª semana pós-operatória, após quatro semanas ou não de intervenção com a plataforma vibratória, e os animais dos grupos GP8, GPT8, GO8 e GOT8 eutanasiados ao final da 16ª semana pós-operatória, após oito semanas com ou sem tratamento.

Os músculos sóleos direito e esquerdo foram dissecados, limpos, pesados e seccionados em fragmentos, com uma lâmina de inox, para posterior realização das análises. O fragmento proximal direito foi utilizado para processamento histológico; para o antímero esquerdo, o fragmento proximal foi congelado para corte em criostato e o distal congelado para análise do estresse oxidativo do tecido.

O fragmento distal do antímero esquerdo foi coletado e mantido em temperatura ambiente durante 40 minutos. Após esse período, para a preservação do

tecido, o material foi coberto com talco neutro, congelado em nitrogênio líquido, durante dois minutos, acondicionados em criotubos e armazenado em Biofreezer, a -80°C, para análises histológicas e histoenzimológica.

Os segmentos musculares congelados foram transferidos para câmara de criostato (LUPETEC CM 2850 Cryostat Microtome), a -30°C, e mantidos durante 30 minutos. Em seguida, os segmentos tiveram a extremidade colada a um suporte metálico, utilizando-se Tissue Freezing Medium (Leica - Jung - Germany) e foram seccionados transversalmente a 7 μm de espessura. Os cortes obtidos foram submetidos a métodos de colorações e reações para o estudo das fibras musculares.

As secções transversas foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e fotomicrografados os campos de interesse no aumento de 400 vezes. Foi realizada a análise morfológica geral do tecido e, em seguida, as fibras musculares foram analisadas quanto à área de secção transversa, maior e o menor diâmetro da fibra muscular em 100 fibras por músculo, pelo programa Image-Pro-Plus 6.0.

Com a mesma coloração e aumento, foram mensuradas as relações núcleos e capilares/fibra. Os núcleos celulares e capilares sanguíneos foram morfológicamente identificados, marcados e contabilizados. Essa análise abrangeu a razão do número de capilares e núcleos pelo número de fibras musculares, determinada a partir de dez imagens por animal. Contabilizou-se o número de núcleos celulares e fibras apenas das fibras que aparecessem por inteiro no campo visual das fotomicrografias e, para a contagem dos capilares, excluíram-se os vasos e fibras que tocassem as margens direita, consideradas margens de exclusão.

Os fragmentos proximais dos antímeros direitos foram fixados em Formol 7% e armazenados em álcool 70%, para posterior procedimento histológico, com desidratação em série crescente alcóolica, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. Posteriormente, os músculos foram emblocados, cortados transversalmente em 7 μm e corados em Tricrômico de Masson, para mensuração do tecido conjuntivo, que foi realizada por meio da porcentagem de pixels pelo programa GIMP 2.0.

As amostras distais do antímero esquerdo foram congeladas; em seguida, homogeneizadas em 1 mililitro (mL) de tampão Tris HCl pH 7.4 e centrifugadas a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos, a 4°C. O homogenato foi congelado

a -20°C para posterior dosagem proteica.

A quantificação de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford¹⁶, utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todas as amostras foram então normalizadas para 1 miligrama (mg) de proteína/mL. A determinação da reação de lipoperoxidação (LPO) foi realizada com objetivo de quantificar indiretamente os peróxidos, refletindo assim a intensidade da peroxidação lipídica. Foi realizado o método de TBARS¹⁷, realizando comparações de absorbância 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 (TCA) 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 ácido tiobarbitúrico (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 absorbância de 535 nm. Os resultados da peroxidação lipídica foram expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

Para avaliar a dosagem enzimática, associada ao sistema antioxidante, foi analisada a atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da catalase (CAT) e reação de lipoperoxidação (LPO). Para a primeira, foi utilizado o método proposto por Crouch et al.¹⁸ modificado. O princípio dessa análise consiste em quantificar o complexo formado entre superóxido e azul de tetrazolium (NBT), mensurada a 560nm durante 1.5 hora. 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, em volume final de 200 uL, 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. Uma unidade de SOD em nmol. min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A atividade da Catalase (CAT) foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm¹⁹, a partir do princípio de dismutação do peróxido, cujo

coeficiente de extinção molar é de $40 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. 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 H_2O_2 , 50 mM de TRIS-HCl pH 8.0 e 0.25 mM de EDTA. Os resultados da atividade da enzima catalase foram expressos em $\text{mmol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

Foi realizada a dosagem enzimática, associada à neurotoxicidade pela atividade da enzima colinesterase (ChE), análise pelo método de Ellman et al.²⁰, modificado, cujo princípio é a mensuração da produção da tiocolina quando a acetiltiocolina é hidrolisada. Isso é feito pela reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o ânion de coloração amarelada do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico. A reação foi realizada em triplicata, em $300 \mu\text{L}$ de solução, contendo 0.05 mM de ácido 5.5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e $1,5 \text{ mM}$ de Acetiltiocolina (ATC). Foi calculada a atividade da ChE, em relação à concentração de proteína (mg/mL), usando o coeficiente de extinção molar do DTNB ($1.36\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A quantificação da proteína foi calculada a partir da amostra bruta e a leitura realizada a 22°C . Os resultados foram expressos em $\text{nmol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$.

Análise estatística

Os resultados foram expressos por meio da estatística descritiva e analisados quanto à sua normalidade dos resíduos pelo teste de *Shapiro-Wilk*, com posterior análise da variância de três vias. Em caso de significância estatística ($p < 0,05$), foi realizado o teste Tukey-HSD, com auxílio do pacote ExpDes.pt do programa R (R Core Team, 2017).

RESULTADOS

Análise morfológica do tecido muscular e área de secção transversa

Os músculos sóleos dos grupos GP4 e GP8 apresentaram o aspecto morfológico característico do tecido, com fibras musculares com formato poligonal e homogêneas, dispostas em fascículos, além de núcleos situados na periferia das fibras. O tecido conjuntivo apresentou-se íntegro, com presença de capilares sanguíneos (Figura 2A e 2B).

Para os grupos que realizaram a pseudo-ooforectomia e tratamento com

plataforma vibratória (GPT4 e GPT8), as características morfológicas foram semelhantes aos grupos GP4 e GP8, no entanto, aparentemente apresentavam diâmetro maior, denotando hipertrofia muscular, causada pelo tratamento com a plataforma vibratória (Figura 2C e 2D). Esses resultados são corroborados com a morfometria da área de secção transversa das fibras ($F=6.01$, $p=0.01$), uma vez que GPT4 foi maior que GP4 ($p < 0.05$). Por outro lado, para essa variável, GPT8 apresentou-se menor que GPT4 ($p < 0.05$) (figura 3).

Os grupos que passaram pela cirurgia de ooforectomia (GO4 e GO8) não apresentaram numerosas alterações teciduais, no entanto, ao serem comparados tanto com os grupos ooforectomizados tratados e os pseudo-ooforectomizados, as fibras musculares apresentaram-se menores, indicando hipotrofia muscular (Figura 2E e 2F). Confirmando esses resultados, a análise da área de secção transversa das fibras musculares demonstrou diferença de GO8 com GO4 e GP8 ($p < 0.05$), ou seja, a ooforectomia influenciou esse parâmetro em relação ao controle e foi significativa, dependendo do maior tempo de privação hormonal (figura 3). Embora não tenha ocorrido diferença significativa na relação capilar/fibra, entre esses grupos, os calibres dos vasos sanguíneos possuíam calibre aumentado.

Por sua vez, tanto GOT4 e GOT8 apresentaram tamanho das fibras musculares semelhantes aos grupos pseudo-ooforectomia (Figura 2G e 2H), também com aspecto característico do tecido. Essa semelhança com os pseudo-oofectomizados pode sugerir a eficácia do tratamento com plataforma vibratória na reversão do processo de hipotrofia, causado pela privação hormonal, porém, para a variável área de secção transversa, apenas GOT8 apresentou-se maior que GO8, representado na figura 3.

Em todos os grupos, as fibras musculares estavam envoltas por tecido conjuntivo frouxo, formando o perimísio e endomísio, distribuído em feixes e, nesse tecido, não houve alterações morfológicas e quantitativas (tabela 3).

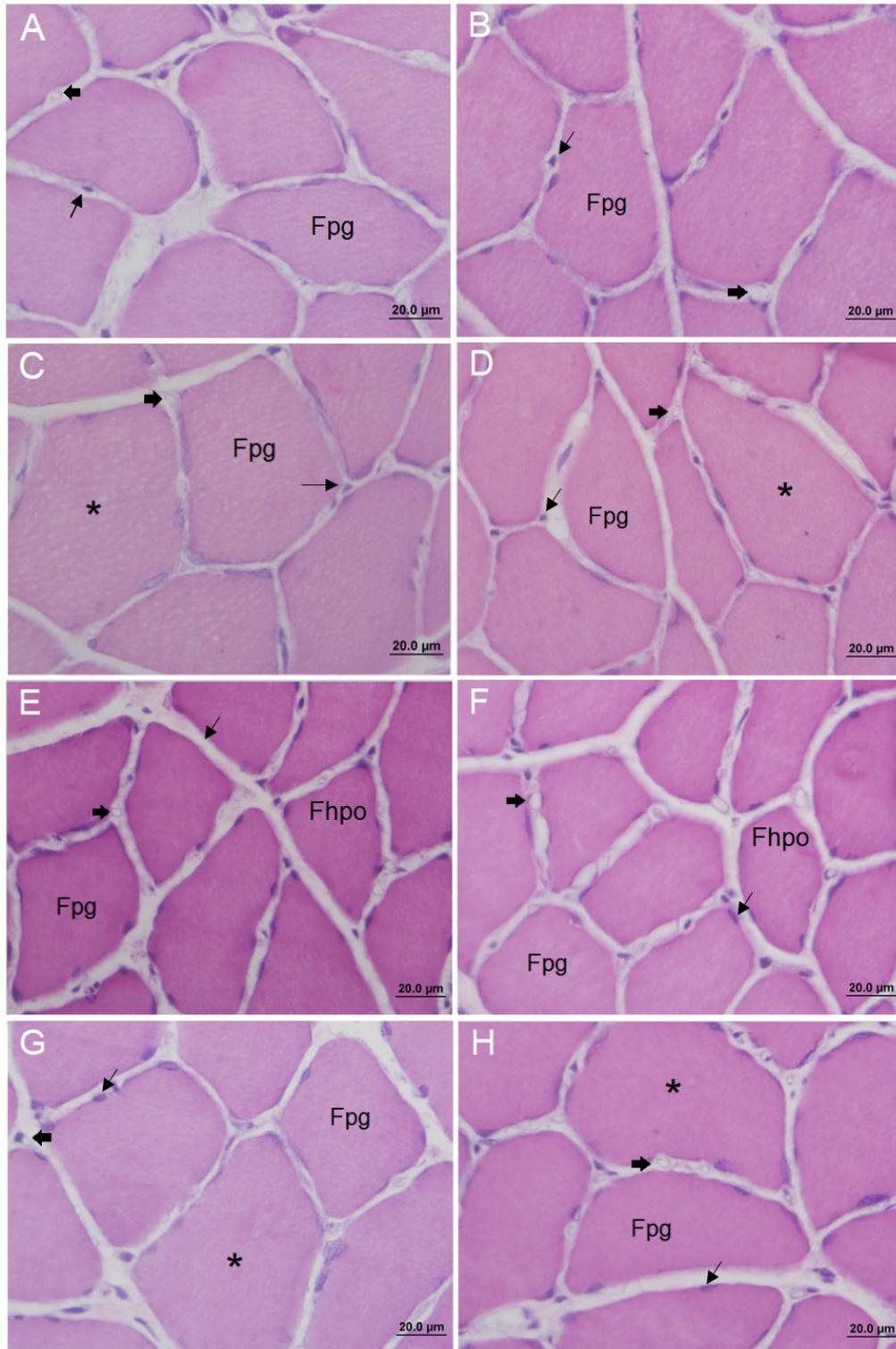


Figura 2: Fotomicrografias dos músculos sóleos de ratas *Wistar*, corte transversal, coloração Hematoxilina e Eosina. Em **A**, grupo Pseudo-ooforectomia 4 semanas (GP4) e em **B**, grupo Pseudo-ooforectomia 8 semanas (GP8), apresentando fibras musculares com formato poligonal (Fpg), núcleos de posição periférica (ponta de seta) e vasos sanguíneos (seta cheia). **C** e **D**, grupos Pseudo-ooforectomia tratados com plataforma vibratória durante 4 (GPT4) e 8 (GPT8) semanas, respectivamente, destacando-se além do aspecto característico o tamanho da fibra muscular (*). **E** e **F**, grupos Ooforectomia 4 (GO4) e 8 (GO8) semanas, respectivamente, com fibras hipotrofiadas (Fhpo) e vasos sanguíneos com calibre aumentado (seta cheia). **G** e **H**, grupos Ooforectomia tratados em 4 (GOT4) e 8 (GOT8) semanas, com fibras com aumento de tamanho (*), núcleos periféricos (ponta de seta) e vasos sanguíneos com regular tamanho (seta cheia).

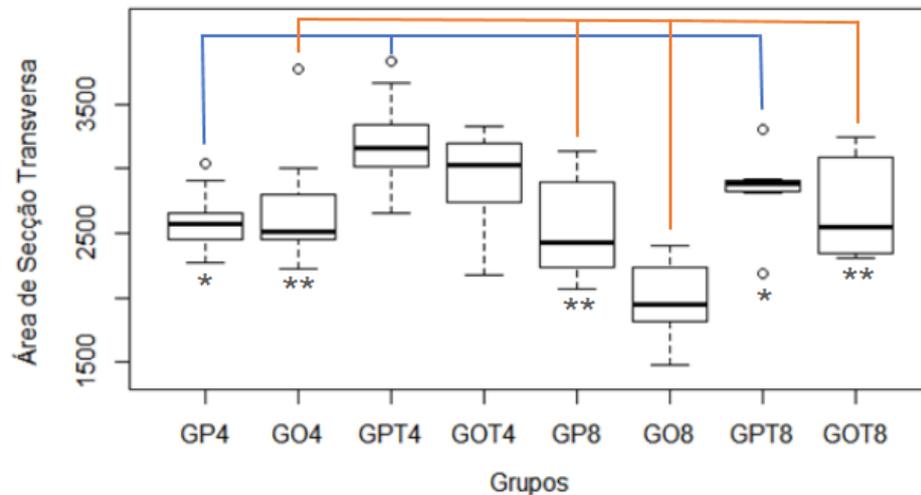


Figura 3: Boxplot dos valores da área de secção transversa do músculo sóleo de ratas Wistar. Legenda: Em A, Grupo Pseudo-ooforectomia 4 semanas (GP4); B Grupo Pseudo-ooforectomia oito semanas (GP8); C, Grupo Pseudo-ooforectomia tratado em 4 (GPT4) e D em 8 (GPT8) semanas; E, grupo Ooforectomia 4 semanas (GO4) e F 8 (GO8) semanas; G, grupo Ooforectomia tratado em 4 (GOT4) e H em 8 (GOT8) semanas; * diferença em relação ao GPT4; ** diferença em relação ao GO8.

Maior e Menor diâmetros

Para a variável maior diâmetro, não houve interação significativa entre ooforectomia, tratamento e tempo ($F=2.33$, $p=0.13$), apenas para os fatores isolados. Para o fator ooforectomia, quem realizou a cirurgia apresentou menores valores de maior diâmetro do que os que passaram pela pseudo-ooforectomia, independentemente do tratamento ($F = 13.1$, $p < 0.001$). Em relação ao tratamento, quem o fez apresentou maiores valores do que quem não o fez ($F = 28.8$, $p = 0.01$), independentemente da cirurgia.

Para a variável menor diâmetro, também não houve interação entre os três fatores ($F = 2.24$, $p = 0.13$). Semelhante com a outra variável de diâmetro, houve diferença estatística apenas nos fatores sozinhos, com as ratas ooforectomizadas possuindo menor diâmetro do que as não-ooforectomizadas ($F = 6.16$, $p = 0.01$) e o tratamento elevando os valores da variável quando comparado aos animais que não o realizaram ($F = 20.1$, $p < 0.01$). Esses dados estão representados na tabela 1.

Tabela 1: Média dos valores de maior e menor diâmetro, em μm , das fibras do músculo sóleo de ratas Wistar.

		Maior diâmetro	Menor diâmetro
GRUPOS	GP4	63.5 \pm 3.6 ^{Ab}	42.5 \pm 1.9 ^{Ab}
	GP8	61.4 \pm 5 ^{Ab}	42 \pm 3.4 ^{Ab}
	GPT4	71 \pm 3.8 ^{Aa}	47 \pm 3.5 ^{Aa}
	GPT8	66.2 \pm 4.5 ^{Aa}	44.4 \pm 3 ^{Aa}
	GO4	63.1 \pm 5.8 ^{Bb}	42.8 \pm 3.4 ^{Ab}
	GO8	53.7 \pm 3 ^{Bb}	40 \pm 3.2 ^{Ab}
	GOT4	66.7 \pm 5.3 ^{Ba}	45.2 \pm 3.5 ^{Aa}
	GOT8	62.1 \pm 6.3 ^{Ba}	42.5 \pm 4.8 ^{Aa}

Legenda: GP4 e GP8: grupos pseudo-ooforectomia de 4 e 8 semanas; GO4 e GO8: grupos ooforectomia de 4 e 8 semanas; GPT4 e GPT8: grupos pseudo-ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas; GOT4 e GOT8: grupos ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representaram diferença estatisticamente significativa, sendo o fator ooforectomia representado pelas minúsculas e tratamento pelas maiúsculas.

Relações capilares sanguíneos e núcleos por fibra.

Para a relação capilares/fibra, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F=1$, $p=0.32$). Para a contagem de núcleos celulares, houve interação significativa entre tratamento e tempo ($F=15.66$, $p<0.001$), com a influência da plataforma vibratória no tempo de 4 semanas, sendo que GP4 e GO4 possuem médias maiores de contagem de núcleos em relação a GPT4 e GOT4 ($p<0.001$) (tabela 2).

Tabela 2: Média dos valores das relações núcleos/fibras e capilares/fibra do músculo sóleo de ratas Wistar.

		Capilares/Fibra	Núcleos/Fibra
GRUPOS	GP4	1.90 \pm 0.33	3.60 \pm 0.54 ^a
	GP8	1.63 \pm 0.18	2.50 \pm 0.42
	GPT4	1.87 \pm 2.22	2.83 \pm 0.2 ^b
	GPT8	1.90 \pm 0.3	2.62 \pm 0.22
	GO4	1.78 \pm 0.22	3.50 \pm 0.40 ^a
	GO8	1.69 \pm 0.18	2.42 \pm 0.18
	GOT4	1.82 \pm 0.17	3.01 \pm 0.44 ^b
	GOT8	1.79 \pm 0.27	2.47 \pm 0.28

Legenda: GP4 e GP8: grupos pseudo-ooforectomia de 4 e 8 semanas; GO4 e GO8: grupos ooforectomia de 4 e 8 semanas; GPT4 e GPT8: grupos pseudo-ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas; GOT4 e GOT8: grupos ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas. Valores expressos em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representaram diferença estatisticamente significativa.

Tecido Conjuntivo

Não houve interação significativa entre ooforectomia, tratamento e tempo ($F=0.005$, $p=0.9$) para a porcentagem de tecido conjuntivo (tabela 3).

Tabela 3: Média dos valores de porcentagem de tecido conjuntivo das fibras do músculo sóleo de ratas Wistar.

Porcentagem de tecido conjuntivo		
GRUPOS	GP4	2.32 ± 0.43
	GP8	2.45 ± 0.3
	GPT4	1.74 ± 0.3
	GPT8	1.75 ± 0.3
	GO4	2.65 ± 0.25
	GO8	2.8 ± 0.3
	GOT4	1.9 ± 0.25
	GOT8	1.84 ± 0.3

Legenda: GP4 e GP8: grupos pseudo-ooforectomia de 4 e 8 semanas; GO4 e GO8: grupos ooforectomia de 4 e 8 semanas; GPT4 e GPT8: grupos pseudo-ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas; GOT4 e GOT8: grupos ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Em relação à peroxidização de lipídeos, houve interação apenas entre os fatores cirurgia e tempo ($F = 23.16$, $p < 0.001$), havendo uma maior taxa de lipoperoxidização nos animais ooforectomizados no período de oito semanas (GO8 e GOT8). Não houve interação entre os fatores com a plataforma vibratória ($F = 0.001$, $p = 0.97$), significando que a o tratamento com a plataforma vibratória não foi capaz de reverter essa lipoperoxidização (tabela 4).

Para a enzima SOD, não houve interação entre os três fatores ooforectomia, plataforma e tempo ($F = 0.03$, $p = 0.85$) e os mesmos isoladamente ($F = 3.83$, $p = 0.05$; $F = 3.99$, $p = 0.05$; $F = 0.92$, $p = 0.34$, respectivamente). Ou seja, não houve diferença entre os grupos para esta atividade enzimática. Para a atividade da enzima Catalase, também não houve interação entre os mesmos fatores ($F = 0.005$, $p = 0.94$) e para a enzima ChE os resultados se repetiram, não havendo interação significativa entre os fatores ($F = 1.09$, $p = 0.29$), conforme tabela 4.

Tabela 4: Média dos valores das atividades enzimáticas do músculo sóleo de ratas *Wistar*.

	LPO	SOD	CAT	ChE	
GRUPOS	GP4	11.9 ± 4.1 ^b	1.9 ± 2.2	1.5 ± 2.4	15.7 ± 4.5
	GP8	8.1 ± 1.9 ^b	1.6 ± 2	2.7 ± 3.5	15.2 ± 2.5
	GPT4	12.2 ± 8.5 ^b	4.1 ± 3.3	5.5 ± 4.9	15.3 ± 3.1
	GPT8	7.6 ± 7.0 ^b	1.8 ± 1.4	3.3 ± 2.8	11.7 ± 2.8
	GO4	9.6 ± 7.3 ^b	2.5 ± 1.9	1.9 ± 2.9	15.7 ± 2.9
	GO8	20.2 ± 5.7 ^a	3.5 ± 3.4	4.4 ± 5.8	14.1 ± 2.9
	GOT4	9.4 ± 4.7 ^b	5.5 ± 5.4	4.2 ± 7.1	16 ± 2.3
	GOT8	19.1 ± 8.2 ^a	4.1 ± 3.3	3.2 ± 6.1	14.1 ± 2.3

Legenda: GP4 e GP8: grupos pseudo-ooforectomia de 4 e 8 semanas; GO4 e GO8: grupos ooforectomia de 4 e 8 semanas; GPT4 e GPT8: grupos pseudo-ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas; GOT4 e GOT8: grupos ooforectomia tratados em 4 e 8 semanas; LPO: lipoperoxidação; SOD: enzima superóxido dismutase; CAT: enzima catalase; ChE: enzima colinesterase. Unidades de medidas da LPO em nmol de MDA. mg de 205 proteína⁻¹, para a SOD U/mg de proteína.; CAT em mmol.min⁻¹. mg proteína⁻¹ e ChE em nmol.min⁻¹. mg proteína⁻¹. Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes representaram diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

Na simulação da privação hormonal, Ezzat-Zadeh et al.⁴ afirmam que o protocolo de cirurgia experimental de ooforectomia é o modelo mais popular e que pode ser utilizado para simular os efeitos dessa privação, assim como o utilizado no presente estudo.

A cirurgia de ooforectomia promoveu alterações no músculo sóleo, com a diminuição da área de secção transversa das fibras musculares, morfometricamente significativo em GO8. O mesmo ocorreu no trabalho de Ywazaki et al.²¹ ao promover a cirurgia de remoção dos ovários e útero de ratas *Wistar*. Utilizando a remoção bilateral ovariana, os resultados de Braggion et al.¹ afirmam que o estrogênio exerce efeito protetor no sistema musculoesquelético, uma vez que os animais ooforectomizados eram diferentes dos controles ou dos que passaram por algum tipo de tratamento e, ainda, de acordo com Furnaletto Junior et al.²², a ooforectomia, associada a modelo de artrite reumatoide, apresenta mais efeitos deletérios no tecido muscular do que a artrite isoladamente. Embora não bem compreendido, esses estudos sugerem que o estrogênio possa atuar na regulação de proteínas, exercendo efeitos antiapoptóticos, com seu déficit afetando o tamanho da fibra, peso muscular e regeneração.

Para verificar o efeito do estrogênio no tecido muscular, Ezzat-Zadeh, et al.⁴ separaram ratas de cinco e dez meses de idade, em grupos ooforectomizados,

tratados e não tratados com reposição do hormônio (17β -estradiol). Como resultado, verificaram que a privação hormonal aumentou a perda óssea e massa gorda, diminuindo a proporção peso corporal e peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio, com resultados mais expressivos nas ratas de dez meses de idade. No trabalho, foi observado que, conforme o aumento do tempo de ooforectomia, maiores são os sinais de disfunção mitocondrial, em que, após oito semanas, houve diminuição do número de mitocôndrias, com consequentemente diminuição da capacidade respiratória e síntese de ATP nos músculos sóleo e fibras fásicas do gastrocnêmio.

Em nosso estudo, também foi observada essa dependência dos efeitos nocivos do tempo. Embora a análise morfológica do músculo sóleo aponte hipotrofia nas ratas do GO4, apenas as ratas do GO8 apresentaram diferença, sendo sugerido assim que, quanto maior o período de privação hormonal, maiores são as alterações.

De acordo com os resultados, as ratas controles que passaram apenas pela simulação da ooforectomia também responderam ao tratamento. Lochyński et al.²⁴ avaliaram o músculo gastrocnêmio medial de ratos Wistar, após três ou seis meses de vibração mecânica (50 hz, todos os dias, quatro séries de 30 segundos, com alta magnitude 4.9 g). Como resultado, verificaram que, tanto as unidades motoras de fibras rápidas quanto lentas sofreram modificações, em três meses de tratamento, com aumento da força em ambas. Segundo os autores, as unidades motoras são rapidamente ativadas durante o estímulo da vibração, por meio do reflexo tônico de vibração, e a atividade de disparo é mantida ao atuar na manutenção da postura, durante o exercício e contra as forças externas que atuam na articulação que o músculo está envolvido. Embora se trate de outro músculo, o gastrocnêmio também faz parte do grupo tríceps sural, assim como o sóleo, e atua como principal planti flexor do tornozelo. Dessa forma, tais achados se assemelham ao encontrado em GPT4, no qual as ratas pseudo-ooforectomizadas apresentaram aumento da área de secção transversa nesse grupo, o que pode ser explicado pelo ganho de força propiciado pelo tratamento, uma vez que era solicitada a manutenção da postura dos animais sobre a plataforma.

Ainda no trabalho de Lochyński et al.²⁴, os animais que passaram pelo tratamento de vibração durante seis meses apresentaram diminuição da força de contração das unidades motoras rápidas e lentas, com o tratamento a longo prazo podendo ser nocivo ao tecido. Os animais do GPT8, no referido estudo, diferiram do

GPT4, indicando que o tratamento em maior prazo para ratos-controle também difere do de menor duração; entretanto, não foi nocivo, podendo ser explicado por uma possível adaptação das fibras musculares, já que o estímulo não foi alterado.

A vibração mecânica apresenta-se como uma terapia promissora, porém, pesquisas experimentais envolvendo o tecido muscular ainda se encontram em menor número, quando comparadas com o tecido ósseo^{13,14,25}.

De acordo com Komrakova et al.²⁶, tanto o tipo de plataforma vibratória como a frequência da vibração mecânica influenciam o tratamento, sendo esses parâmetros muitas vezes negligenciados. De acordo com os autores, a plataforma horizontal não exerceu efeitos positivos para o tecido muscular e ósseo, como tratamento de fraturas em ratas ooforectomizadas, sendo até nocivo na frequência de 70 Hz. Com resultados opostos, a plataforma vertical exerceu efeitos positivos, sendo os melhores resultados tanto para o tecido ósseo quanto muscular, em frequências mais baixas (35 e 50 Hz) do que altas (70 e 90Hz), embora não tenham sido consideradas nocivos nesse tipo de vibração, uma vez que os níveis séricos da enzima creatina quinase, indicadora de lesão muscular, não foram alterados. A frequência utilizada no presente estudo foi de 60 Hz, próxima aos resultados benéficos encontrados no trabalho de Komrakova et al.²⁶ e, nesse trabalho, utilizou-se a plataforma triplanar, uma nova modalidade de vibração, ainda pouco estudada.

Como citado, a escassez de pesquisas experimentais interfere na realização de análises mais aprofundadas do tecido muscular, entretanto, há muitos experimentos com humanos. Bembem, Palmer e Bembem²⁷ verificaram que o exercício de resistência, associado à vibração mecânica, foi capaz de aumentar os efeitos positivos do exercício isolado; Dutra et al.²⁸ ressalta que o tratamento com plataforma vibratória melhorou a força muscular isométrica e dinâmica de membros inferiores e superiores, flexibilidade, mobilidade e equilíbrio de mulheres pós-menopáusicas, sem efeitos colaterais. Revisões de literatura e meta-análises também suportam esses dados^{29,30}.

No que tange ao tecido conjuntivo, responsável pela manutenção da estrutura do músculo, verificou-se que tanto a cirurgia quanto o tratamento não provocaram alterações na quantidade do mesmo, que pode sofrer remodelação com migração e proliferação de fibroblastos, mediante estímulos. Esses estímulos podem ser processos inflamatórios e fatores de crescimento, todavia, como não ocorreram

mudanças frente à privação hormonal, assume-se que é necessário haver maior perturbação no tecido para que ocorram alterações, como o acúmulo de gordura e tecido conjuntivo no músculo, durante a senescência celular e doenças musculares^{31,32} ou modalidades de exercício mais intensas que provoquem a remodelação do mesmo²¹.

Em relação à densidade capilar, ou seja, número de capilares sanguíneos por fibra, também não houve diferença entre os grupos. No trabalho de Komrakova et al.²⁶, os grupos que realizaram a plataforma vibratória tiveram densidade capilar aumentada, provavelmente pelo estímulo da contração, aumentando o metabolismo do tecido e, conseqüentemente, a angiogênese no tecido, porém, as sessões de tratamento para esses animais foram diárias, durante trinta dias. Kaneguchi et al.³³ também encontraram efeitos positivos para a angiogênese no tecido, contudo, ao tratar com vibração mecânica em ratos que tiveram o membro posterior suspenso durante duas semanas. Diante desses dados, pode-se verificar que o estímulo para a angiogênese ocorreu quando houve uma maior frequência do uso do tratamento, bem como a mesma é dependente da injúria no tecido, visto que a elevação do membro acarreta maiores alterações na vascularização do que a privação hormonal.

Em relação à contagem de núcleos celulares, houve diferença apenas no período de quatro semanas, sugerindo que o treinamento diminuiu a contagem nuclear. Esse resultado pode ser explicado não pelo declínio do número de núcleos e sim pela hipertrofia muscular, confirmada pelo aumento da área de secção transversa. A hipótese é que a hipertrofia da miofibrila promoveu o deslocamento do núcleo e, pela contagem celular ser mensurada pelo total de núcleos identificados no campo visual, houve essa diminuição. Como GPT8 apresentou menor área de secção transversa que GPT4, a diferença de núcleos não foi observada nesse grupo. Gundersen³⁴ confirma os resultados, explicando que, tanto a hipertrofia quanto a atrofia muscular, até certo ponto, não sofrem alteração do número de núcleos, sendo dependentes do volume citoplasmático que, apenas quando excedido, desencadeará recrutamento de novos mionúcleos.

No estresse oxidativo, houve um aumento da peroxidação lipídica nos grupos ooforectomizados de oito semanas. Essa lipoperoxidação é um dos principais marcadores do estresse oxidativo, pois os ácidos graxos são alvos favoritos de oxidação pelos EROS, principalmente pelo superóxido e hidroxila. A partir da

peroxidação lipídica, as membranas sofrem perturbações na fluidez e permeabilidade que culminam na perda da homeostase e até mesmo morte celular⁷. Confirmando o encontrado em outras variáveis, esse estresse também é dependente do período de privação hormonal, porém, embora inferior, o GOT8 não foi diferente de GO8, indicando que o estímulo do tratamento não foi eficiente para reverter o dano na membrana lipídica.

Liu et al.³⁵ buscaram avaliar o comportamento da resistência à insulina de camundongos submetidos à plataforma vibratória durante 12 semanas, 45 Hz, sessenta minutos por dia, e concluíram que esse tipo de tratamento diminuiu a insulina em jejum, acumulação lipídica e o estresse oxidativo do fígado em cerca de 30%. A atividade enzimática de SOD e CAT não foi alterada, entretanto, outros marcadores, como a glutathiona reduzida e glutathiona redutase, apresentaram significância, sugerindo que possíveis análises complementares pudessem ter dado significância no presente trabalho. No trabalho de Liu et al.³⁵, o tratamento com a plataforma foi capaz de diminuir a lipoperoxidação e esse dado se deu provavelmente à maior frequência do tratamento.

Outros dados referentes a esse tipo de tratamento, no estresse oxidativo, não foram encontrados na literatura. Durante o exercício físico, o tecido muscular é mais susceptível ao estresse oxidativo, quando comparado a outros tecidos, como o fígado e coração, necessitando assim de maior proteção antioxidante³. Entretanto, Rahal et al.⁷ afirmam que, quanto mais regular é o exercício, melhor a adaptação e regulação positiva no sistema antioxidante.

Sánchez-Rodríguez et al.³⁶ avaliaram mulheres no período pré e pós-menopausa e observaram que as mulheres no período pós-menopausa apresentaram quase três vezes maiores valores na LPO do que as pré-menopáusicas, corroborando com o achado nesse estudo. Ainda, houve maiores valores de SOD nessas mulheres do que as pré-menopáusicas; tal aumento da SOD, diferentemente do presente estudo, pode ser explicado pela idade das mulheres, que tiveram um maior período de privação hormonal. Para as ratas, a significância estatística para o fator cirurgia foi limítrofe ($p = 0.05$) e, possivelmente, em um maior período de estudo, haveria diferença na atividade da SOD.

As enzimas antioxidantes possuem ações variadas, dependendo do órgão analisado. Em suma, as enzimas antioxidantes primárias, como a SOD e catalase,

catalisam cascatas complexas para transformar os EROS em moléculas estáveis, como água e oxigênio⁷. Pimenta et al.⁵ avaliaram o efeito do exercício intervalado de alta intensidade e da dieta hipercalórica do gastrocnêmio de ratas ooforectomizadas. Como resultado, observaram que, para a atividade da catalase, tanto a ooforectomia e o exercício só diferiram nos grupos que fizeram uso da dieta hipercalórica. O semelhante ocorreu para a atividade da SOD e, ainda, tanto a ooforectomia quanto o tratamento exerceram efeitos nocivos e benéficos, respectivamente, para animais com dieta padrão. Em relação à catalase, houve concordância com o presente estudo, com esse antioxidante não exercendo efeitos tanto na privação hormonal quanto o tratamento. Entretanto, para a SOD, também pode ter diferido do trabalho de Pimenta et al.⁵, devido à modalidade de exercício intensa, quando comparada com a plataforma vibratória.

No que tange à atividade da ChE, as enzimas colinesterases têm como função encerrar a neurotransmissão colinérgica por hidrólise, clivando a acetilcolina em ácido acético e colina³⁷. Nesse trabalho, a colinesterase não foi afetada por nenhuma intervenção, sugerindo que nenhuma delas ocasionou a neurotoxicidade no tecido. No trabalho de Strauss et al.³⁸, que objetivou analisar o comportamento da enzima em diferentes tecidos e idade, foi encontrada pouca atividade da enzima no tecido muscular do gastrocnêmio, diafragma e coração, sendo tais resultados atribuídos à pequena proporção de junções neuromusculares, quando comparadas com a massa total das fibras musculares, sendo menor essa atividade em ratos mais velhos pela mesma razão (filhotes possuem proporção maior em relação a ratos adultos), o que também pode justificar os resultados encontrados no estudo.

Perspectivas

Por serem alterações fisiológicas, todas as mulheres passarão pelo período de privação hormonal, que altera o tecido muscular, afetando a mobilidade e gerando impactos para a sociedade com os custos de tratamentos e internações^{39,40}. A inatividade física pode estar relacionada com a ocorrência de fraturas e também, para evitá-las, devem ser utilizados programas que trabalhem com um menor risco de lesões e quedas⁹. Como os resultados comprovaram, o tecido muscular pode ser afetado com a privação hormonal e o tratamento com a plataforma vibratória pode ser um método alternativo para melhorar essas alterações, porém, tais efeitos são

dependentes dos parâmetros utilizados. Como observado, ainda são poucos os estudos avaliando essa terapia no tecido muscular, sendo assim, são necessárias mais pesquisas e padronização dos parâmetros para melhor entendimento dessa modalidade de tratamento.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, foi possível concluir que a cirurgia de ooforectomia diminui a área de secção transversa das fibras musculares e aumenta a peroxidação lipídica do músculo sóleo de ratas *Wistar*. Contudo, o tratamento com a plataforma vibratória triplanar foi capaz de proporcionar a hipertrofia muscular nas ratas pseudo-ooforectomizadas durante quatro semanas, assim como conseguiu reverter as alterações causadas pela cirurgia em oito semanas nessa variável.

REFERÊNCIAS

1. Braggion GF, Ornelas E, Cury JCS, Lima NEA, Aquino RC, Fonseca FLA, Maifrino LBM. Morphological and biochemical effects on the skeletal muscle of ovariectomized old female rats submitted to the intake of diets with vegetable or animal protein and resistance training. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016.
2. Pöllänen E, Sipilä S, Alen M, Ronkainen PHA, Ankarberg-Lindgren C, Puolakka J et al. Differential influence of peripheral and systemic sex steroids on skeletal muscle quality in pre- and postmenopausal women. *Aging Cell* 2011; 10(4):650-660.
3. Carson JA, Manolagas SC. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone* 2015; 80:67-68.
4. Ezzat-Zadeh Z, Kim JS, Chase PB, Arjmandi BH. The cooccurrence of obesity, osteoporosis, and sarcopenia in the ovariectomized rat: a study for modeling osteosarcopenic obesity in rodents. *J Aging Res* 2017; 2017.
5. Pimenta M, Bringhenti I, Souza-Mello V, Santos Mendes IK, Aquila MB, Mandarim-De-Lacerda C. A. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. *Life Sciences* 2015; 15(139):75-82.
6. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperl V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci* 2013; 14:10497-10538.
7. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *BioMed Res Int* 2014; 2014.

8. Egan B, Zierath, J. R. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab* 2013; 17:162-184.
9. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian Journal of medicine & Science in Sports* 2015; 25(S3):1.72.
10. Cerciello S, Rossi S, Visonà E, Corona K, Oliva F. Clinical applications of vibration therapy in orthopaedic practice. *Muscles, Ligaments and Tendons J* 2016; 6(1):147-156.
11. Anwer S, Alghadir A, Zafar H, Al-Eisa E. Effect of whole body vibration training on quadriceps muscle strength in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Physiotherapy* 2016; 102:145-151.
12. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52(3):466-470.
13. 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(11):727-735.
14. Brouwers JEM, Rietbergen BV, Ito K, Huiskes R. Effects of vibration treatment on tibial bone of ovariectomized rats analyzed by in vivo micro-CT. *J Ortho Res* 2010; 28:62-69.
15. Alizadeh-Meghbrazi M, Zariffa K, Masana K, Popovic MR, Craven BC. Variability of vibrations produced by commercial whole-body vibration platforms. *Journal of Rehabilitation Medicine* 2014; 46:937-940.
16. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 16(72):248–254.
17. Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52(569):302-310.
18. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GMP, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981; 30:235-241.
19. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
20. Ellman GL, Courtney KD, Andresm V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7(49):88-95.
21. Ywazaki JL, Loureiro APC, Zotz TGG, Nascimento LR, Nobre DV, Gomes ARS. Effects of resistive exercise and stretching on the soleus muscle of ovariectomized

rats. *Fisioterapia e Pesquisa* 2016; 23(1):74-83.

22. Furnaletto Junior R, Souza AP, Oliveira AA, Nunes PRP, Michelin MA, Chica JEL, Murta EFC, Orsatti FLA. Acute resistance exercise reduces increased gene expression in muscle atrophy of ovariectomized arthritic rats. *Menopause* 2016; 15(4):193-201.

23. Cavalcanti-De-Albuquerque JPA, Salvador IC, Martins EL, Jardim-Messeder D, Weneck-De-Castro JPS, Galina A, Carvalho DP. Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. *J Appl Physiol* 2014; 116:779-789.

24. Łochyński D, Kaczmarek D, Rędowicz MJ, Celichowski J, Krutki P. Long-term effects of whole-body vibration on motor unit contractile function and myosin heavy chain composition in the rat medial gastrocnemius. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2013; 13(4):430-441.

25. Xie P, Tang Z, Qing F, Chen X, Zhu X, Fan Y, Yang X, Zhang X. Bone mineral density, microarchitectural and mechanical alterations of osteoporotic rat bone under long-term whole-body vibration therapy. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016; 53:351-349.

26. Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM, Stuermer EK. Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. *Calcif Tissue Int* 2013; 92:509-520.

27. Bemben DA, Palmer IJ, Bemben MG, Knehans AW. Effects of combined whole-body vibration and resistance training on muscular strength and bone metabolism in postmenopausal women. *Bone* 2010; 47:650-656.

28. Dutra MC, Oliveira ML, Marin RV, Kleine HCR, Silva OL, Lazaretti-Castro M. Whole-body vibration improves neuromuscular parameters and functional capacity in osteopenic postmenopausal women. *Menopause: Menopause* 2016; 23(8):870-875.

29. Montoro MVP, Montilla JAP, Aguilera EL, Checa MA. El entrenamiento vibratorio como intervención en la sarcopenia: repercusiones en el sistema neuromuscular de los adultos mayores. *Nutr Hosp* 2015; 32(4): 1454-1461.

30. Ma C, Liu A, Sun M, Zhu H, Wu H. Effect of whole-body vibration on reduction of bone loss and fall prevention in postmenopausal women: a meta-analysis and systematic review. *J Ortho Surg Res* 2016; 11(24).

31. Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 2010; 316:3050-3058.

32. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015; 96(3):183-195.

33. Kaneguchi A, Ozawa J, Kawamata S, Kurose T, Yamaoka K. Intermittent whole-

body vibration attenuates a reduction in the number of the capillaries in unloaded rat skeletal muscle. *BMC Musculoskelet* 2014; 15(315).

34. Gundersen K. Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *J Exp Biol* 2016; 2019:235-242.

35. Liu Y, Zhai M, Guo F, Shi T, Liu J, Wang X, Zhang X, Jing D, Hai C. Whole Body Vibration Improves Insulin Resistance in db/db Mice: Amelioration of Lipid Accumulation and Oxidative Stress. *Appl Biochem Biotechnol* 2016; 179:819-829.

36. Sánchez-Rodríguez MA, Zacarías-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Mun E, Menzón-Núñez VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012; 19(3):361-367.

37. Gupta VK, Kumar A, Siddiqi NH, Sharma B. Rat brain acetyl cholinesterase as a biomarker of cadmium induced neurotoxicity. *J Toxicol* 2016; 1(1).

38. Strauss V, Moreno MCR, Vogt J, Dammann M, Schneider S, Gröters S, Ravenzwaay BV. Acetylcholinesterase measurement in various brain regions and muscles of juvenile, adolescent and adult rats. *Toxicol Mech Methods* 2017; 27(9):666-676.

39. Park S, Son WM, Kwon OS. Effects of whole body vibration training on body composition, skeletal muscle strength, and cardiovascular health. *Journal of Exercise Rehabilitation* 2015; 11(6):289-295.

40. Edwards JH, Reilly GC. Vibration stimuli and the differentiation of musculoskeletal progenitor cells: Review of results in vitro and in vivo. *World Journal of Stem Cells* 2015; 7(3):568-582.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “**Avaliação e comparação dos efeitos da plataforma vibratória aplicada durante 1 e 2 meses em ratas ooforectomizadas**”, sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Impressão na UNIOESTE - Luciana Fariña

Cascavel, 24/08/2016

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

ANEXO 2 – NORMAS REVISTA 01

Revista Brasileira de Reumatologia (Artigo 01)

Escopo e política

A **Revista Brasileira de Reumatologia (RBR)** publica artigos sobre temas reumatológicos e correlatos, após análise por seu Conselho Editorial. A RBR é catalogada no Web of Science, PUBMED/MEDLINE, Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), Scopus, Index Copernicus e Scielo (Scientific Electronic Library Online).

Ao submeter o manuscrito, os autores assumem a responsabilidade de o trabalho não ter sido previamente publicado nem estar sendo analisado por outra revista. Os manuscritos devem ser inéditos, ter sido objeto de análise e com anuência de todos os autores.

Artigos aceitos para publicação passam a ser propriedade da revista, não podendo ser reproduzidos sem consentimento por escrito.

A abreviatura de seu título é **Rev Bras Reumatol**, que deve ser usada em bibliografias, notas de rodapé e em referências bibliográficas.

Não há taxas para submissão e avaliação de artigos.

A Revista adota o sistema iThenticate para todos os manuscritos submetidos; na identificação de alto índice de pareamento os arquivos são submetidos a avaliação pelos editores.

Os manuscritos serão avaliados inicialmente por editor-chefe e/ou editor associado, e se considerado em conformidade com formato e escopo da Revista, seguirão para avaliação por no mínimo dois revisores com conhecimento científico na área de pesquisa, de procedência nacional ou estrangeira. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o manuscrito receberá os pareceres favoráveis ou desfavoráveis dos revisores, que subsidiarão a subsequente reavaliação e recomendação de aceite ou rejeição pelo editor associado. As decisões finais serão de responsabilidade do editor-chefe”.

Forma e preparação de manuscritos

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

O manuscrito pode ser submetido em português ou inglês, em espaço duplo, com margens de 2,5 cm. No texto não devem ser empregadas abreviaturas não convencionais, gírias (jargões) médicas ou redação tipo telegráfica. A citação de medicamentos e produtos farmacêuticos deve ser feita utilizando-se apenas a nomenclatura farmacológica, sem menção do nome comercial.

ESTRUTURA DO MANUSCRITO

*Manuscript**, *Title Page**, *Cover Letter* e *Author Agreement** devem ser enviados em arquivos individuais. Tabelas e figuras devem ser numeradas conforme citadas no texto e enviadas em arquivos separados, com títulos e legendas correspondentes. (*arquivos obrigatórios)

Página do título

Deve conter: a) título do artigo; b) nome completo dos autores e sua titulação

mais importante; c) departamento(s) e instituição(ões) onde se originou o trabalho; d) nome, endereço completo e e-mail válido do autor responsável para correspondência; e) conflito de interesse e agências financiadoras relevantes; f) título resumido com no máximo 60 caracteres.

Author Agreement

É o documento no qual os autores declaram a originalidade do manuscrito, além de aprovarem o artigo objeto da submissão, a autoria e a ordem da lista de autores. Deve ser assinado por todos os autores.

Artigo Original

Deve conter: página do título, página de resumo com palavras-chave, introdução, material e métodos ou pacientes e métodos, resultados e discussão, agradecimentos, referências, tabelas, figuras e legendas das figuras. Não deve exceder 5.000 palavras, incluindo-se as referências e excluindo-se a página do título, resumo, tabelas e legendas. Pode exibir até seis figuras ou tabelas e até 50 referências.

Página de resumo

Deve conter: a) objetivo, métodos, resultados e conclusões, não excedendo 250 palavras; b) três a cinco palavras-chave.

Introdução

A finalidade dessa seção é definir o propósito e as razões para a realização do trabalho. Não se recomenda extensa revisão da literatura.

Pacientes e métodos ou Material e métodos

Deve incluir informações suficientes que permitam a reprodução do trabalho e, quando pertinente, a aprovação pelo Comitê de Ética institucional. Os métodos empregados na análise estatística devem sempre ser citados.

Resultados

Devem ser claros e concisos. Tabelas e gráficos não devem duplicar informações.

Discussão

Deve ser concisa, interpretando os resultados no contexto da literatura atual. É conveniente não ultrapassar a metade do número de páginas do trabalho completo.

Agradecimentos

Apenas às pessoas que contribuíram, por exemplo, com técnicas, discussão e envio de pacientes. Auxílio financeiro deve ser referido na página do título.

Referências

Devem ser citadas no texto em algarismos arábicos, sobrescritos e depois da pontuação, sem parênteses ou colchetes. A numeração deve ser sequencial, de acordo com a ordem de citação no texto. Nas referências com mais de seis autores, devem ser citados os seis primeiros, seguidos pela expressão *et al.* Sugere-se a

utilização dos programas Reference Manager ou Endnote, seguindo-se o estilo Vancouver. Exemplos de referência para diferentes formatos são apresentados a seguir. Os autores devem consultar o NLM's Citing Medicine para mais informações sobre os formatos das referências.

Artigo de revista

1. Rivero MG, Salvatore AJ, Gomez-Puerta JA, Mascaro JM, Jr., Canete JD, Munoz-Gomez J *et al.* Accelerated nodulosis during methotrexate therapy in a patient with systemic lupus erythematosus and Jaccoud's arthropathy. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(12):1587-8.

Artigo extraído de endereço eletrônico

2. Cardozo JB, Andrade DMS, Santiago MB. The use of bisphosphonate in the treatment of avascular necrosis: a systematic review. *Clin Rheumatol* 2008. Available from: <http://www.springerlink.com.w10069.dotlib.com.br/content/l05j4j3332041225/fulltext.pdf>. [Accessed in February 24, 2008].

Livro

3. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

Tabelas e Figuras

Cada tabela ou figura deverá ser numerada em algarismo arábico e enviada em arquivo separado (.jpg, .tif, .png, .xls, .doc) com 300 dpi no mínimo. Título e legenda devem estar no mesmo arquivo da figura ou tabela a que se referem. Tabelas e ilustrações devem ser autoexplicativas, com informações suficientes para sua compreensão sem que se tenha de recorrer ao trabalho. Fotomicrografias devem incluir a escala apropriada.

Considerações éticas e legais

A RBR segue as normas do *Uniform Requirements for Manuscripts (URM) Submitted to Biomedical Journals* desenvolvidas pelo *The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)* - fevereiro de 2006.

Conflito de interesse

A confiança pública no processo de revisão por pares e a credibilidade dos artigos publicados dependem, em parte, de como o conflito de interesse é administrado durante a redação, a revisão por pares e a decisão editorial. O conflito de interesse existe quando um autor (ou instituição do autor), revisor ou editor tem relações financeiras ou pessoais que influenciem de forma inadequada (viés) suas ações (tais relações são também conhecidas como duplo compromisso, interesses conflitantes ou fidelidades conflitantes). Essas relações variam entre aquelas com potencial insignificante até as com grande potencial para influenciar o julgamento, e nem todas as relações representam verdadeiro conflito de interesse. O potencial conflito de interesse pode existir dependendo se o indivíduo acredita ou não que a relação afete seu julgamento científico. Relações financeiras (tais como emprego, consultorias, posse de ações, testemunho de especialista pago) são os conflitos de interesse mais facilmente identificáveis e os mais suscetíveis de minar a

credibilidade da revista, dos autores e da própria ciência. No entanto, podem ocorrer conflitos por outras razões, tais como relações pessoais, competição acadêmica e paixão intelectual.

Princípios éticos

Ao relatar experimentos em seres humanos, os autores devem indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentação humana (institucional e nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1975, revisado em 2000. Se houver dúvida se a pesquisa foi realizada em conformidade com a Declaração de Helsinki, os autores devem explicar a razão para sua abordagem e demonstrar que o corpo de revisão institucional aprovou explicitamente os aspectos duvidosos do estudo. Ao relatar experimentos com animais, os autores devem indicar se as orientações institucionais e nacionais para o cuidado e a utilização de animais de laboratório foram seguidas.

Financiamento e apoio

Os autores devem, também, informar se receberam financiamento ou apoio de instituições como CNPq, CAPES, Fundos Remanescentes da SBR, instituições universitárias, laboratórios etc.

Secretaria Editorial RBR

Revista Brasileira de Reumatologia
Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 2.466 - conj. 93-94
CEP: 01402-000 - São Paulo - SP – Brasil
Tel./fax: (11) 3289-7165
e-mail: rbreumatol@terra.com.br

ANEXO 3 – NORMAS REVISTA 02

Scandinavian Journal of Medicine & Science Sports

Instructions to Authors

Articles accepted for publication will be published in our e-only section - and not in print.

Manuscripts should be submitted at [ScholarOne Manuscripts](#). Instructions for using the system can be found on the site. Furthermore, an author guide is available in the “User Tutorials” area of the site if assistance is needed.

Manuscripts can be submitted as either “original” or “review”. In addition, book reviews, abstracts of sports medicine interest, and announcement of consensus statements or meeting reviews and other topics of interest can be submitted to the “sports medicine update” section.

The submission should include a letter stating that the manuscript contains original material only that has not previously been published, and is not currently under consideration elsewhere, nor will be submitted elsewhere until a final decision has been made by the journal.

Please note that we now accept .doc and .docx files.

Copyright

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 copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

[CTA Terms and Conditions](#)

Manuscript Preparation

When preparing manuscripts for submission, authors should follow the style of the journal:

1. Manuscripts should be divided into:

- Title page (including contact name and address including phone, fax and e-mail, and with a title not exceeding 120 characters and a running head of not more than 45 characters)
- Abstract (less than 250 words)
- Keywords (3–8 words other than those mentioned in title or abstract)

- Introduction - Materials and methods (including statement that informed consent and local ethics committee approval has been provided for human studies)
- Results, discussion, perspective and acknowledgements (if any)
- References*
- Tables, figure legends and figures - units should be SI and metric

2. It is mandatory that all manuscripts include a brief perspective paragraph at the end of the discussion in which the findings are put into perspective in the relevant area of sports medicine. This includes reference to possible previous articles in this and other journals and the potential impact of the present findings. This paragraph should not exceed 200 words.

3. As a general rule, no more than 40 references should be cited in a full text original article (120 in reviews). References*

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book:

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - [AMA Manual of Style](#)

4. Tables should be typed on separate sheets numbered with Arabic numerals, and have self-explanatory headings. Authors are strongly recommended to include illustrative figures in their manuscripts instead of large tables. The detailed tables themselves can instead be submitted as 'supporting information'.

5. Figures should have a title, be accompanied by a legend on a separate sheet and be self-explanatory.

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.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The

proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) [here](#).

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

The *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* is covered by Wiley-Blackwell's Early View Service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's **Author Services**. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit [Author Services](#) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

* We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for [here](#).

Supporting Information

Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports Online gives authors the opportunity to include data that would be inappropriate or impractical to include in the printed version. These data may substantially enhance the importance of the research and may also be of benefit to readers. Authors are encouraged to include data such as videos, 3-D structures/images, large tables and any other supporting data too large for print publication. All supporting information must be submitted as 'supplementary files for review' with the original manuscript via ScholarOne Manuscripts. 'Supporting Information' will be made available alongside the online version (only) of the published article. Please note that supporting information will not be copy-edited or typeset, but be made available online in exactly the form it is received and approved. Supporting

information guidelines including acceptable file formats and sizes are available [here](#).

Page Charges

Any article which exceeds 6 pages (in the final published version) will be charged. Excess pages, over and above 6 pages, must be paid for at a rate of GBP 125 per page. A page contains about 5,400 letters on average, space between words included (but not tables and figures).

Production Tracking

Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [Author Services](#) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Guidelines for cover submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, [please follow these general guidelines](#).