

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
(PPGCM)

MÁRCIA REIMOL DE ANDRADE

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA ESCADA EM DIFERENTES
INTENSIDADES NA PLACA DE CRESCIMENTO E NO MÚSCULO
SÓLEO DE RATOS JOVENS

SÃO JOÃO DEL-REI - MG

2022

MÁRCIA REIMOL DE ANDRADE

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA ESCADA EM DIFERENTES
INTENSIDADES NA PLACA DE CRESCIMENTO E NO MÚSCULO
SÓLEO DE RATOS JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais (PPGCM) da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Morfologia

Orientadora: Profa. Dra. Laila Cristina Moreira Damázio

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira

SÃO JOÃO DEL-REI - MG

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data 13/10/2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A554e Andrade, Marcia.
EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA ESCADA EM
DIFERENTES INTENSIDADES NA PLACA DE CRESCIMENTO E NO
MÚSCULO SÓLEO DE RATOS JOVENS / Marcia Andrade ;
orientadora Laila Cristina Moreira Damázio;
coorientador Alessandro de Oliveira. -- São João del
Rei, 2022.
68 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais) -- Universidade Federal de
São João del-Rei, 2022.

1. Placa de crescimento. 2. Exercício físico. 3.
Hipertrofia muscular. 4. Escalada. I. Moreira
Damázio, Laila Cristina , orient. II. de Oliveira,
Alessandro, co-orient. III. Título.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL - REI / UFSJ
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - M.Sc.

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

Aos 26 dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e dois, às 14h, pela plataforma RNP (<https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/laila-cristina-moreira-damazio>), foi instalada a banca examinadora de dissertação de mestrado da discente **Márcia Reimol de Andrade**. A banca examinadora foi composta pela professora Dra. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, (UFV), examinadora externa, pela professora Dra. Flávia Carmo Horta Pinto (UFSJ), examinadora interna, pelo professor Dr. Alessandro de Oliveira (UFSJ), coorientador, e pela professora Dra. Laila Cristina Moreira Damázio. A professora Dra. Laila Cristina Moreira Damázio, Presidente da Banca, fez a abertura dos trabalhos e, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou à candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada **“Efeitos do exercício físico na escada em diferentes intensidade na placa de crescimento e no músculo sóleo de ratos jovens”**, marcando um tempo de até sessenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, a Profa. Laila Cristina Moreira Damázio, presidente, passou a palavra à examinadora externa, Profa. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, para arguir a candidata, e, em seguida, à examinadora interna, Profa. Flávia Carmo Horta Pinto, e ao coorientador, Prof. Alessandro de Oliveira, para que fizessem o mesmo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o resultado da avaliação da banca, conforme as normas vigentes na Universidade Federal de São João del-Rei, foi: **APROVADA sem necessidade de alterações na dissertação**. A versão final da dissertação, deverá ser entregue ao programa no prazo de 90 (noventa) dias, a contar a partir da data da defesa, (Resolução Consu N° 062, de 07 de novembro de 2011, modificada pela Resolução CONSU N° 005, de 29 de fevereiro de 2016). A candidata não terá o título senão cumprir as exigências acima descritas.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO,
ADMINISTRAÇÃO E CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 26/07/2022

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 2/2022 - PPGCM (13.43)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 02/08/2022 16:01)

ALESSANDRO DE OLIVEIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

COEFI (12.45)

Matrícula: 2506557

(Assinado digitalmente em 02/08/2022 14:01)

FLAVIA CARMO HORTA PINTO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DCNAT (12.12)

Matrícula: 1742558

(Assinado digitalmente em 02/08/2022 19:10)

LAILA CRISTINA MOREIRA DAMAZIO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DEMED (12.23)

Matrícula: 1811013

(Assinado digitalmente em 02/08/2022 14:44)

IZABEL REGINA DOS SANTOS COSTA

MALDONADO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 039.031.438-20

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/> informando seu número: 2, ano: 2022, tipo: ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO, data de emissão: 02/08/2022 e o código de verificação: **ad0d586d**

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho a meus pais, Mário César Andrade e Celina Reimol de Andrade, e ao meu filho, Ricardo Emanuel Reimol de Andrade. Eles constituem o meu alicerce.

Uma dedicatória especial às famílias Reimol e Andrade, minha base de vida.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por tudo em minha vida, inclusive por ter colocado a orientadora Profa. Dra. Laila Cristina Moreira Damázio e o meu coorientador Prof. Dr. Alessandro de Oliveira em meu caminho. Muito obrigada pelo apoio e orientação cuidadosa nestes dois últimos anos. Certamente, eu não conseguiria concluir esta tarefa sem o incentivo pessoal e o conhecimento teórico de ambos.

Serei eternamente grata à Universidade Federal de São João del-Rei, aos professores do PPGCM, aos professores e colegas do curso de Saúde da Criança e do Adolescente, ao Prof. Paulo Henrique Almeida Campos Júnior pelo uso de seu laboratório e pelos ensinamentos, aos colegas de Mestrado Alisson Kennedy Rezende, Silvana Venâncio da Silva e Grazielle Mayra Moreira, aos discentes Luan Alves Pereira, Ismael Augusto Lima Santos e Maria Eduarda Paiva Campos, ao corpo técnico do Laboratório de Reabilitação do Departamento de Medicina, à Nathália Nascimento Vasconcelos, aos funcionários do Campus Dom Bosco, em especial àqueles que trabalham no prédio da Medicina, às secretárias da Pediatria da Santa Casa da Misericórdia de São João del-Rei Andrea Coelho, Fernanda Resende, Ariane Zanetti e Taciane Ferreira, à secretária Maria Elisabeth de Serpa e Sousa, à equipe interdisciplinar da UTI Neonatal-Neonatologia e da Enfermaria de Pediatria e a minha dedicada e atenta funcionária, Sandra Juliana.

EPÍGRAFE

“Nossa visão não é saúde para alguns. Não é saúde para a maioria. É saúde para todos: ricos e pobres, capazes e deficientes, velhos e jovens, urbanos e rurais, cidadãos e refugiados. Todos, em todos os lugares.”

Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus - Diretor-Geral da OMS

RESUMO

Introdução: A prática de exercício físico auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade, sendo tal hábito estimulado desde a infância, inclusive em atividades competitivas. Sendo assim, entende-se a importância da investigação dos efeitos de tais exercícios físicos em diferentes intensidades (média e alta) na fase de crescimento. Para tanto, foi realizada uma investigação experimental com modelo animal jovem utilizando-se um protocolo de treino de força na escada, identificando seus benefícios e prejuízos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de um protocolo de treino resistivo na escada e com carga progressiva, em diferentes intensidades, na placa de crescimento e nas fibras do músculo sóleo em ratos jovens. **Metodologia:** A escalada foi realizada com peso ajustado na cauda de 24 ratos Wistar jovens, divididos em três grupos contendo 8 animais: controle, treino de média intensidade e treino de alta intensidade. As características de interesse para a placa de crescimento foram a área de contagem de células, o número de células por zona e a sua espessura. No músculo sóleo, foi realizado o cálculo da área e do número das fibras musculares. As colorações utilizadas foram a Hematoxilina-Eosina (HE) e o tricrômico de Gomori. **Análise estatística:** O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a distribuição normal dos dados, antes da análise pela ANOVA de única via com pós-teste de Tukey, considerando um nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** Foram identificadas uma diminuição da espessura média da placa de crescimento e um aumento da área das fibras musculares esqueléticas do músculo sóleo nos grupos treinados, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). A placa de crescimento apresentou menor espessura e celularidade nos grupos de treino físico, evidenciando efeitos diferentes do exercício físico resistivo com carga progressiva na placa de crescimento e no músculo sóleo. **Conclusão:** Conclui-se que a hipertrofia do tecido muscular e a diminuição da espessura da placa de crescimento, após um protocolo de treino resistivo com carga progressiva em ratos jovens, evidencia a necessidade de uma investigação mais aprofundada em relação às consequências para o crescimento de jovens submetidos precocemente a treinos de alta intensidade.

Palavras-chave: Escalada. Placa de crescimento. Hipertrofia muscular. Exercício físico.

Área: Morfologia.

ABSTRACT

Introduction: The practice of physical exercise contributes to the prevention of cardiovascular diseases, diabetes, and obesity, and this habit is encouraged since childhood, including competitive activities. Thus, the importance of investigating the effects of such physical exercises at different intensities (medium and high) during the growth phase is evident. Therefore, we proposed an experimental investigation with a young animal model using a ladder-based strength training protocol, identifying its benefits and disadvantages. **Objective:** To evaluate the effects of a ladder-based resistance training protocol with progressive load at different intensities on the growth plate and soleus muscle fibers of young rats. **Methodology:** Climbing was performed with adjusted weight on the tail of 24 young Wistar rats, which were divided into three groups containing 8 animals: control, medium-intensity training, and high-intensity training. The characteristics of interest for the growth plate were the cell count area, the number of cells per zone, and growth plate thickness. As for the soleus muscle, the area and number of muscle fibers were calculated. The staining techniques used were Hematoxylin-Eosin (HE) and Gomori's trichrome. **Statistical analysis:** The Shapiro-Wilk test was applied to assess the normal distribution of data prior to one-way ANOVA with Tukey's post-test, considering a significance level of $p < 0.05$. **Results:** A decrease in the mean thickness of the growth plate and an increase in the area of the skeletal muscle fibers of the soleus muscle were identified in the trained groups compared to the control group ($p < 0.05$). The growth plate showed less thickness and cellularity in the trained groups, evidencing different effects of resistive exercise with progressive load on the growth plate and the soleus muscle. **Conclusion:** It can be concluded that the hypertrophy of muscle tissue and the decreased thickness of the growth plate after this progressive load resistance training protocol in young rats evidences the need for further investigation regarding the consequences on the growth of young people precociously submitted to high-intensity training.

Keywords: Climbing. Growth plate. Muscle hypertrophy. Physical exercise.

Area: Morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Imagem tomográfica de osso esponjoso e osso compacto nos grupos controle (não treinados) e exercitado (exercício hipertrófico). **Fonte:** Nebot *et al.* (2017). 24
- Figura 2.** Desenho esquemático da zona de crescimento com as cinco áreas discriminadas. 1- “Área de Reserva” - cartilagem hialina; 2- “Área Proliferativa” - condrócitos; 3- “Área hipertrófica” - redução da matriz extracelular e aumento do volume dos condrócitos, que começam a entrar em apoptose. 4- “Área de calcificação” - mineralização da matriz e término do apoptose dos condrócitos; 5- “Área de Ossificação” - capilares sanguíneos e células osteoprogenitoras provenientes do periósteo penetram nas áreas anteriormente ocupadas pelos condrócitos, que sofreram apoptose. **Fonte:** Salhotra *et al.* (2020). 25
- Figura 3.** Desenho esquemático da região anatômica de interesse (placa de crescimento) e corte sagital da tíbia e do fêmur direito de um rato Wistar jovem dispostos em lâmina corada com Hematoxilina e Eosina. (A)- Fêmur direito do rato Wistar; (B)- Tíbia direita do rato Wistar. As setas mostram a região anatômica da placa de crescimento entre a Epífise (E) e a Diáfise (D). **Fonte:** Autora. 28
- Figura 4.** Desenho esquemático indicando os fatores metabólicos envolvidos na hipertrofia muscular. IGF1- Fator de crescimento similar à Insulina tipo 1; GH- Hormônio do Crescimento. **Fonte:** Autora. 30
- Figura 5.** Representação esquemática dos grupos experimentais R1, R2 e RC. Treinamento físico 5 vezes por semana durante 4 semanas. **Fonte:** Autora. 35
- Figura 6.** Animais no aparato de treinamento físico da escada vertical com livre acesso. Grupo RC. **Fonte:** Autora. 36
- Figura 7.** Animal com peso na cauda durante o protocolo de treinamento físico de alta intensidade – Grupo R1. **Fonte:** Autora. 37
- Figura 8.** Animal do protocolo de treinamento de exercícios físicos de média intensidade – Grupo R2. **Fonte:** Autora. 38
- Figura 9.** (A) Monitor multiparâmetro com dados da saturação de O₂ (SatO₂) e Frequência Cardíaca (FC). (B) Medição na cauda do animal na câmara de alojamento da escada vertical. **Fonte:** Autora. 38
- Figura 10.** Protocolo de exercícios físicos de escalada com peso na cauda (a e b). **Fonte:** Autora. 39

- Figura 11.** Imagens mostrando a remoção da articulação entre os ossos do fêmur e da tíbia e o músculo sóleo. (a) Tíbia e fíbula; (b) Fêmur; (c) Dissecção do músculo sóleo; (d) Corte. **Fonte:** Autora. 40
- Figura 12.** Desenho esquemático mostrando as características morfológicas dos condrócitos em cada região da PC (a, b, c). Placa epifisária no aumento de 10X. Coloração HE utilizada para contagem de células e tricrômico de Gomori para espessura (d). Barra de escala- 50µm. **Fonte:** Autora. 42
- Figura 13.** PC no aumento de 10X (barra de escala 50 µm) pela coloração do tricrômico de Gomori. Coloração utilizada para medir a espessura total e das zonas da PC. **Fonte:** Autora. 43
- Figura 14.** Corte transversal do músculo sóleo em aumento de 10X, barra 50 µm. (a) Corte transversal em coloração de HE. (b) Grade para contagem das fibras musculares. **Fonte:** Autora. 43
- Figura 15.** Secção transversal do tecido muscular esquelético do músculo sóleo no aumento de 40X em coloração de HE. **Fonte:** Autora. 44
- Figura 16.** Média de contagem de células nas regiões da PC. (A) Média de células na zona de repouso entre os grupos – RC, R1 e R2; (B) Média de células na zona proliferativa entre os grupos – RC, R1 e R2; (C) Média de células na zona hipertrófica entre os grupos – RC, R1 e R2. ANOVA, pós-teste de Tukey, nível de significância $p < 0,05$. **Fonte:** Autora. 47
- Figura 17.** Lâmina da placa de crescimento de um animal do grupo R2 (treinamento de média intensidade), mostrando a região de análise da área da PC demarcada na imagem da lâmina (linha azul). Imagem capturada utilizando o *software* ImageJ. Aumento: 10X. Barra: 100µm. **Fonte:** Autora. 48
- Figura 18.** Médias das áreas da PC entre os grupos. RC- Grupo controle. R1- Grupo de treinamento de alta intensidade. R2- Grupo de treinamento de média intensidade. Análise estatística ANOVA, pós-teste de Tukey. Significância $p < 0,05$. **Fonte:** Autora. 48
- Figura 19.** Fotomicrografias de lâminas, mostrando a espessura total da PC entre os grupos. (A) RC- Grupo controle; R1- Grupo de treinamento de alta intensidade; R2- Grupo de treinamento de média intensidade. (B) Gráfico de colunas. ANOVA, pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0,05$. **Fonte:** Autora. 50
- Figura 20.** Média da espessura da PC nas zonas proliferativa e hipertrófica/calcificação. (A) Média entre os grupos na zona proliferativa. (B) Média entre os grupos na zona

hipertrófica/calcificação. ANOVA, pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0,05$.

Fonte: Autora.

50

Figura 21. Fotomicrografias das PCs coradas com tricrômico de Gomori entre os animais de cada grupo. Na coluna vertical à esquerda estão nomeadas as imagens dos animais de 1 a 8, e na coluna horizontal superior, os grupos dos animais (RC, R1 e R2). Barra de escala para aumento de 10X. **Fonte:** Autora.

52

Figura 22. (A) Fotomicrografias utilizando a ferramenta “grid” do *software* ImageJ para contagem de células, representando os três grupos (RC, R1 e R2). Barra de escala no aumento de 10X. RC- controle. R1- treino de alta intensidade. R2- treino de média intensidade. (B) Gráfico de colunas com análise por ANOVA e pós-teste de Tukey, IC95%. Não houve diferença significativa na análise estatística para as comparações entre os grupos controle e de treinos físicos de alta e de média intensidade ($p > 0,05$). **Fonte:**

Autora.

54

Figura 23. Médias das áreas das fibras musculares do músculo sóleo entre os grupos. (A) Fotomicrografias das fibras musculares do sóleo dos grupos RC, R1 e R2. (B) Médias das áreas das fibras dos grupos. ANOVA, $p < 0,05$, pós-teste de Tukey. Aumento: 40X. Barra: 100 μ m. **Fonte:** Autora.

55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatística descritiva do ganho ponderal de cada grupo.	45
Tabela 2. Contagens de células na PC.	46
Tabela 3. Análise da espessura da PC por grupo.	49
Tabela 4. Estatística descritiva da contagem de células do músculo sóleo.	53

LISTA DE SIGLAS

AF- Atividade física

EF- Exercício físico

PC- Placa de Crescimento

So- Músculo Sóleo

OMS- Organização Mundial de Saúde

WHO- *World Health Organization*

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

mTOR- proteína alvo mecanístico da proteína quinase rapamicina

ATP- Adenosina Trifosfato

SBP- Sociedade Brasileira de Pediatria

RC- Grupo controle

R1- Grupo de treino de alta intensidade

R2- Grupo de treino de média intensidade

HE- Hematoxilina e Eosina

FC- Frequência cardíaca

VO₂- Consumo de Oxigênio

SatO₂- Saturação de Oxigênio

GP- Ganho Ponderal

ANOVA- Análise de Variância

CID-11- Classificação Internacional de Doenças-11

TRACP- Fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b (TRACP-5b) – 5b é a isoforma de TRACP produzida por osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea.

IGF1- Fator de Crescimento similar à Insulina tipo 1

GH- Hormônio do Crescimento

FC- Frequência Cardíaca

PA- Pressão Arterial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Atividade física e exercício físico: definições, benefícios à saúde e aspectos do crescimento	21
2.2 Aspectos histobiológicos da PC: caracterização e particularidades em roedores	24
2.3 Fibras musculares: caracterização e particularidades em roedores	28
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Amostra	33
4.2 Protocolo de treinamento físico	34
4.3 Processamento do material biológico e histomorfometria	40
4.3.1 Metodologia de análise da placa de crescimento	41
4.3.1.1 Contagem de células	41
4.3.1.2 Espessura da placa de crescimento	42
4.3.2 Metodologia para histomorfometria do tecido muscular do músculo sóleo	43
4.4 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Análise do peso corporal	45
5.2 Análise da placa de crescimento	45
5.2.1 Contagem de células na placa de crescimento	45
5.2.2 Análise da área da placa de crescimento	48
5.2.3 Coloração da placa de crescimento com tricrômico de Gomori	49
5.2.3.1 Espessura da placa de crescimento	49
5.2.3.2 Análise qualitativa da placa de crescimento	51
5.3 Análise do tecido muscular esquelético	52

5.3.1 Contagem de fibras do músculo sóleo	53
5.3.2 Áreas das fibras musculares	54
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

Há várias décadas, o exercício físico (EF) tem sido uma das formas de movimento corporal mais estudadas em diversas áreas da ciência (BRASIL, 2021; WHO, 2018). Tal esforço tem demonstrado que a prática de tais movimentos e a consequente modificação do comportamento do ser humano (ativo) podem promover a manutenção, prevenção e melhora no estado clínico e corporal destes indivíduos.

Todavia, tais evidências científicas não omitem os cuidados que devem ser considerados para a realização de tais movimentos, sendo que elementos como faixa etária, sexo, nível de condicionamento físico e estado clínico sugerem cada vez mais a necessidade da prescrição de EFs cada vez mais individualizados.

Além disso, dois fatores capazes de determinar importantes variações no EF (volume e intensidade) são insistentemente colocados à prova, tanto em estudos da área da Saúde quanto da área Biológica, visando não apenas aperfeiçoar o treinamento para o alcance de melhor performance, mas principalmente observar os limites que podem significar a melhora ou declínio do bem-estar do indivíduo.

Desta forma, a necessidade de estudos com o objetivo de analisar os efeitos dos EFs com maiores intensidades e/ou volumes poderia resultar ao ser humano situações de risco à sua saúde, inviabilizando sua participação. Sendo assim, o uso de modelos animais para obter tais compreensões, bem como a possibilidade da análise histológica das regiões anatômicas de interesse, faz-se necessário. A escolha do modelo animal jovem remete à idade da infância e da adolescência, em humanos.

O uso de tais modelos, principalmente roedores, propiciou e ainda propicia notórios avanços na compreensão da fisiologia corporal, principalmente quanto às formas de obtenção de energia para a realização de tais atividades, bem como o entendimento quanto à importância do oxigênio no sistema metabólico e a possibilidade de realização de atividades e/ou exercícios físicos sem a participação deste elemento (TÓTH *et al.*, 2022).

Além da compreensão metabólica, outros sistemas corporais (*e.g.*, cardiovascular, respiratório, neuromuscular) tiveram nos modelos animais a premissa do entendimento quanto ao comportamento de suas principais variáveis durante EFs com menor ou maior volume e intensidade.

Apesar do volume ou duração do EF ser um importante fator dentro da prescrição de EFs, nenhum outro fator é tão estudado quanto a intensidade. Segundo Kenney, Willmore e Costill (2020), a intensidade do exercício está diretamente relacionada ao tipo de

metabolismo e substrato a ser utilizado na atividade. Isto significa que EFs onde a demanda de oxigênio para a produção de energia é equivalente ou deficiente ao seu consumo (metabolismo aeróbio e anaeróbio) podem determinar o quão duradouro pode ser ou não aquela atividade e quais os possíveis resíduos metabólicos resultantes de tal esforço.

A preocupação em analisar o músculo sóleo e a placa de crescimento de ratos jovens submetidos ao treino físico em diferentes intensidades baseia-se no fato de que os jovens têm entrado em atividades esportivas competitivas cada vez mais precocemente, inclusive, com a finalidade de alcançar resultados em competições ou torneios (MILISTETD, 2014). A faixa etária pediátrica e hebiátrica consiste em um importante fator de análise para a prescrição de EF, sendo mais evidente nas etapas de desenvolvimento, crescimento e maturação corporal. Ao analisar o crescimento e desenvolvimento dos seres humanos em geral, a Organização Mundial da Saúde (OMS, do inglês *World Health Organization* - WHO, 2022) definiu como crianças os indivíduos com idade até 10 anos, e adolescentes como indivíduos entre 10 e 19 anos.

Dentre as diversas alterações orgânicas resultantes do desenvolvimento, pode-se destacar o sistema ósseo e muscular. Quanto aos ossos, o crescimento total longitudinal está relacionado à completa ossificação da PC, que, em geral, ocorre ao final da adolescência (BARROS, 2015). No entanto, o pico da velocidade de crescimento está associado ao sexo, sendo mais tardio em homens (em torno dos 14 anos de idade), e regride até os 18 anos, com o fechamento da PC (KENNEY, WILMORE, COSTIL, 2020).

Já em roedores, o tempo de vida é mais curto, sendo a transição da infância para a adolescência evidenciada em poucas semanas de vida (ANDREOLLO *et al.*, 2012). A fase de puberdade é considerada a segunda fase da vida de um roedor, e a idade média em que os ratos atingem a maturidade situa-se em torno dos 50 dias de vida (LONG e EVANS, 1920, *apud* SENGUPTA, 2013). Sendo assim, o presente estudo definiu a idade dos ratos Wistar jovens, entre 28 e 55 dias de vida, como correspondendo ao final da fase de adolescência.

Aprofundar os conhecimentos sobre o efeito do EF na faixa etária pediátrica e hebiátrica é de grande importância para a saúde do ser humano. Segundo a OMS, a prática de atividades e/ou exercícios físicos está associada à prevenção de distúrbios alimentares, bem como de doenças do tipo crônico não-degenerativas (CADENAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2016; ROSIQUE-ESTEBAN *et al.*, 2017). Além disso, seguindo a mesma tendência de crescimento observada em adultos, segundo a OMS, de 1975 a 2016, a prevalência de

sobrepeso/obesidade em crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos aumentou de 4% para 18% em todo o mundo (WHO, 2021).

No entanto, é necessário entender tal prática no contexto da faixa etária devido à possibilidade de interferência de tal atividade no crescimento e no desenvolvimento de lesões, como fraturas e osteocondrite (ALVES e LIMA, 2008). Cabe ainda ressaltar que a realização de EF, principalmente de alta intensidade, deve ser orientada por um profissional habilitado devido a possíveis interferências no crescimento e desenvolvimento (ALVES e LIMA, 2008).

Barros (2015) discorreu sobre a necessidade de adequar o EF na adolescência, alertando para o excesso de treinos e, inclusive, para a morte súbita no esporte. Para o mesmo autor, o ideal, neste caso, seria a manutenção da prática de atividade física, evitando o sedentarismo e a obesidade. Neste sentido, buscando uma normatização em torno do tema, a OMS e o Ministério da Saúde publicaram guias baseados em evidências com o objetivo de nortear políticas públicas incentivadoras de uma vida mais saudável por meio da atividade física regular (WHO, 2018; BRASIL, 2021). Além disso, recentemente, o Ministério da Saúde da República Federativa do Brasil publicou a primeira diretriz nacional para a prática de atividades físicas (BRASIL, 2021).

Em estudos experimentais com roedores, tais efeitos foram demonstrados por Huang *et al.* (2008), que investigaram os efeitos da corrida de forma contínua e intermitente em esteira de resistência. Ao comparar os resultados, os autores concluíram que houve benefícios nas propriedades do biomaterial do tecido ósseo com a prática do exercício físico, porém, sem ter apresentado um aumento expressivo na densidade mineral óssea. Em paralelo, os autores evidenciaram um maior ganho de peso no grupo controle em relação aos dois grupos de treino em esteira. No entanto, não foi considerada a intensidade do exercício e sua relativização quanto ao condicionamento do modelo experimental.

O presente trabalho abordou o exercício físico de alta e média intensidade, de forma experimental, em uma população jovem representada por um modelo animal. O tema central compreende a análise histológica da Placa de Crescimento (PC) da tíbia e do músculo sóleo (So) de ratos jovens exercitados sob um protocolo de exercício físico de alta e média intensidade. A caracterização do tempo de vida da amostra é importante, a fim de cumprir o objetivo principal desta pesquisa que foi de investigar o efeito do treinamento físico de alta intensidade na PC da tíbia de ratos jovens em comparação ao de média intensidade e um grupo controle.

Estudar os efeitos dos exercícios físicos de alta e média intensidade sobre o sistema musculoesquelético em seres humanos traz consigo uma limitação ética, restringindo-se à possibilidade de análise por meio de exames de imagem, como a tomografia computadorizada. Nesse contexto, justifica-se o uso de um modelo animal para estudo experimental, o que possibilita a análise histológica das regiões anatômicas de interesse.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Atividade física e exercício físico: definições, benefícios à saúde e aspectos do crescimento

Para a melhor compreensão dos temas a serem abordados, torna-se necessário o devido entendimento dos conceitos que fazem parte do presente estudo. As definições dos termos atividade física (AF) e exercício físico (EF) são diferentes. A movimentação corporal que envolve o sistema musculoesquelético e apresenta gasto energético é denominada de AF. No entanto, a mesma, quando planejada, estruturada e repetitiva, com o objetivo de aprimorar a aptidão física, é denominada de EF (CASPERSEN, POWELL, CHRISTENSON, 1985). Este tema é de grande importância clínico-epidemiológica, já que a inatividade física tem associação com maior risco de doenças crônicas não-transmissíveis, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer de mama e de cólon, além de uma menor expectativa de vida (LEE *et al.*, 2012).

Os EFs podem ser categorizados como submáximos, máximos e supra-máximos em relação ao condicionamento físico do indivíduo (KENNEY, WILMORE, COSTILL, 2020). Na sua grande maioria, os EFs são realizados abaixo da capacidade máxima de aptidão física, sendo classificados como EFs submáximos de leve, moderada e alta intensidade (POWERS e HOWLEY, 2014). No geral, sob o ponto de vista metabólico, tal classificação está atrelada à maior (EF submáximo de leve intensidade), moderada (EF submáximo de moderada intensidade) ou menor (EF submáximo de alta intensidade) predominância do oxigênio como mediador na produção de energia (KENNEY, WILMORE, COSTILL, 2020).

De acordo como o Ministério da Saúde, no “Guia de Atividade Física para a População Brasileira” (BRASIL, 2021), o EF pode ser classificado quanto à intensidade, da seguinte forma:

“Leve: exige mínimo esforço físico e causa pequeno aumento da respiração e dos batimentos do seu coração. Numa escala de 0 a 10, a percepção de esforço é de 1 a 4. Você vai conseguir respirar tranquilamente e conversar normalmente enquanto se movimenta ou até mesmo cantar uma música.

Moderada: exige mais esforço físico, faz você respirar mais rápido que o normal e aumenta moderadamente os batimentos do seu coração. Numa escala de 0 a 10, a percepção de esforço é de 5 e 6. Você vai conseguir conversar com dificuldade enquanto se movimenta e não vai conseguir cantar.

Vigorosa: exige um grande esforço físico, faz você respirar muito mais rápido que o normal e aumenta muito os batimentos do seu coração. Numa escala de 0 a 10, a percepção de esforço é de 7 e 8. Você não vai conseguir nem conversar enquanto se movimenta” (BRASIL, 2021).

Segundo Nikolić, Jovanović e Stanković (2020), os exercícios físicos também podem ser classificados em diferentes intensidades de acordo com o equivalente metabólico, que pode ser expresso em minutos por semana (MET-min/sem). Neste trabalho, os autores aplicaram um questionário validado (Physical Activity Questionnaire - IPAQ) em 401 adolescentes saudáveis da Sérvia, encontrando uma maior prevalência de atividade física abaixo do adequado em meninos do que em meninas. Por outro lado, os maiores níveis de EF de alta intensidade foram predominantes em meninos, com uma média de 949,7 MET-min/sem *versus* 347,9 MET-min/sem em meninas (NIKOLIĆ, JOVANOVIĆ, STANKOVIĆ, 2020).

Apesar de requerer um esforço muito significativo, a prática de EF de alta intensidade, inclusive a corrida, está associada a uma menor mortalidade por doenças cardiovasculares a longo prazo (ISHIDA *et al.*, 2013; GUTHOLD *et al.*, 2018; PEDISIC *et al.*, 2020). No entanto, tal prática pode causar danos a indivíduos com Hipertensão Arterial prévia devido ao aumento acentuado da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA) (ISHIDA *et al.*, 2013). Além disso, apesar dos benefícios, a prática de EF de alta intensidade pode estar associada à maior incidência de lesões musculoesqueléticas, inclusive na região da placa de crescimento, o que justifica os cuidados com crianças e adolescentes praticantes de esportes durante a fase de pico do crescimento (ALVES e LIMA, 2008).

Em um estudo de revisão, Alves e Alves (2019) realizaram uma busca sistematizada utilizando os termos “exercício físico” ou “atividade física” e “crescimento pondero-estatural” ou “dos tecidos ósseos” ou “dos tecidos musculares”. Os autores ressaltaram a importância da prática física desde a gravidez, salientando que a chance deste hábito perdurar na fase adulta é maior quando a prática física regular começa no início da vida. Nesta mesma revisão bibliográfica, não houve uma conclusão de que os exercícios físicos de alta intensidade e com maior impacto, como a ginástica olímpica, pudessem retardar o crescimento quando comparados ao basquete, por exemplo. Acredita-se que ocorreu um viés de seleção nas amostras dos estudos selecionados para a revisão por parte de quem procura uma ou outra modalidade esportiva, pois características físicas diferentes se adequam a diferentes tipos de esporte. Os autores concluíram que havia poucos estudos clínicos randomizados, sem indícios de que o exercício físico tenha sido prejudicial ao crescimento linear das crianças, mas os benefícios aos tecidos ósseos e musculares foram mantidos ao longo da vida (ALVES e ALVES, 2019).

Roesler (1987) destacou a evolução do conhecimento sobre o tecido ósseo desde o século XIX e ainda investigou a estrutura interna dos ossos em resposta à adaptação funcional. Inicialmente, havia um entendimento de que o osso era um material que possuía características mecânicas. Atualmente, vem sendo discutida com mais clareza pela comunidade científica as adaptações do organismo, particularmente do tecido musculoesquelético, em relação à prática de EF, bem como sua duração e intensidade, além dos impactos sobre o desenvolvimento motor nos indivíduos (ALVES e LIMA, 2008).

Um exemplo mais recente foi descrito no estudo de Vickerton *et al.* (2014), que estudaram a histomorfologia dos ossos e músculos com estimulação elétrica repetitiva no nervo peroneal de ratos jovens. Os autores observaram hipertrofia muscular no membro estimulado, em comparação ao membro contralateral não estimulado. Neste sentido, o estudo sobre os efeitos do exercício físico nos diversos sistemas corporais, dentre eles o ósseo e o muscular, tem sido alvo de vários estudos ao longo dos anos. Ainda no século XX, Wolff *et al.* (1992) postularam que os ossos se adaptam aos estímulos mecânicos, o que continua sendo aceito até os dias atuais (MEAKIN, PRICE, LANYON, 2014; VICKERTON *et al.*, 2014; PORTIER, BENAITREAU, PALLU, 2020).

O exercício físico pode ser apresentado de formas diferentes e tem sido estudado experimentalmente, tanto em protocolos de treino aeróbico (HAMANN *et al.*, 2012) quanto em treino resistivo (RODRIGUES, BORIN, SILVA, 2017). No estudo de Hamann *et al.* (2012), foram comparados dois tipos de corrida em esteira, nivelada e com declive. O objetivo dos pesquisadores foi de investigar os efeitos deste tipo de exercício físico no tecido ósseo de fêmeas Sprague-Dawley em crescimento, divididas em 3 grupos (Corrida em declive, Corrida nivelada e Controle). As análises realizadas nas metáfises e diáfises do fêmur esquerdo demonstraram uma maior densidade mineral no osso trabecular nas fêmeas que realizaram a corrida em declive (Média \pm Desvio Padrão) quando comparadas aos grupos sedentário (Média \pm DP) e de corrida nivelada (Média \pm DP) (HAMANN *et al.*, 2012). Como modelo de treino físico de força, Rodrigues, Borin e Silva (2017) evidenciaram um ganho de massa muscular em ratos submetidos a um treino resistivo com carga progressiva durante escalada com carga acoplada à cauda.

O efeito do exercício físico na massa óssea também foi evidenciado por Nebot *et al.* (2017), que analisaram os efeitos do exercício de hipertrofia na densidade e no conteúdo mineral ósseo. Neste caso, o protocolo de treinamento utilizado foi o da corrida com sobrecarga posicionada na pata do modelo experimental em dias alternados (3 a 4x/sem) e

velocidade de 35 cm/seg ou 21 m/min. Foram analisados o comprimento e a densidade mineral do fêmur, além de medidas bioquímicas de *turnover* ósseo (osteocalcina, precursores de colágeno tipo 1, TRACP-5b) e a dosagem de testosterona, sendo identificado um efeito positivo do EF sobre o osso esponjoso, mantendo-se a espessura da área cortical (Figura 1); o hipogonadismo foi associado a um baixo *turnover* ósseo; houve diminuição do comprimento do fêmur e aumento da densidade óssea no grupo treinado; hipogonadismo foi constatado no grupo treinado por meio da diminuição dos níveis de testosterona. Postulou-se então que o treinamento físico levou a uma diminuição do comprimento do animal por fechamento precoce da zona de crescimento (NEBOT *et al.*, 2017).

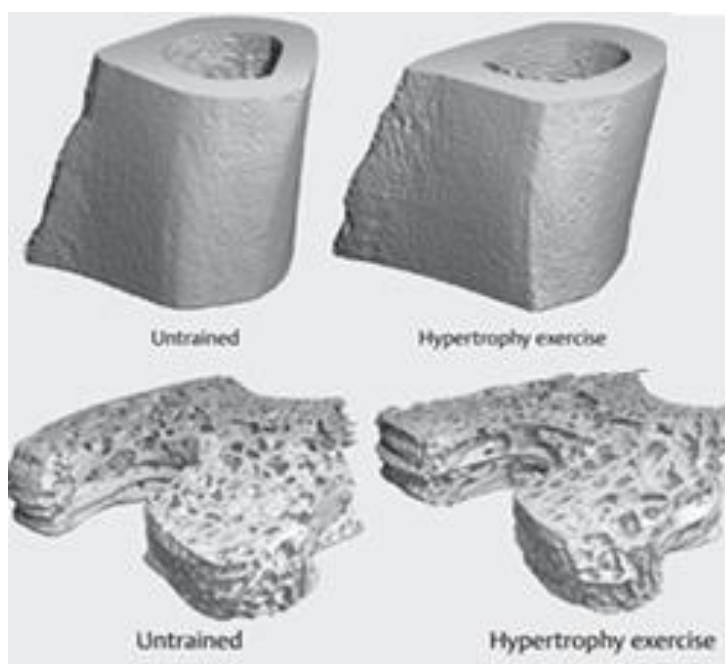


Figura 1. Imagem tomográfica de osso esponjoso e osso compacto nos grupos controle (não treinados) e exercitado (exercício hipertrófico). **Fonte:** Nebot *et al.* (2017).

2.2 Aspectos histobiológicos da PC: caracterização e particularidades em roedores

A placa de crescimento (PC) localiza-se entre a epífise e a metáfise de ossos longos e é constituída por uma matriz cartilaginosa que sofre um processo de ossificação do tipo endocondral, finalizando o processo de crescimento longitudinal do indivíduo. O centro primário de ossificação ocorre na diáfise, enquanto o centro secundário, nas epífises (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Esta região cartilaginosa se divide em três regiões distintas com alto grau de regulação espacial (MACKIE *et al.*, 2008). As células mesenquimais se diferenciam em condrócitos na matriz cartilaginosa, que servirá de base

para o futuro osso. As células passam por um processo coordenado de diferenciação, que é complexo, multifatorial e com inúmeras vias de sinalização (HALLETT, ONO, ONO, 2019). Os condrócitos proliferam, tornam-se pré-hipertróficos e sofrem apoptose. A cartilagem calcificada é então invadida por vasos sanguíneos que trazem osteoblastos e osteoclastos, e assim se forma o osso.

As áreas crescentes dos ossos constituem a fise e a epífise. A PC ou fise situa-se entre a epífise e a metáfise dos ossos longos. As lesões agudas ou crônicas na região do crescimento, como as que ocorrem durante a prática de AF ou EF, podem interferir no crescimento normal das crianças (CAINE, DiFIORI, MAFFULLI, 2006; YANAGUIZAWA *et al.*, 2008). De acordo com Salhotra *et al.* (2020), existem cinco regiões na área da zona de crescimento: de repouso, de proliferação, hipertrófica, matriz calcificada e de ossificação (Figura 2).

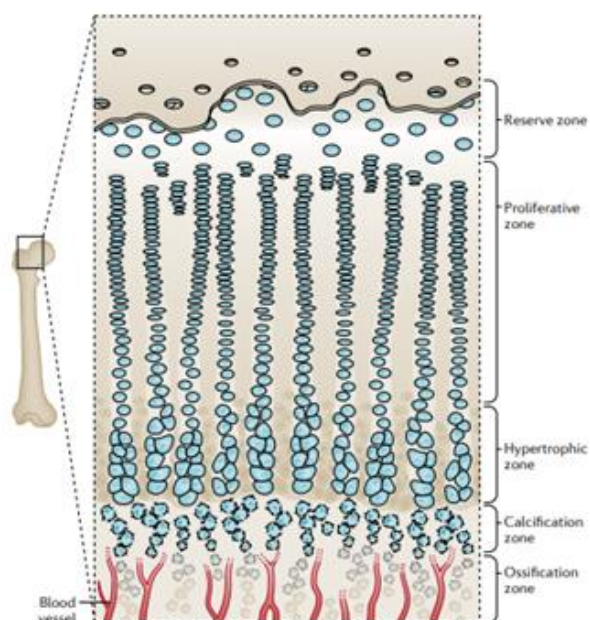


Figura 2. Desenho esquemático da zona de crescimento com as cinco áreas discriminadas. 1- “Área de Reserva” - cartilagem hialina; 2- “Área Proliferativa” - condrócitos; 3- “Área hipertrófica” - redução da matriz extracelular e aumento do volume dos condrócitos, que começam a entrar em apoptose. 4- “Área de calcificação” - mineralização da matriz e término do apoptose dos condrócitos; 5- “Área de Ossificação” - capilares sanguíneos e células osteoprogenitoras provenientes do periósteo penetram nas áreas anteriormente ocupadas pelos condrócitos, que sofreram apoptose. **Fonte:** Salhotra *et al.* (2020).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2008) e Montanari (2013), existem zonas com características teciduais importantes na PC:

- **Zona de repouso:** é a área de cartilagem hialina localizada no topo da PC subjacente ao centro de ossificação secundário, cuja composição não celular é de fibrilas de colágeno tipo 2 e macromoléculas proteoglicanas. O colágeno tipo 2 tem índice de refração similar a uma substância amorfa, não sendo detectado com métodos colorimétricos habituais. Nas preparações em Hematoxilina e Eosina (HE), a coloração ocorre principalmente devido aos glicosaminoglicanos sulfatados das proteoglicanas. A Zona de Repouso localiza-se mais distante do centro de ossificação primário e ajuda a manter a integridade da placa de crescimento, particularmente pela expressão da proteína relacionada ao hormônio da paratireoide (PTHrP). A partir da divisão celular, a zona de proliferação é formada. Os condrócitos desta região funcionam como células-tronco musculoesqueléticas, orientando espacialmente a diferenciação dos condrócitos colunares da zona de proliferação (MACKIE *et al.* 2008; HALLETT, ONO, ONO, 2019).

- **Zona seriada ou de proliferação:** os condrócitos se dividem rapidamente, organizando-se em colunas, contribuindo para o alongamento ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Uma zona intermediária, denominada de Zona Pré-hipertrófica, situa-se entre a zona proliferativa e a zona hipertrófica.

- **Zona hipertrófica:** os condrócitos desta região são volumosos e possuem depósitos citoplasmáticos de glicogênio e lipídeos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Um dos membros da família de proteínas *Hedgehog* (Ihh) é expresso por condrócitos pré-hipertróficos, fazendo um *feedback* negativo com PTHrP, iniciando o processo de hipertrofia (HALLETT, ONO, ONO, 2019).

- **Zona de cartilagem calcificada:** os condrócitos terminam seu processo de morte celular por apoptose e a matriz entra em processo de mineralização (SALHOTRA *et al.*, 2020).

- **Zona de ossificação:** as células osteoprogenitoras trazidas pelo sistema vascular provenientes do periósteo invadem e ocupam as lacunas deixadas pelos condrócitos que sofreram apoptose, dando origem aos osteoblastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; SALHOTRA *et al.*, 2020).

As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, que participam do processo de mineralização da matriz extracelular e da formação dos osteócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; CAWLEY *et al.*, 2020). Da mesma forma que os músculos, os processos de osteogênese e de reabsorção óssea têm mecanismos sinalizadores

distintos que se autorregulam. A densidade mineral óssea depende do equilíbrio entre a expressão gênica do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANKL) e da Osteoprotegerina (OPG), um receptor de citocina da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral codificada pelo gene TNFRSF11b (CAWLEY *et al.*, 2020; GUERRERO *et al.*, 2020). Os osteoclastos desempenham um papel fundamental na reabsorção óssea, cujo processo de diferenciação é induzido pelo RANKL, que é produzido por várias células, entre elas os osteoblastos (SUDA *et al.*, 1999). A OPG, por sua vez, é produzida por osteoblastos maduros e inibe a capacidade do RANKL em estimular a diferenciação celular dos osteoclastos.

Em um trabalho que estudou o efeito do ultrassom terapêutico sobre o crescimento longitudinal da tíbia e do fêmur de ratos com idade entre 4 e 13 semanas de vida, Barreto *et al.* (2011) observaram que a PC dos ratos permaneceu até a fase adulta, diferente do que ocorre em humanos. Apesar de tal permanência, ocorre uma desaceleração do crescimento longitudinal acarretando menor espessura na fase idosa da vida do roedor (BARRETO *et al.*, 2011). Esta característica da PC em roedores também foi relatada por Roach *et al.* (2003), que realizaram uma análise temporal do crescimento de dois grupos de ratos comparando as zonas de crescimento da tíbia e do fêmur. Durante a fase de crescimento (juventude), a altura da zona hipertrófica foi a que mais refletiu a taxa de crescimento ósseo. Na fase de desaceleração, o que mais chamou a atenção dos autores foi a perda de condrócitos em associação à menor altura da região da PC. O grupo conseguiu descrever quatro principais características dessa área no grupo de ratos idosos em comparação ao grupo de ratos jovens. Foram observadas extensas áreas de acelularidade, formação de uma faixa óssea paralela à borda metafisária, extensa área de remodelação e formação óssea e formação óssea direta (ROACH *et al.*, 2003).

O crescimento longitudinal depende de vários fatores que podem interferir na PC, como o Hormônio do Crescimento, o Hormônio Tireoidiano, o IGF1 e os glicocorticoides (SIEBLER *et al.*, 2001). Sabe-se que o IGF1 se liga a receptores de condrócitos que estão na zona proliferativa (SIEBLER *et al.*, 2001; ROACH *et al.*, 2003). Para esse trabalho, a contribuição do estudo de Roach *et al.* (2003) foi a análise histológica de cada área da PC ao longo do tempo, observando-se as características habituais esperadas em relação à idade do animal. A região anatômica de interesse, a placa de crescimento, está representada na Figura 3.

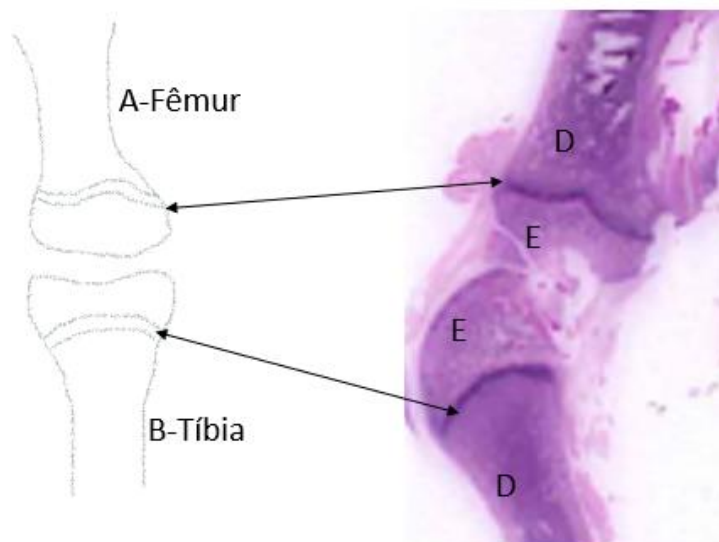


Figura 3. Desenho esquemático da região anatômica de interesse (placa de crescimento) e corte sagital da tíbia e do fêmur direito de um rato Wistar jovem dispostos em lâmina corada com Hematoxilina e Eosina. (A)- Fêmur direito do rato Wistar; (B)- Tíbia direita do rato Wistar. As setas mostram a região anatômica da placa de crescimento entre a Epífise (E) e a Diáfise (D). **Fonte:** Autora.

A PC se modifica com o processo de envelhecimento, como já foi descrito anteriormente, mas o papel do exercício físico no seu processo de fechamento e na altura final precisa ser mais bem compreendido. Em trabalhos de revisão que abordaram exercícios físicos e a estatura final de atletas, os resultados foram inconclusivos em afirmar que a estatura final foi afetada diretamente pelos treinos de alta intensidade (ALVES e LIMA, 2008; ALVES e ALVES, 2019). Neste estudo, esperou-se descrever os aspectos histológicos em associação com o exercício físico em diferentes intensidades, tanto na celularidade quanto na espessura da PC de ratos jovens exercitados. Estes resultados poderão contribuir para o entendimento do que ocorre na PC, em vigência de exercício físico de alta e média intensidade.

2.3 Fibras musculares: caracterização e particularidades em roedores

Por se tratar de uma pesquisa na área de atividade física, as fibras musculares de interesse são as estriadas esqueléticas. O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas alongadas e multinucleadas, com filamentos denominados miofibrilas. Os miofilamentos de actina e miosina dispõem-se longitudinalmente, de forma simétrica e paralela. Esses filamentos ficam presos à membrana plasmática por intermédio de proteínas que têm afinidade pelos microfilamentos. As fibras nervosas aferentes e eferentes se conectam a fibras musculares intrafusais por meio de sinapses. As contrações musculares

esqueléticas são fortes, rápidas, voluntárias e descontínuas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Todo o processo de contração e hipertrofia muscular tem uma base molecular. O alvo mecanístico da proteína quinase rapamicina (mTOR) responde a sinais intra e extracelulares. Esta molécula é uma proteína serina/treonina quinase que compõe dois complexos distintos, denominados de complexo mTOR 1 (mTORC1) e complexo mTOR 2 (mTORC2) (CONDON e SABATINI, 2019). O estímulo mecânico, tanto por treino de força quanto por estimulação elétrica, desencadeia um processo de sinalização celular via mTORC1 (complexo 1 da rapamicina), que é um regulador do crescimento celular, fazendo a regulação da tradução pelo mRNA (YAMADA, PERTILLE, BUENO JUNIOR, 2017). Sabe-se que os níveis de leucina se elevam na célula após o treinamento físico. Essa disponibilidade intracelular de aminoácidos parece exercer um estímulo ativador de mTORC1 após um treinamento de força, que é independente de IGF1 (JEWELL, RUSSELL, GUAN, 2013; YAMADA, PERTILLE, BUENO JUNIOR, 2017).

Em última análise, a mecanotransdução pode ocorrer após um treinamento de força, estimulando a síntese proteica. Logo, o crescimento celular pode justificar a hipertrofia. De acordo com Fernández-Lázaro *et al.* (2019), todo o processo de hipertrofia muscular é resultado de uma confluência de processos. O acúmulo de lactato durante a prática de exercício físico, a alteração do pH intracelular, do fosfato e de cálcio e a hipóxia funcionam como fatores estimuladores, sendo denominados pelos autores de mecanismos hipertróficos (Figura 4). O aumento da concentração de testosterona também é um fator favorecedor da hipertrofia muscular, sendo importante para experimentos com modelos animais machos. Isolado na década de 1930 (SBP, 2021), esse hormônio tem receptores de membrana em várias células do corpo, inclusive nas fibras musculares esqueléticas.

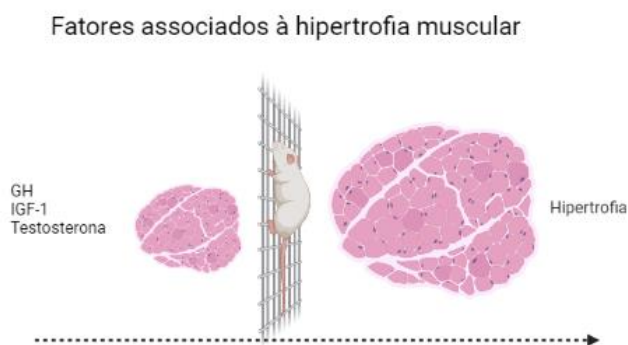


Figura 4. Desenho esquemático indicando os fatores metabólicos envolvidos na hipertrofia muscular. IGF1- Fator de crescimento similar à Insulina tipo 1; GH- Hormônio do Crescimento. **Fonte:** Autora.

Existem diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas, que são diferenciadas pela cor, pelo metabolismo, pelo limiar de fadiga e pela fisiologia (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; MINAMOTO, 2005; MONTANARI, 2013):

- Fibra muscular do tipo 1- A contração é lenta, dependente do metabolismo oxidativo e resistente à fadiga. Células ricas em mioglobina e mitocôndrias. A presença da mioglobina justifica a coloração mais avermelhada do que a fibra do tipo 2.
- Fibra muscular do tipo 2 - A contração é rápida, metabolismo dependente da glicólise anaeróbia e menos resistente à fadiga. Há menos mioglobina e mitocôndrias em comparação às fibras do tipo 1. Pode ser subdividida em 2A, 2B e 2C; a fibra de contração mais rápida é a 2B.

Os músculos esqueléticos têm fibras do tipo 1 e 2, mas há predomínio de cada tipo nos diferentes tipos musculares. Neste estudo, o músculo estudado é o músculo sóleo, cujo predomínio é de fibras do tipo 1, cuja contração é mais lenta e tem metabolismo predominantemente oxidativo (MINAMOTO, 2005). Para que ocorra a contração muscular, há uma demanda energética que depende principalmente de Adenosina Trifosfato (ATP) e fosfocreatina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Em um protocolo de treinamento aquático aeróbico e de força com ratos jovens, observou-se um aumento das fibras musculares do músculo sóleo em comparação ao grupo não treinado (SPAGNOL *et al.*, 2012). Também foi evidenciado no estudo de Ozaki *et al.* (2018) que o músculo sóleo e o extensor longo dos dedos apresentaram hipertrofia das fibras musculares em comparação com o grupo controle não treinado. Neste estudo, os animais foram exercitados por 4 semanas com treinamento aeróbico de resistência.

Ao investigar os efeitos de diferentes níveis de estímulos mecânicos na mineralização dos ossos longos e no desempenho muscular, Liu, Gao e Gong (2019) realizaram um estudo experimental com ratos machos adultos. O treino físico em questão consistiu em corrida em esteira com três grupos em velocidades diferentes: 12, 16 e 20 m/min. Os autores relataram que a microestrutura e a densidade mineral do osso trabecular e cortical foram significativamente aumentadas no grupo de animais que exercitou com menor velocidade (12 m/min). Outro resultado relevante foi o maior peso do músculo sóleo nos grupos treinados na esteira em comparação ao grupo controle não treinado. No entanto, foi mais significativo na menor velocidade, de 12 m/min.

Como já descrito, o EF estimula a contração muscular, permitindo a hipertrofia do músculo exercitado. No entanto, a contração muscular pode acontecer sem o exercício físico, como demonstrou Vickerton *et al.* (2014). Os pesquisadores realizaram um experimento em ratos jovens com estimulação elétrica na pata traseira, unilateralmente. O objetivo foi determinar se a estimulação neuromuscular elétrica teria efeito na morfologia e na biomecânica do osso do membro estimulado. O implante do eletrodo ocorreu por via peritoneal. A pata contralateral não estimulada do animal funcionou como grupo controle. As descargas elétricas desencadearam contração muscular com frequência e intensidade controladas. No final do experimento, os ratos foram eutanasiados para análise histológica das fibras musculares, comparando o músculo da pata estimulada com o músculo da pata não estimulada (controle). As fibras musculares do membro estimulado eram hipertrofiadas quando comparadas ao grupo controle.

Diante da elevação dos níveis de aminoácidos intracelulares, ocorre estímulo à síntese proteica. Como consequência, tem-se a hipertrofia da fibra muscular, fato observado nos trabalhos de Vickerton *et al.* (2014) e Ozaki *et al.* (2018).

Na presente pesquisa, esperou-se detectar hipertrofia nos grupos de animais treinados, comparando-se os resultados com o grupo controle de animais não exercitados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos de um protocolo de treinamento físico resistivo com carga progressiva na escada, em diferentes intensidades, no músculo sóleo e na placa de crescimento de ratos jovens.

3.2 Objetivos específicos

Investigar o ganho de peso entre os grupos de treino físico resistivo com carga progressiva em comparação ao grupo controle não treinado;

Investigar os efeitos de um protocolo de treinamento físico resistivo na escada e com carga progressiva, de média e de alta intensidade, no músculo sóleo de ratos jovens;

Investigar os efeitos de um protocolo de treinamento físico resistivo na escada e com carga progressiva, de média e de alta intensidade, na placa de crescimento de ratos jovens.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

O experimento contou com vinte e quatro ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), com 21 dias de vida, provenientes do Biotério Experimental do Campus Dom Bosco da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). A linhagem Wistar foi criada no início do século XX no estado da Filadélfia (EUA) em 1909 (ANDREOLLO *et al.*, 2012), tornando-se muito comum entre os pesquisadores da área biomédica, assim como os ratos Sprague-Dawley. Esses animais estão entre os roedores mais utilizados em estudos experimentais por apresentarem baixo custo de manejo e manutenção e por serem considerados animais dóceis, de fácil manipulação e com boa capacidade de aprendizado. Além disso, o rato Wistar é um mamífero que apresenta características fisiológicas muito semelhantes aos do ser humano, proporcionando resultados similares àqueles que poderiam ser obtidos em humanos. As fêmeas desses ratos têm maturidade sexual precoce e ciclos reprodutivos irregulares (SENGUPTA, 2013). Assim, a maior utilização de animais machos é devido à menor influência hormonal sobre os resultados, podendo justificar a preferência pelos machos na maioria dos estudos (SENGUPTA, 2013).

No biotério de experimentação do Laboratório de Reabilitação do Campus Dom Bosco, os animais foram pesados e mantidos em gaiolas (110 cm x 90 cm), respeitando o número máximo de 4 animais por unidade de alocação. As fontes de alimento e água estavam acessíveis nas gaiolas. O ambiente tinha exaustor de ar e temperatura controlada com ar-condicionado, entre 21°C e 22°C, e umidade relativa do ar entre 60 e 70%. Os animais foram mantidos em ciclo invertido de claro/escuro de 12h (COUTO, 2002).

No primeiro dia, todos os animais foram pesados e iniciou-se o período adaptativo. Após 1 semana, com 28 dias de vida, deu-se início aos protocolos de treinamento físico. Conforme evidenciado na Figura 1, o início dos treinamentos físicos ocorreu com os ratos ainda na infância, chegando à adolescência.

O cálculo amostral foi baseado no desvio padrão, no nível de significância (usualmente entre 0,05 e 0,01) e no poder de prova (usualmente entre 80% e 90%), sendo estatisticamente definido como 8 ratos por grupo (DAMY *et al.*, 2010).

Os animais foram divididos em 3 grupos (um sedentário e dois treinados) contendo 8 ratos cada, totalizando 24 animais:

Grupo RC- controle não treinado.

Grupo R1- protocolo de treinamento físico de alta intensidade.

Grupo R2- protocolo de treinamento físico de média intensidade.

Os animais foram pesados diariamente no início do dia, de segunda a sexta-feira, até o dia da eutanásia. Ao final dos experimentos, o ganho de peso ponderal de cada animal foi calculado para comparação entre os três grupos (RC, R1 e R2).

Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras e as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e do Código Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética Envolvendo o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São João del-Rei e aprovado sob Protocolo nº 3943140321.

4.2 Protocolo de treinamento físico

A metodologia deste estudo utilizou um modelo animal com características fisiológicas similares aos dos seres humanos, a fim de cumprir um protocolo de treino resistivo com aumento progressivo. Tal modelo já foi aplicado em roedores com idade cronológica mais avançada. A carga acoplada à cauda do animal aumentou progressivamente, durante o tempo de treino (RODRIGUES, BORIN, SILVA, 2017). Os benefícios do exercício físico resistivo para a saúde humana são bem estabelecidos, com aumento da taxa metabólica basal e da massa muscular (AL-SARRAF e MOUIHAT, 2022), modulando a homeostase do músculo esquelético, com aumento da síntese proteica e, conseqüentemente, hipertrofia muscular e aumento de força e de resistência (ZANCHI *et al.*, 2010).

O programa de exercícios físicos foi aplicado em um período de 4 semanas em uma escada vertical, com peso na cauda, durante 60 minutos por dia. Os animais foram pesados antes e depois do término do protocolo, diariamente. Ao manusear os animais na escada vertical e colocar os pesos nas caudas, é comum que ocorra estresse nos animais. O manuseio deles foi o mais técnico possível, a fim de garantir o menor estresse aos animais. De acordo com Andrade, Pinto e Oliveira (2002), o melhor método para medir o estresse dos animais é através de métodos não-invasivos.

Dessa forma, os seguintes métodos não-invasivos foram utilizados:

- Análise do comportamento do animal – se está agressivo, emitindo sons, com expressão facial de dor.

- Análise fisiológica do animal – se a respiração do animal está alterada e se o batimento cardíaco está acelerado.

O aparato de peso na cauda do animal foi colocado cuidadosamente com micropore (Nexcare™) de forma que protegeu a pele da cauda do animal (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002; RIVERA, 2002b).

A representação esquemática dos procedimentos experimentais está representada na Figura 5.

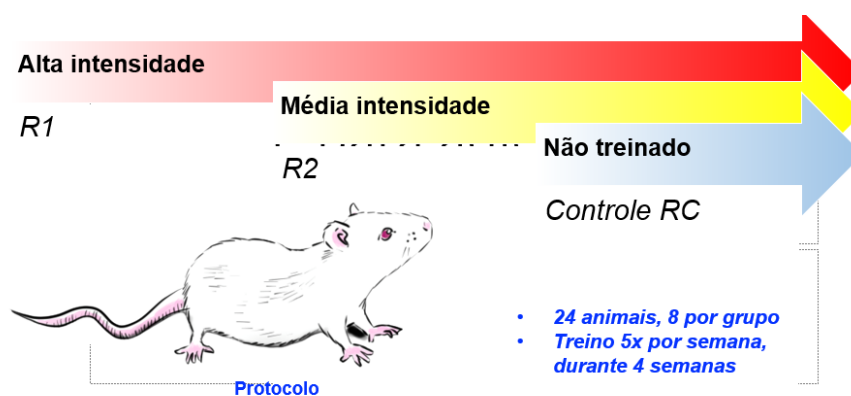


Figura 5. Representação esquemática dos grupos experimentais R1, R2 e RC. Treinamento físico 5 vezes por semana durante 4 semanas. **Fonte:** Autora.

Grupo RC - Grupo controle não treinado (n=8) - acesso livre à escada, sem utilização de carga ou de treinamento físico (Figura 6).



Figura 6. Animais no aparato de treinamento físico da escada vertical com livre acesso. Grupo RC. **Fonte:** Autora.

Grupo R1 - Programa de exercícios físicos de alta intensidade (n=8) – foram realizadas 8 séries de escaladas (subidas) com 8 a 12 movimentos repetidos em cada série para chegar na câmara de alojamento. Já no primeiro dia de treinamento, os animais foram submetidos a cargas progressivas, onde as duas primeiras escaladas foram realizadas com uma carga equivalente a 50% do peso corporal total do animal; na terceira e quarta escalada, foi utilizado 75% do peso corporal; na quinta e sexta, 90% do peso corporal e nas duas últimas escaladas, 100% do peso total do animal. Nesse tipo de treinamento, a Frequência Cardíaca Máxima (FC_{máx.}) dos animais foi aferida para confirmar que o treinamento demandou 80-95% da FC_{máx.}, como demonstrado nas Figuras 7 e 9.



Figura 7. Animal com peso na cauda durante o protocolo de treinamento físico de alta intensidade – Grupo R1. **Fonte:** Autora.

Grupo R2 - Programa de exercícios físicos de média intensidade (n=8) - escalada com 8 a 12 movimentos repetidos em cada série para chegar na câmara de alojamento. Na primeira semana, foi utilizado 50% do peso corporal total do animal; na segunda semana, carga de 75%; na terceira semana, 90% e na quarta semana, 100%. O intervalo entre as séries foi de 60 segundos para que o animal pudesse descansar na câmara de alojamento. Neste treinamento, a FC_{máx.} dos animais foi aferida diariamente para confirmação de que o exercício demandou 60-70% da FC_{máx.}, como demonstrado nas Figuras 8 e 9.



Figura 8. Animal do protocolo de treinamento de exercícios físicos de média intensidade – Grupo R2. **Fonte:** Autora.

A mensuração da Frequência Cardíaca (FC) foi realizada por meio de um monitor multiparâmetro (LHVMed), de forma não invasiva (Figura 9A e 9B).

A



B



Figura 9. (A) Monitor multiparâmetro com dados da saturação de O₂ (SatO₂) e Frequência Cardíaca (FC). (B) Medição na cauda do animal na câmara de alojamento da escada vertical. **Fonte:** Autora.

O protocolo de treinamento físico para ganho de força muscular foi modificado de acordo com o estudo de Peixinho-Pena *et al.* (2012). Os níveis de intensidade de cada

protocolo de treinamento foram baseados nos altos níveis de intensidade descritos na literatura, que correspondem a 80% da VO_2 máx. e $FC_{máx}$. (LANA, PAULINO, GONÇALVES, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2018). O protocolo de treinamento físico utilizado neste estudo correspondeu ao consumo energético descrito por Peixinho-Pena *et al.* (2012) e Cassilhas *et al.* (2013), como demonstrado na Figura 10.

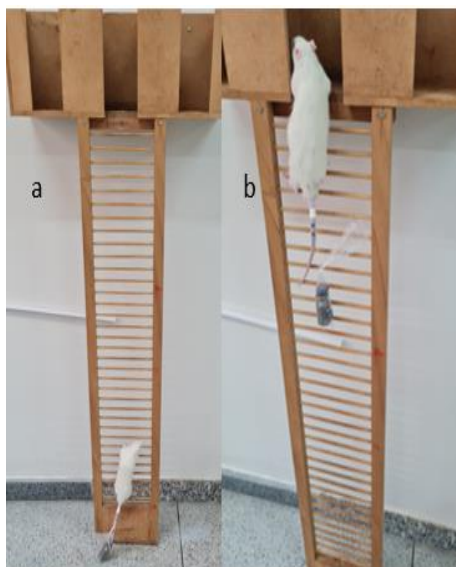


Figura 10. Protocolo de exercícios físicos de escalada com peso na cauda (a e b). **Fonte:** Autora.

Após o término do programa de treinamento físico, os animais foram eutanasiados. As Diretrizes das Práticas de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018) recomendam o uso de anestésicos inalatórios, via vapor ou algodão embebido em agentes voláteis, como o Isoflurano (RIVERA, 2002a). Os roedores foram colocados em um recipiente fechado contendo o algodão embebido com o anestésico (Isoflurano 100%), mas não em contato direto, para que ele fosse apenas exposto ao vapor e não ocorresse irritação da mucosa. A morte dos animais foi constatada por parada cardiorrespiratória, ausência de reflexos e queda da temperatura corporal.

Ao fim da eutanásia, realizou-se a remoção dos membros inferiores. Para a análise do material biológico do tecido musculoesquelético, houve separação cuidadosa entre os ossos e os músculos dos membros. As áreas de interesse foram a zona de crescimento, a placa do osso da tíbia e as fibras musculares do músculo sóleo (Figura 11).

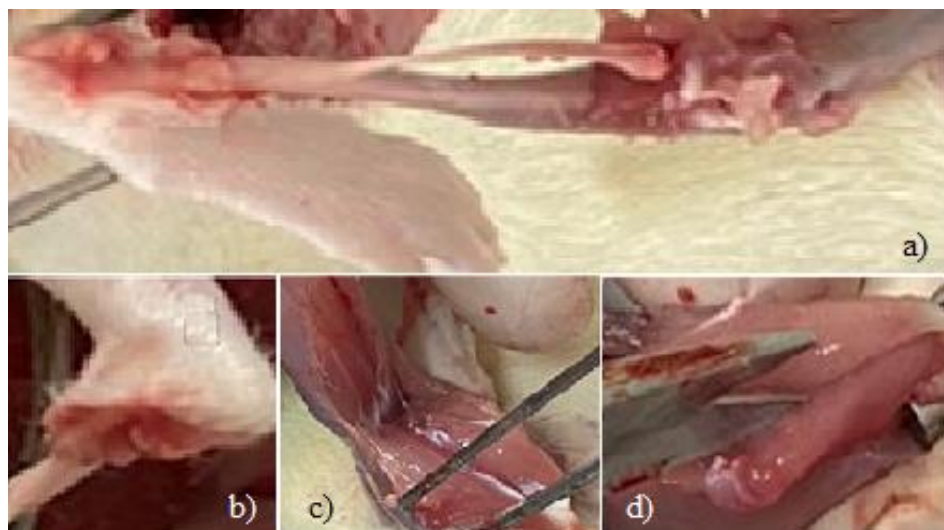


Figura 11. Imagens mostrando a remoção da articulação entre os ossos do fêmur e da tíbia e o músculo sóleo. (a) Tíbia e fíbula; (b) Fêmur; (c) Dissecação do músculo sóleo; (d) Corte. **Fonte:** Autora.

4.3 Processamento do material biológico e histomorfometria

Após a coleta do material biológico, o mesmo foi armazenado em solução de formaldeído tamponado a 10% por 24 horas, assim interrompendo o metabolismo celular e preservando as estruturas para receberem os próximos tratamentos. Os fixadores interagem com os grupos de aminos e proteínas por meio de pontes de hidrogênio. Em seguida, foram transferidos para álcool 70%.

A peça óssea recebeu tratamento descalcificante com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por 48 horas antes do processamento histológico. Para a desidratação, foram utilizadas baterias de soluções alcoólicas em concentrações crescentes até o álcool absoluto. Este processo lento e gradual é importante para manter a desidratação homogênea. Todas as estruturas seguiram os processos de desidratação com álcool (70%, 95% e 100%) e diafanização em Xilol (1 e 2). O uso do Xilol é importante para retirar todo o álcool, pois este não é compatível com a parafina, já que ambos não formam uma mistura homogênea (SANTOS *et al.*, 2021). Subsequentemente, as amostras de tecido foram incluídas em parafina, formando um bloco endurecido com o tecido em seu interior. Em seguida, procedeu-se à microtomia para obtenção das secções e alocação em lâminas de vidro. A retirada da parafina foi realizada através da imersão dos cortes em Xilol para posterior realização da coloração. Foram realizadas secções de 5 μm de espessura nas lâminas histológicas para coloração utilizando a Hematoxilina e Eosina (HE) para corar a zona de crescimento e as fibras musculares. A coloração de tricrômico de Gomori também foi utilizada na placa de crescimento para evidenciar as áreas ricas em colágeno.

O processo de coloração com HE começa com a desparafinação (Xilol 1 e 2) da secção da lâmina histológica, seguida da hidratação (álcool 100%, 95% e 70%), coloração em Hematoxilina, lavagem em água corrente, coloração em Eosina, lavagem em água corrente, desidratação (álcool 100%, 95% e 70%) e fixação (Xilol 1 e 2) (Centro Especializado em Histotecnologia, Belo Horizonte, MG).

O processo de coloração com o tricrômico de Gomori evidencia a presença de colágeno em uma cor azul-esverdeada. Esta proteína é um dos principais constituintes da matriz óssea (Figura 10). Para a coloração, as seguintes etapas foram realizadas: desparafinação e hidratação; lavagem das lâminas com água destilada por 1 minuto; imersão na solução tricrômica por 15-20 minutos; imersão em solução acidificada por 2 minutos; lavagem em água destilada; desidratação e clarificação e montagem das lâminas (WOEHL e WOEHL, 2016). Esta coloração foi realizada no Centro Especializado em Histotecnologia, Belo Horizonte, MG.

Utilizou-se um microscópio óptico com objetivas em 3 aumentos: 4X, 10X e 40X. Após localizar as áreas de interesse, em cada aumento, foram realizadas as fotomicrografias. Para a análise histomorfométrica das lâminas, as imagens foram fotografadas utilizando uma câmera fotográfica digital MOTIC (modelo MOTICAM 580, 5.0 MP), que foi adaptada a um microscópio óptico (Primo Star). Este sistema foi conectado a um sistema computacional, possibilitando assim o armazenamento das fotos em uma pasta de trabalho. Posteriormente, as lâminas foram analisadas com o *software* ImageJ-Pro Plus, versão 4.5 para Windows (SCHNEIDER, RASBAND, ELICIERI, 2012), que permitiu a contagem das fibras musculares no corte transversal do músculo sóleo (μm^2), de osteócitos e condrócitos e a determinação da espessura das zonas de crescimento em todos os grupos de animais.

4.3.1 Metodologia de análise da placa de crescimento.

Na região da placa de crescimento (PC), foram realizados os seguintes procedimentos, no aumento de 10X: contagem de células e aferição da espessura total e das zonas da PC.

4.3.1.1 Contagem de células

A contagem das células foi realizada nas zonas de repouso, de proliferação e hipertrófica/calcificação em uma série de 100 carreiras de células seriadas, de forma similar

ao método de contagem publicado por Mustafy *et al.* (2019), como demonstrado na Figura 12.

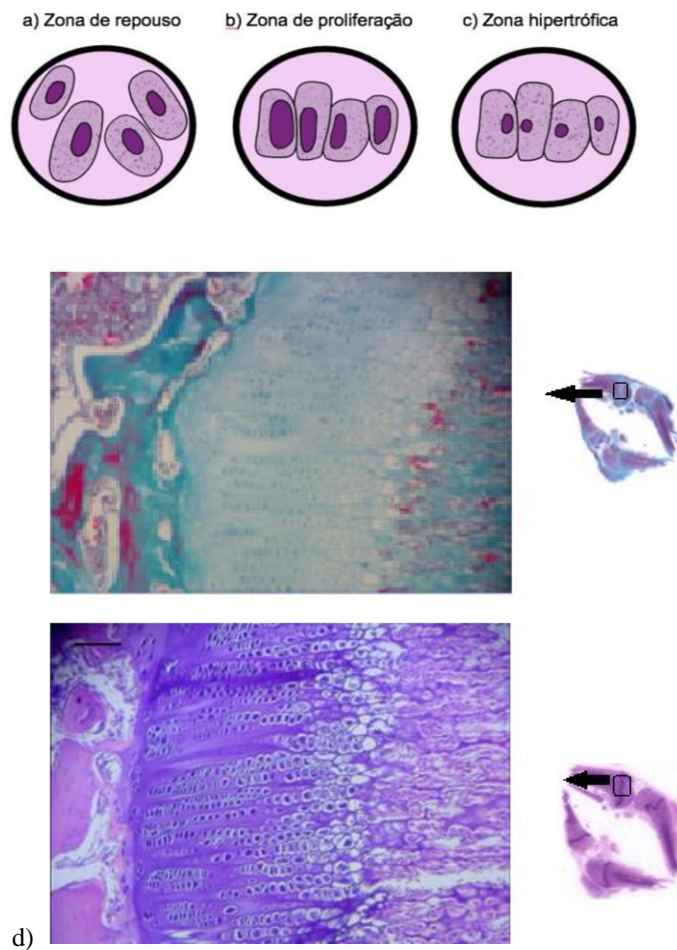


Figura 12. Desenho esquemático mostrando as características morfológicas dos condrócitos em cada região da PC (a, b, c). Placa epifisária no aumento de 10X. Coloração HE utilizada para contagem de células e tricrômico de Gomori para espessura (d). Barra de escala- 50 μ m. **Fonte:** Autora.

4.3.1.2 Espessura da placa de crescimento

A avaliação de espessura foi realizada em três lâminas, no aumento de 10X, nos três grupos do estudo: uma no centro e duas nas extremidades. Este método foi utilizado tanto para a espessura total quanto para as zonas proliferativa e hipertrófica/calcificação. A Figura 13 exemplifica a forma de avaliação, com a ferramenta “measure” do *software* ImageJ, em coloração pelo tricrômico de Gomori.

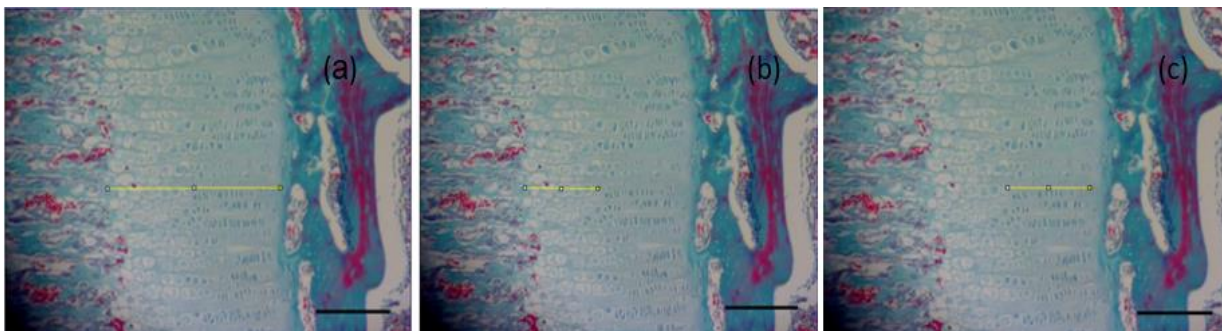


Figura 13. PC no aumento de 10X (barra de escala 50 μm) pela coloração do tricrômico de Gomori. Coloração utilizada para medir a espessura total e das zonas da PC. **Fonte:** Autora.

4.3.2 Metodologia para histomorfometria do tecido muscular do músculo sóleo

A coloração de HE foi utilizada para corar as fibras musculares do músculo sóleo direito em corte transversal, como no estudo de Malanotte *et al.* (2017). Após a seleção da área de estudo no aumento de 40X, a lâmina foi fotografada no aumento de 100X. Em seguida, cinco campos foram selecionados para fotografia no aumento de 40X. A contagem das células ocorreu no aumento de 10X em corte transversal (Figura 13), e a avaliação da área das fibras musculares foi no aumento de 40X (Figura 14). As células e as áreas foram somadas para cálculo da média por animal em cada grupo. Utilizou-se o *software* ImageJ e a ferramenta “grid”, onde as células foram contadas nas áreas de intersecção das linhas (Figura 14 e 15).

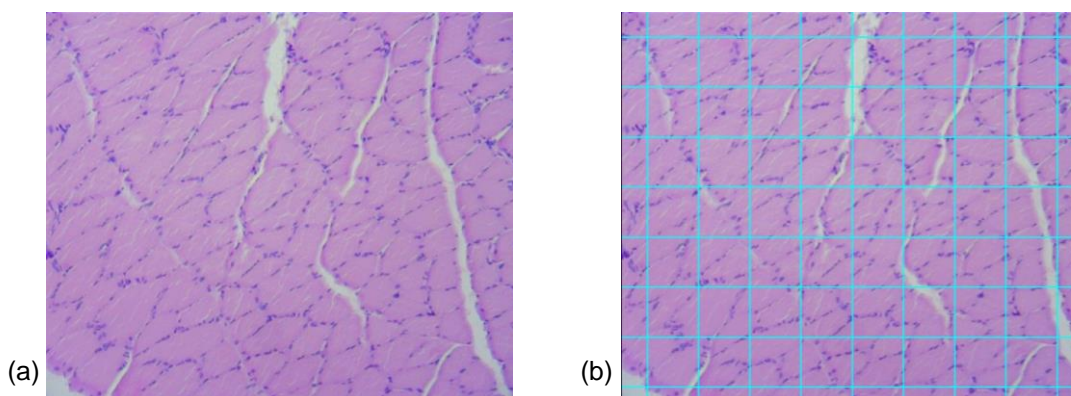


Figura 14. Corte transversal do músculo sóleo em aumento de 10X, barra 50 μm . (a) Corte transversal em coloração de HE. (b) Grade para contagem das fibras musculares. **Fonte:** Autora.



Figura 15. Secção transversal do tecido muscular esquelético do músculo sóleo no aumento de 40X em coloração de HE. **Fonte:** Autora.

4.4 Análise estatística

Para comparar os resultados histomorfométricos entre os três grupos, foi empregada a análise de variância (ANOVA). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média, e o nível de significância foi de 5%. Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 9.0.

A normalidade e a homogeneidade de variância dos dados foram avaliadas por meio do teste de Shapiro-Wilk, que é adequado para amostras pequenas, com n entre 4 e 30 (MIOT, 2017). Em seguida, certificando-se de que os pressupostos para os testes paramétricos não foram corrompidos, aplicou-se a análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA) e o pós-teste de Tukey (OLIVEIRA FILHO, 2015) para comparações múltiplas entre os grupos RC, R1 e R2.

5 RESULTADOS

5.1 Análise do peso corporal

Os animais foram pesados diariamente até a eutanásia. Esta pesagem foi importante para os cálculos das cargas para os treinamentos. Assim, foi possível calcular a média de ganho ponderal dos animais de cada grupo: RC, R1 e R2. Os dados demonstraram uma média de ganho de peso igual a 217 g no grupo RC, 212,3 g no grupo R1 e 211,3 g no grupo R2. A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva do ganho ponderal de cada grupo.

Resultados / Grupos	RC	R1	R2
Mínimo	188 g	190 g	192 g
Máximo	238 g	246 g	230g
Média	217g	212g	211g
Desvio Padrão	20,37	17,97	13,48

Fonte: Autora.

5.2 Análise da placa de crescimento

A PC foi analisada a partir da coloração do material com HE e tricrômico de Gomori. As lâminas com a coloração em HE foram utilizadas para as contagens das células e da área. A coloração pelo Gomori, por sua vez, evidenciou de forma mais clara a área de calcificação pela presença mais abundante de colágeno em comparação à matriz cartilaginosa. A aferição da espessura também foi realizada nesta coloração.

5.2.1 Contagem de células na placa de crescimento

As células foram contadas por zona da região da PC: Repouso, Proliferativa e Hipertrófica-Calcificação. Cada constituinte da amostra teve três fotografias no aumento de 100X para alcançar o número de 100 fileiras de células, como descrito no estudo de Mustafy *et al.* (2019). Após a contagem das células por zona, foi possível comparar as médias de células entre os três grupos. O grupo R1, que correspondeu ao protocolo de treino físico de

alta intensidade, teve as menores médias de contagem de células nas três zonas da PC: 154,5 na Zona de Repouso - ZR (DP 40,32); 821,4 na Zona Proliferativa - ZP (DP 131,9) e 181,4 na Zona Hipertrófica - ZH (DP 28,99). A estatística descritiva para média, mediana e DP está detalhada na Tabela 2.

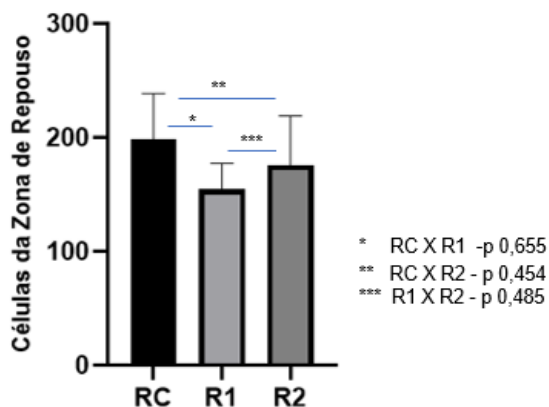
Tabela 2. Contagens de células na PC.

Grupos / Resultados	Média	Mediana	DP
<i>Grupo RC</i>	198,3	206,5	40,32
	937,1	909,5	153,3
	194,3	193	33,94
<i>Grupo R1</i>	154,5	157,5	22,93
	821,4	819,5	131,9
	181,4	177	28,99
<i>Grupo R2</i>	175,9	166	43,33
	953,3	845,5	384,5
	199,3	196	28,46

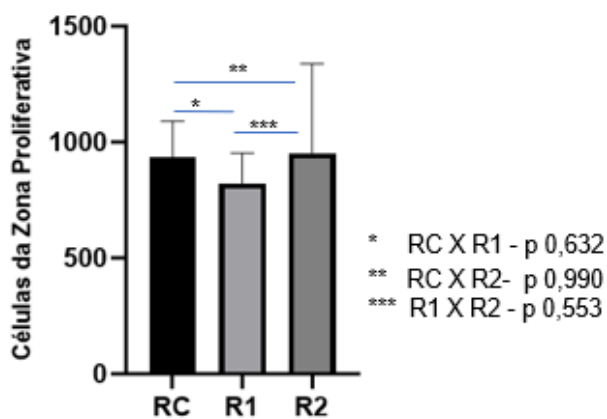
Fonte: Autora.

A Figura 16 demonstra a média de células por grupo e os resultados da análise estatística. Apesar de ser possível evidenciar maiores médias de células nos grupos RC e R2, a diferença entre as médias de células da PC não teve relevância estatística (Figura 16).

A)



B)



C)

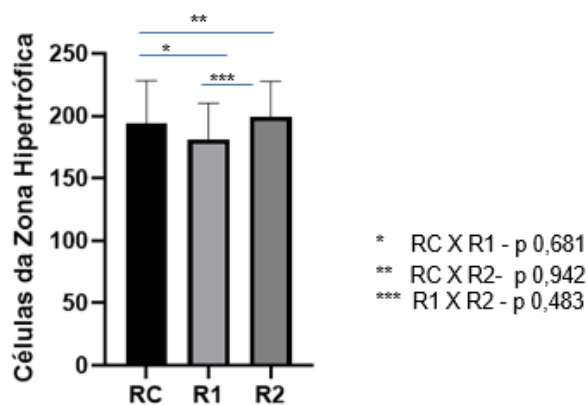


Figura 16. Média de contagem de células nas regiões da PC. (A) Média de células na zona de repouso entre os grupos – RC, R1 e R2; (B) Média de células na zona proliferativa entre os grupos – RC, R1 e R2; (C) Média de células na zona hipertrófica entre os grupos – RC, R1 e R2. ANOVA, pós-teste de Tukey, nível de significância $p < 0,05$. **Fonte:** Autora.

5.2.2 Análise da área da placa de crescimento

A área da PC foi calculada nas três lâminas no aumento de 100X (Figura 17). Não foi evidenciada diferença estatística entre as médias das áreas dos grupos RC, R1 e R2, apesar dos grupos RC e R2 apresentarem maiores médias. O grupo RC teve uma média igual a $178,120 \mu\text{m}^2$; o grupo R1 foi de $174,893 \mu\text{m}^2$ e o grupo R2 foi de $177,505 \mu\text{m}^2$ (Figura 18).

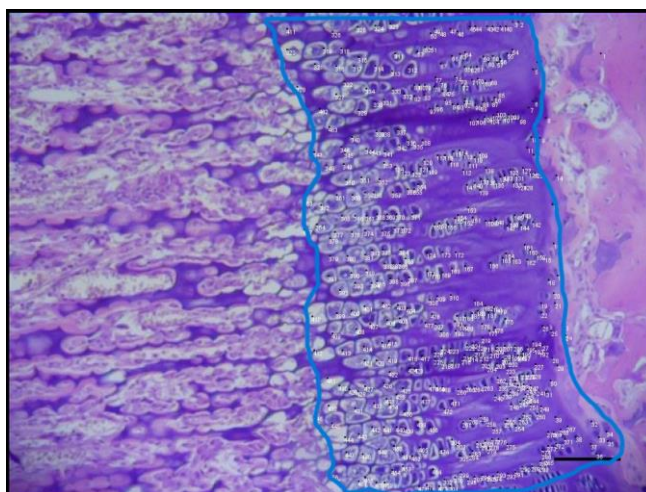


Figura 17. Lâmina da placa de crescimento de um animal do grupo R2 (treinamento de média intensidade), mostrando a região de análise da área da PC demarcada na imagem da lâmina (linha azul). Imagem capturada utilizando o *software* ImageJ. Aumento: 10X. Barra: $100\mu\text{m}$. **Fonte:** Autora.

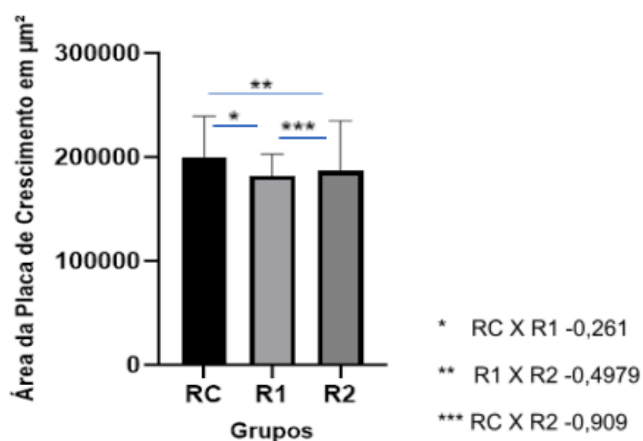


Figura 18. Médias das áreas da PC entre os grupos. RC- Grupo controle. R1- Grupo de treinamento de alta intensidade. R2- Grupo de treinamento de média intensidade. Análise estatística ANOVA, pós-teste de Tukey. Significância $p < 0,05$. **Fonte:** Autora.

5.2.3 Coloração da placa de crescimento com tricrômico de Gomori

A coloração com o tricrômico de Gomori foi realizada para análise da espessura da PC e a análise qualitativa das matrizes.

5.2.3.1 Espessura da placa de crescimento

De acordo com a metodologia descrita anteriormente, a espessura foi calculada em toda a extensão da PC e nas zonas proliferativa e hipertrófica/calcificação. A média da espessura total para cada grupo foi de 407,6 μm no grupo RC; 312,4 μm no grupo R1 e 355,5 μm no grupo R2 (Tabela 3). Portanto, a espessura da PC foi maior nos grupos RC e R2. Foi identificada uma diferença significativa entre os grupos, como evidenciado na Figura 19.

7

<i>Total</i>	358,2	348,9	50,09
--------------	-------	-------	-------

Fonte: Autora.

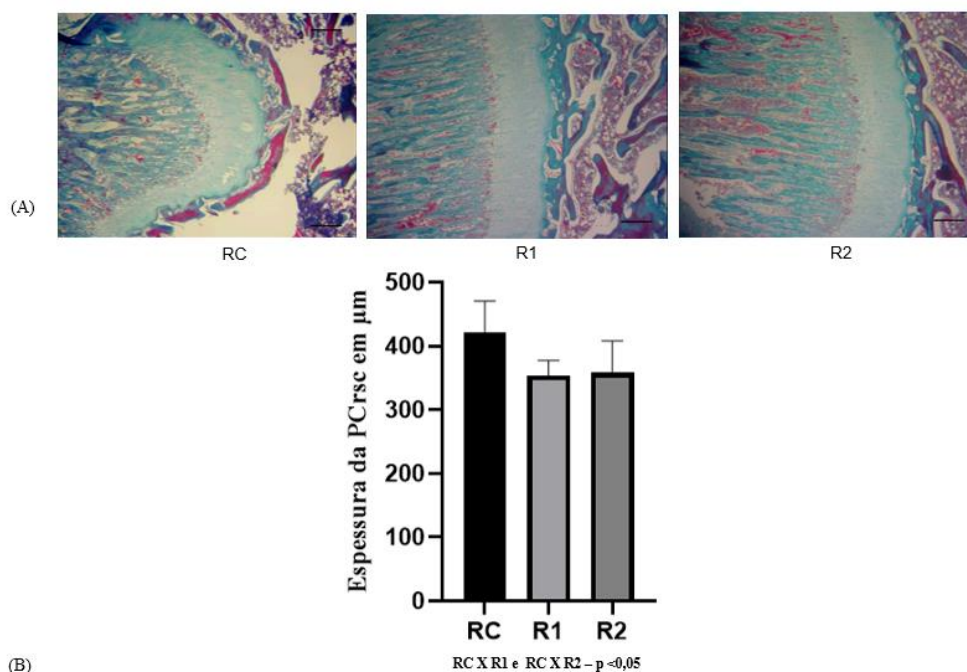


Figura 19. Fotomicrografias de lâminas, mostrando a espessura total da PC entre os grupos. (A) RC- Grupo controle; R1- Grupo de treinamento de alta intensidade; R2- Grupo de treinamento de média intensidade. (B) Gráfico de colunas. ANOVA, pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0,05$. **Fonte:** Autora.

Ao se comparar as zonas isoladamente, foi observada uma diferença significativa entre as médias. Na zona proliferativa, também foi observada uma diferença significativa entre os grupos RC e R1 ($p=0,0026$; Figura 20). Na zona hipertrófica/calcificação, o grupo RC apresentou maior média quando comparado aos grupos R1 e R2 (Figura 20).

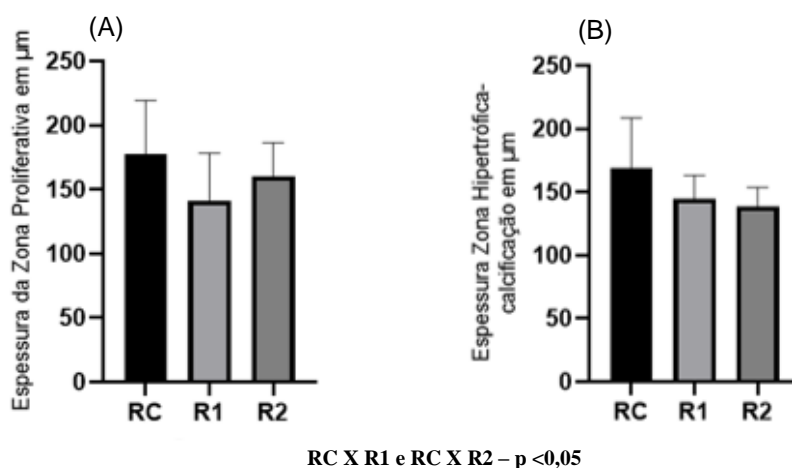
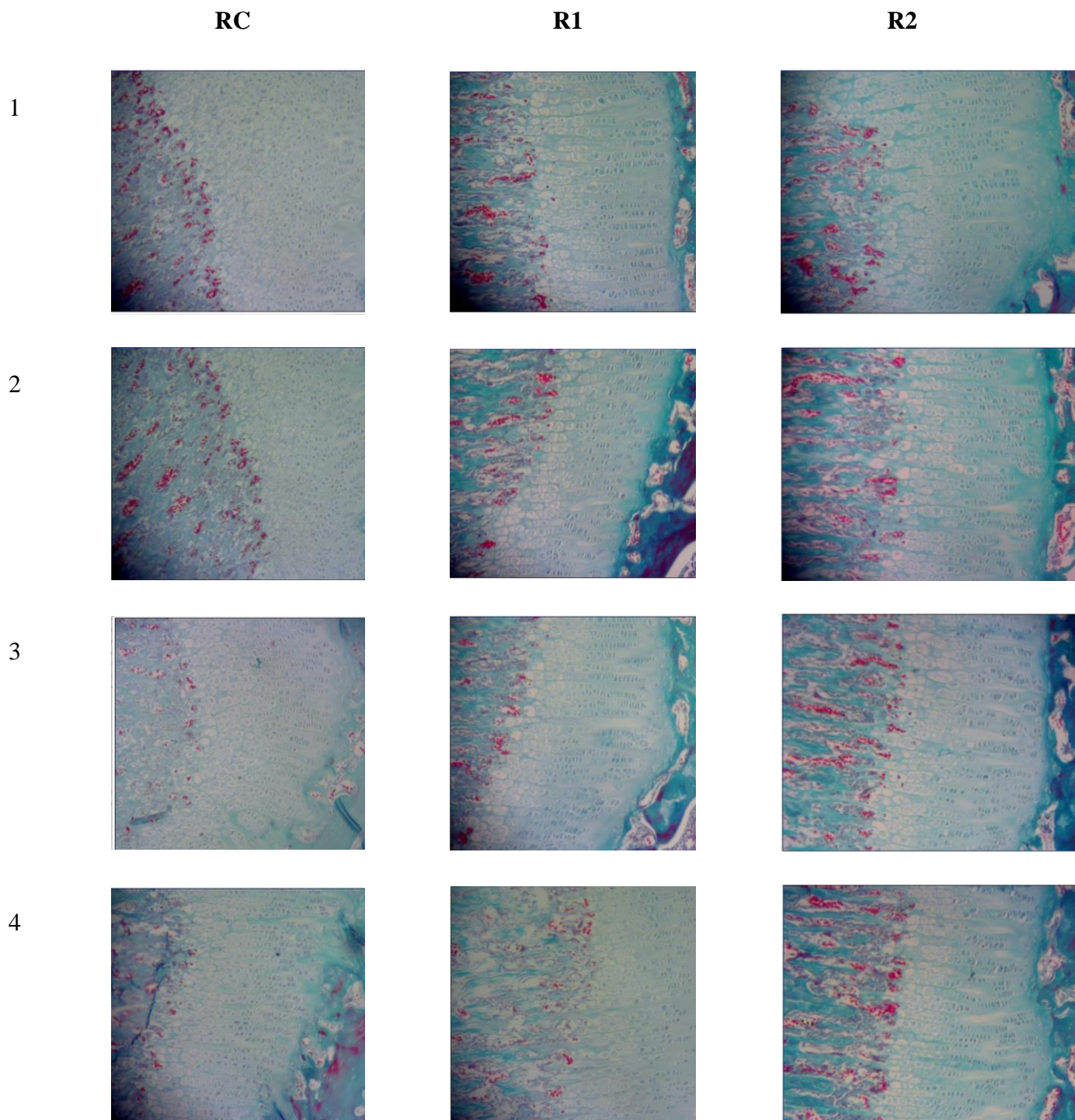


Figura 20. Média da espessura da PC nas zonas proliferativa e hipertrófica/calcificação. (A) Média entre os grupos na zona proliferativa. (B) Média entre os grupos na zona hipertrófica/calcificação. ANOVA, pós-teste de Tukey; nível de significância $p < 0,05$. **Fonte:** Autora.

5.2.3.2 Análise qualitativa da placa de crescimento

As fotomicrografias das PCs dos grupos RC, R1 e R2 demonstraram colorações diferentes entre os animais (1 a 8), onde é possível identificar um tom mais esverdeado/azulado nas regiões de repouso e proliferação da PC dos animais, de forma mais evidente no grupo R2 (Figura 21).



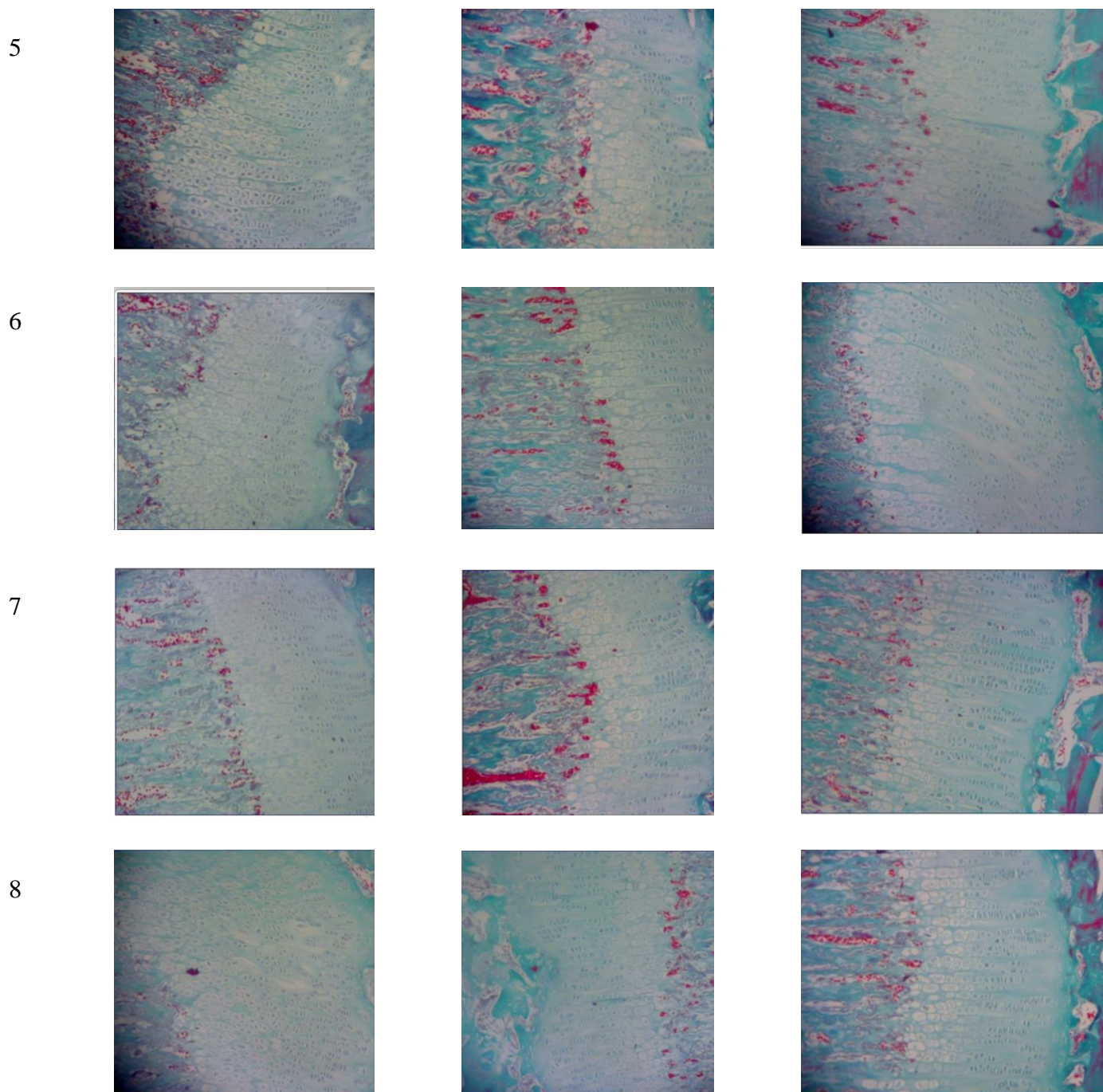


Figura 21. Fotomicrografias das PCs coradas com tricrômico de Gomori entre os animais de cada grupo. Na coluna vertical à esquerda estão nomeadas as imagens dos animais de 1 a 8, e na coluna horizontal superior, os grupos dos animais (RC, R1 e R2). Barra de escala para aumento de 10X. **Fonte:** Autora.

5.3 Análise do tecido muscular esquelético

O músculo sóleo foi analisado nas fotomicrografias das lâminas coradas em HE nos dois aumentos: 10X para contagem de células e 40X para aferição das áreas das fibras.

5.3.1 Contagem de fibras do músculo sóleo

O estudo das fibras musculares contou com a área e o número de células em fotomicrografia do corte transversal. A contagem de fibras musculares foi realizada no aumento de 100X utilizando a ferramenta “grid” do *software* ImageJ. Na análise descritiva, obteve-se a média da contagem das fibras musculares esqueléticas do músculo sóleo em cada grupo e a avaliação da distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p>0,05$). Em seguida, foi realizado o estudo estatístico pela ANOVA de única via com o pós-teste de Tukey.

A média de células por grupo foi de 70,88 no RC, 86,88 no R1 e 75 no R2. Na Tabela 4, encontram-se os dados descritivos de média, mediana e desvio padrão para cada grupo, considerando-se um IC de 95%.

Tabela 4. Estatística descritiva da contagem de células do músculo sóleo.

Resultados/ Grupos	RC	R1	R2
Mediana	73	87	81,50
Média	70,88	86,88	75
Desvio Padrão	10,01	7,27	20,23

Fonte: Autora.

Os dados não demonstraram diferença significativa entre as médias dos grupos na análise de variância com comparação múltipla entre os grupos. O valor de p foi maior que 0,05 entre os grupos (Figura 22).

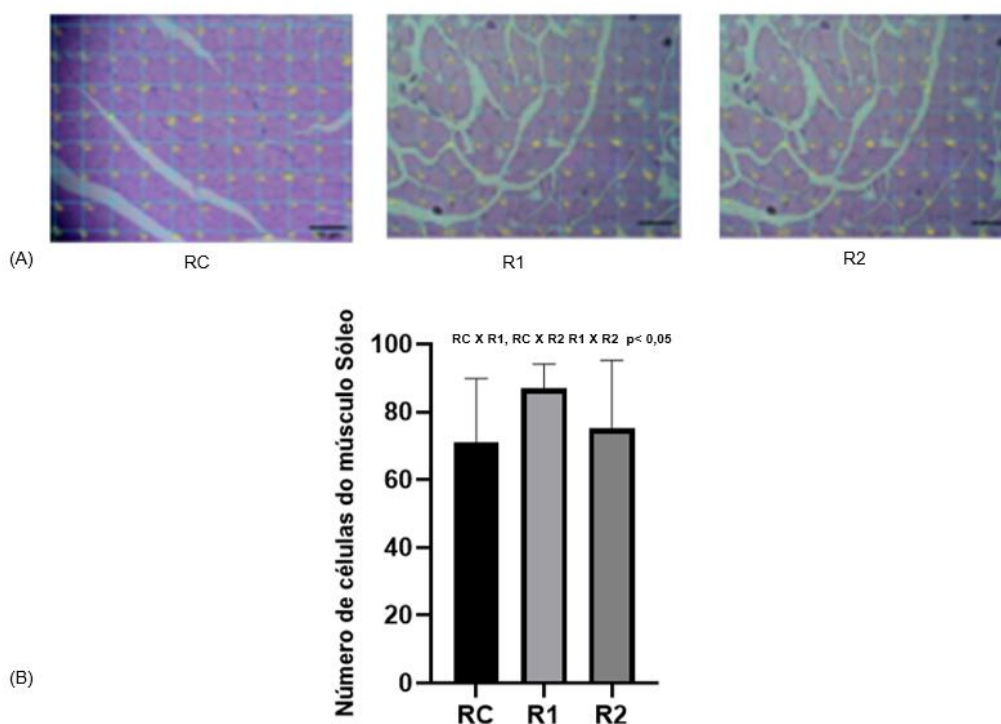


Figura 22. (A) Fotomicrografias utilizando a ferramenta “grid” do *software* ImageJ para contagem de células, representando os três grupos (RC, R1 e R2). Barra de escala no aumento de 10X. RC- controle. R1- treino de alta intensidade. R2- treino de média intensidade. (B) Gráfico de colunas com análise por ANOVA e pós-teste de Tukey, IC95%. Não houve diferença significativa na análise estatística para as comparações entre os grupos controle e de treinos físicos de alta e de média intensidade ($p > 0,05$). **Fonte:** Autora.

5.3.2 Áreas das fibras musculares

As áreas (μm^2) das fibras musculares do músculo sóleo foram analisadas em cinco fotomicrografias, no aumento de 40X, utilizando-se o *software* ImageJ. A avaliação foi realizada em todas as células, em cada uma das cinco lâminas, por animal. Foram evidenciadas as seguintes médias das áreas nos grupos: 14.240 μm^2 em RC (DP 5.437), 27.641 μm^2 em R1 (DP 8.404) e 17.817 μm^2 em R2 (DP 3.742).

De acordo com a ANOVA de única via com pós-teste de Tukey, o grupo de escalada com carga em alta intensidade (R1) apresentou uma maior área de fibras musculares do músculo sóleo (Figura 23) quando comparado às médias dos grupos RC e R2 ($p=0,008$ e $p=0,019$, respectivamente). Não foi evidenciado diferença significativa entre R1 e R2 ($p=0,4895$). A Figura 23 demonstra os dados das análises das áreas das fibras musculares do músculo sóleo entre os grupos.

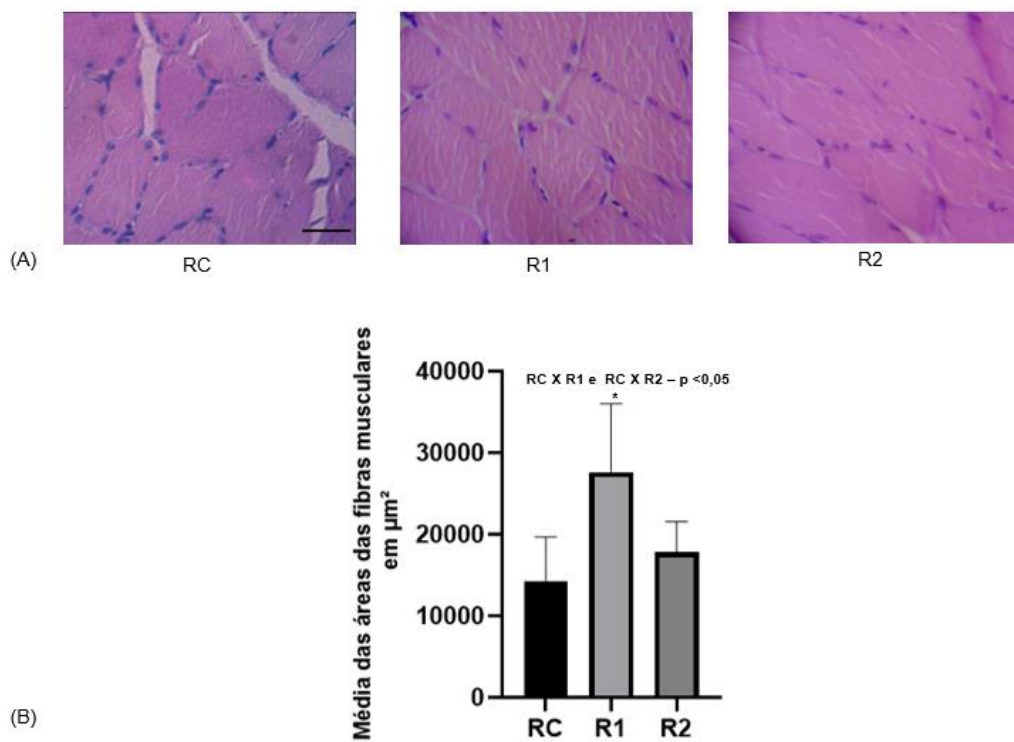


Figura 23. Médias das áreas das fibras musculares do músculo sóleo entre os grupos. (A) Fotomicrografias das fibras musculares do sóleo dos grupos RC, R1 e R2. (B) Médias das áreas das fibras dos grupos. ANOVA, $p < 0,05$, pós-teste de Tukey. Aumento: 40X. Barra: 100 μm . **Fonte:** Autora.

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi de analisar os aspectos morfológicos da PC e das fibras do músculo sóleo em ratos jovens submetidos a treinamentos de alta e média intensidade na escada vertical e compará-los a um grupo controle. Os achados apontam para uma menor espessura da PC e maior área das fibras musculares no grupo treinado com alta intensidade.

Os resultados da análise de ganho ponderal não mostraram relevância estatística na comparação múltipla entre os grupos RC, R1 e R2 ($p>0,05$). Em resposta a um programa de exercício físico, espera-se um maior ganho ponderal no grupo sedentário, como foi evidenciado no estudo experimental de Huang *et al.* (2008). Os autores relataram um maior ganho de peso no grupo controle em comparação aos de treino físico contínuo e intermitente (HUANG *et al.*, 2008). No entanto, tal achado deve ser considerado com cautela, visto que a interferência de outros fatores (*e.g.*, dieta e perfil corporal) podem demonstrar diferentes tendências (GASIER *et al.*, 2020).

No presente estudo, foi utilizada uma dieta regular de livre acesso, de forma igual em todos os grupos, sem cálculo calórico balanceado para cada tipo de exercício. Portanto, o exercício físico sem dieta adequada aos diferentes tipos de treino não interferiu no ganho de peso entre os animais sedentários e treinados. Desta forma, os animais deste estudo, com esta faixa etária e que receberam dieta *ad libitum*, não apresentaram um ganho ponderal estatisticamente diferente realizando os treinamentos na escada.

Ao analisar os dados de hipertrofia das fibras do músculo sóleo, observou-se maiores áreas das fibras no grupo R1 (alta intensidade) em comparação aos grupos RC e R2. Sendo assim, torna-se evidente que apenas a análise do ganho de peso não explica o perfil de composição corporal (massa magra e massa gorda) nesses animais.

Em resposta a um estímulo motor (SPAGNOL *et al.*, 2012; OZAKI *et al.*, 2018; LIU, GAO, GONG, 2019) ou neuromuscular (VICKERTON *et al.*, 2014), ocorre a hipertrofia muscular. Como resultado do estresse mecânico sobre a célula, as vias sinalizadoras anabólicas desencadeiam reações bioquímicas pela via AKT mTOR. Consequentemente, ocorre a elevação dos níveis de aminoácidos intracelulares e, com isso, o aumento da síntese proteica. Esse processo bioquímico leva a uma alteração celular, *i.e.*, a hipertrofia da fibra muscular. Ocorre, então, um predomínio da via anabólica sobre a catabólica (FERNÁNDEZ-LÁZARO *et al.*, 2019; CAHUE *et al.*, 2020). No presente estudo, foram utilizados exercícios de resistência e treinamento de força pelo acréscimo de carga durante a escalada. O treino

de força também estimula a ação dos hormônios anabolizantes, como a testosterona em machos, o hormônio do crescimento (GH) e o IGF1 (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; FERNANDEZ-LÁZARO *et al.*, 2019). Assim, fica evidente neste estudo que o treinamento físico de alta intensidade na escada promoveu uma maior hipertrofia do músculo sóleo pela maior carga imposta durante o treinamento.

A PC é uma área de tecido conjuntivo cartilaginoso que se localiza entre a epífise e a diáfise dos ossos longos, também denominada cartilagem epifisária (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Durante o processo de crescimento, esta matriz cartilaginosa vai sendo substituída por tecido ósseo, em um processo denominado ossificação endocondral, limitando então o crescimento longitudinal dos indivíduos (KIERSENBAUM *et al.*, 2008; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Em roedores, a placa de crescimento não se ossifica completamente, mas se torna desgastada e reduzida em tamanho (ROACH *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2011). No presente estudo, os animais que participaram dos experimentos situavam-se dentro da faixa etária que corresponde à infância e adolescência nos seres humanos e, desta forma, a PC analisada não estava amplamente ossificada.

A análise histológica dos três grupos que compuseram o experimento comparou o número de células das PCs, as áreas das PCs e a espessura das zonas da PC. Quanto às análises de contagem de células e as áreas da PC, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados. Já os dados de espessura total e das regiões proliferativas e hipertróficas da PC demonstraram diferenças significantes no grupo R1 (alta intensidade) em comparação aos grupos RC e R2. Na comparação entre os grupos RC e R2, a diferença entre as médias não teve relevância estatística. Neste caso, o exercício de média intensidade não alterou de forma significativa a celularidade da PC. Tais achados corroboram com o estudo de Mustafy *et al.* (2019) que, ao realizar a análise histomorfométrica da região da PC de roedores jovens submetidos a exercício físico com cargas de diferentes intensidades aplicadas em exercícios de salto e corrida, concluíram que o número de células da zona proliferativa por coluna foi menor no grupo de carga elevada. Já no estudo de David e Feijó (2009), que investigaram a histologia da epífise de crescimento após um protocolo de exercício aquático com carga de intensidade extenuante, não foram evidenciadas diferenças nas células condrais entre os animais dos grupos treinados e sedentários.

Do ponto de vista experimental, já foi demonstrado o benefício do EF na qualidade do tecido ósseo, na densidade mineral óssea e, particularmente, no osso esponjoso (HAMANN *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2008; NEBOT *et al.*, 2017). No entanto, ainda são

escassos os estudos sobre a interferência das diferentes intensidades de EF na PC dos roedores. No presente estudo, foi observado que a espessura da PC foi maior no grupo de EF de alta intensidade na escada quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Tal resultado se repetiu em relação ao grupo de média intensidade em comparação ao controle ($p < 0,05$). No entanto, a diferença da espessura da PC não foi significativa entre os dois grupos de treino físico ($p > 0,05$). O fechamento da PC é um fator limitante para o crescimento linear, fato que pode ser impactante para o crescimento de jovens atletas.

No presente estudo, não foi possível controlar bioquimicamente os substratos importantes para definição da intensidade do treinamento físico, onde a intensidade foi delimitada através da FCmáx., que também é indicado como um parâmetro importante de avaliação. Desta forma, não foi evidenciada uma diferença significativa entre os animais treinados com alta ou média intensidade.

Em um artigo de revisão que avaliou os impactos da prática esportiva sobre o crescimento e a puberdade de crianças e adolescentes, os autores concluíram que a atividade física leve e moderada tem efeito benéfico para o crescimento, enquanto o exercício físico intenso pode atenuar o crescimento (ALVES e LIMA, 2008). No entanto, o presente estudo evidenciou que a modalidade de treinamento de alta intensidade em escada foi benéfica na hipertrofia do músculo sóleo e, ao mesmo tempo, diminuiu a espessura da PC dos animais. Portanto, é possível atestar que os exercícios de alta intensidade têm efeitos diversos no organismo de um animal, podendo beneficiar um sistema e prejudicar outro. O modelo animal utilizado neste trabalho era de faixa etária jovem. O hormônio do crescimento (hGH) tem relação com o crescimento ósseo e a sua secreção pode ser estimulada tanto pelo sono quanto pelo exercício (GODFREY, MADGWICK, WHYTE, 2003). Foi postulado que o protocolo de treino resistivo empregado aqui pode ter interferido de alguma forma na secreção de hGH; portanto, merece a continuidade de investigação em relação aos efeitos sobre o crescimento longitudinal.

Este trabalho possuiu limitações diante da ausência do lactato sérico e da aferição do consumo de O_2 após os treinos físicos, o que caracterizaria melhor a intensidade do protocolo de treino.

São necessários mais estudos que possibilitem investigar mais a fundo os prejuízos que o treinamento físico de alta intensidade na escada poderá ocasionar na PC dos animais. O controle bioquímico e o uso de marcadores celulares com imuno-histoquímica para colágeno tipo 1 permitiriam uma maior exatidão dos resultados e uma análise mais completa.

7 CONCLUSÃO

Após o período de treino resistivo progressivo, os ratos jovens exercitados tiveram uma média de peso similar, reforçando que o exercício físico, isoladamente, não leva à perda de peso sem que haja uma alimentação diferenciada.

Os grupos treinados apresentaram uma menor espessura da placa de crescimento e maior média de área das fibras do músculo sóleo, evidenciando efeitos diferentes do exercício físico no tecido muscular e no disco epifisário. Tal fato merece uma investigação clínica mais aprofundada acerca dos efeitos do exercício físico resistivo no crescimento de crianças e adolescentes que se submetem precocemente a protocolos de treino físico intenso.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SARRAF, H., MOUIHATE, A. *Muscle hypertrophy in a newly developed resistance exercise model for rats.* **Front Physiol.** 2022 May 13;13:851789. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.851789>>. PMID: 35634153; PMCID: PMC9136173.

ALVES, C.; LIMA, R. V. B. *Linear growth and puberty in children and adolescents: effects of physical activity and sports.* **Rev. Paul. Pediatr.** [online]. 2008, v. 26, n. 4 [Acesso em: 6 set. 2021], pp. 383-391. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-05822008000400013>>. Epub 14 Jan 2009. ISSN 1984-0462.

ALVES, J. G. B.; ALVES, G. V. *Effects of physical activity on children's growth.* **J. Pediatr.** (Rio J). 2019 Mar-Apr;95 Suppl 1:72-78. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2018.11.003>>. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30593790.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: SciELO Livros <<http://books.scielo.org>>.

ANDREOLLO, N. A. *et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship?* **ABCD arq. bras. cir. dig.** 2012 Jan-Mar;25(1):49-51. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/s0102-67202012000100011>>. PMID: 22569979.

BARRETO, A. A. *et al. Effects of therapeutic ultrasound on longitudinal growth of the femur and tibia in rats.* **Acta Ortop. Bras.** [online]. 2011;19(3):132-6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-78522011000300003>>.

BARROS, R. *Physical exercise actually promotes adolescent health: solution or problem?* **Resid Pediatr.** 2015;5(3 Supl.1):32-34.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Promoção da Saúde. **GUIA DE ATIVIDADE FÍSICA PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA.** Brasília-DF, 2021.

CADENAS-SANCHEZ, C. *et al. Assessing physical fitness in preschool children: Feasibility, reliability and practical recommendations for the PREFIT battery.* **J Sci Med Sport.** 2016 Nov;19(11):910-915. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsams.2016.02.003>>. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26947061.

CAHUE, F. *et al. Intracellular Mechanisms of Muscle Hypertrophy: Why Does Muscle Increase in Size When Exercising with Weights? A Literature Review.* **JIM - Jornal De Investigação Médica.** 2020;1(1),14-25. Disponível em: <<https://revistas.ponteditora.org/index.php/jim/article/view/208>>.

CAINE, D.; DiFIORI, J.; MAFFULLI, N. *Physical injuries in children's and youth sports: reasons for concern?* **Br. J. Sports Med.** 2006 Sep;40(9):749-60. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1136/bjism.2005.017822>>. Epub 2006 Jun 28. PMID: 16807307; PMCID: PMC2564388.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. *Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research*. **Public Health Rep.** 1985;100(2):126-131. PMID: 3920711; PMCID: PMC1424733.

CASSILHAS, R. C. *et al.* *Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise*. **Motriz Rev. Educ. Fís.** [online]. 2013, v. 19, n. 1, pp.178-184. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1980-65742013000100018>>. Epub 19 Apr 2013. ISSN 1980-6574.

CAWLEY, K. M. *et al.* *Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts Suppresses Bone Resorption*. **Cell Rep.** 2020 Sep 8;32(10):108052. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108052>>. PMID: 32905775; PMCID: PMC7493998.

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE DOENÇAS-11-ICD11. Disponível em: <<https://icd.who.int/browse11/l-m/en>>. Acesso em: 01 dez. 2021.

CONDON, K. J.; SABATINI, D. M. *Nutrient regulation of mTORC1 at a glance*. **J. Cell Sci.** 2019 Nov 13;132(21):jcs222570. Disponível em: <<https://doi.org/10.1242/jcs.222570>>. PMID: 31722960; PMCID: PMC6857595.

COUTO, S. E. R. **Equipamentos, materiais e insumos**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2002. pp. 44-54. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-08.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

DAMY, S. B. *et al.* *Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery*. **Rev. Assoc. Med. Bras.** (1992). 2010 Jan-Feb;56(1):103-11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0104-42302010000100024>>. PMID: 20339795.

DAVID, B. C.; FEIJÓ, L. C. A. *Histologic aspects of bone growth epiphysis after strenuous physical exercise in mice*. **Fisioter. Bras.** 2009 Mar-Apr;10(2):85-88.

Diretrizes das Práticas de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/anexo-da-resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf> (www.gov.br)>. Acesso em 22 ago. 2022.

FERNÁNDEZ-LÁZARO, D. *et al.* *The training of strength-resistance in hypoxia: effect on muscle hypertrophy*. **Biomedica.** 2019 Mar 31;39(1):212-220. English, Spanish. Disponível em: <<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.4084>>. PMID: 31021559.

GASIER, H. G. *et al.* *Carbon Monoxide and Exercise Prevents Diet-Induced Obesity and Metabolic Dysregulation Without Affecting Bone*. **Obesity (Silver Spring)**. 2020 May;28(5):924-931. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/oby.22768>>. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32237119.

GODFREY, R. J.; MADGWICK, Z.; WHYTE, G. P. *The exercise-induced growth hormone response in athletes.* **Sports Med.** 2003;33(8):599-613. Disponível em: <<https://doi.org/10.2165/00007256-200333080-00005>>. PMID: 12797841.

GOMORI, G. *A rapid one-step trichrome stain.* **Am. J. Clin. Pathol.** 1950 Jul;20(7):661-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcp/20.7_ts.661>. PMID: 15432364.

GONÇALVES, L. V. *et al. Environmental enrichment cognitive neuroprotection in na experimental model of cerebral ischemia: biochemical and molecular aspects.* **Behav Brain Res.** 2018 Aug 1;348:171-183. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.023>>. Epub 2018 Apr 21. PMID: 29684474.

GUERRERO, J. A. *et al. Maxillary suture expansion: A mouse model to explore the molecular effects of mechanically-induced bone remodeling.* **J. Biomech.** 2020 Jul 17;108:109880. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.109880>>. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32635995.

GUTHOLD, R. *et al. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1.9 million participants.* **Lancet Glob. Health.** 2018 Oct;6(10):e1077-e1086. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30357-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30357-7)>. Epub 2018 Sep 4. Erratum in: *Lancet Glob Health.* 2019 Jan;7(1):e36. PMID: 30193830.

HALLETT, S. A.; ONO, W.; ONO, N. *Growth plate chondrocytes: skeletal development, growth and beyond.* **Int J Mol Sci.** 2019 Nov 29;20(23):6009. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20236009>>. PMID: 31795305; PMCID: PMC6929081.

HAMANN, N. *et al. The Effect of Level and Downhill Running on Cortical and Trabecular Bone in Growing Rats.* **Calcif. Tissue Int.** 2012 May;90(5):429-37. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00223-012-9593-6>>. Epub 2012 Apr 1. PMID: 22466445.

HUANG, T. *et al. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats.* **J. Bone Miner. Metab.** 2008;26(4):350-7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00774-007-0831-3>>. Epub 2008 Jul 4. PMID: 18600401.

ISHIDA, J. C. *et al. Presence of cardiovascular risk factors and injuries in road runners.* **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.** [online]. 2013, v. 27, n. 1 [Acesso em: 24 maio 2022], pp. 55-65. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1807-55092013000100006>>. Epub 03 Abr 2013. ISSN 1981-4690.

JEWELL, J. L.; RUSSELL, R. C.; GUAN, K. L. *Amino acid signalling upstream of mTOR.* **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2013 Mar;14(3):133-9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrm3522>>. Epub 2013 Jan 30. PMID: 23361334; PMCID: PMC3988467.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Tecido Muscular.** In: Junqueira LCU e Carneiro J. **Histologia Básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap.10, pp. 182-203.

KENNEY, W. L.; WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Physiology of Sport and Exercise**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2020.t.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LANA, A. C.; PAULINO, C. A.; GONÇALVES, I. D. *Influence of low and high intensity physical exercise on hypernociception threshold and other parameters of rats*. **Rev Bras Med Esporte**. [online]. 2006, vol. 12, n.5, pp.248-254. ISSN 1517-8692. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1517-86922006000500005>>.

LEE, I. M. *et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy*. **Lancet**. 2012 Jul 21;380(9838):219-29. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61031-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61031-9)>. PMID: 22818936; PMCID: PMC3645500.

LIU, Z.; GAO, J.; GONG, H. *Effects of treadmill with different intensities on bone quality and muscle properties in adult rats*. **Biomed. Eng.** [online]. 2019 Nov 12;18(1):107. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12938-019-0728-0>>. PMID: 31718665; PMCID: PMC6852718.

MACKIE, E. J. *et al. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton*. **Int J Biochem Cell Biol**. 2008;40(1):46-62. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.009>>. Epub 2007 Jun 29. PMID: 17659995.

MALANOTTE, J. A. *et al. Jumping in aquatic environment after sciatic nerve compression: nociceptive evaluation and morphological characteristics of the soleus muscle of Wistar rats*. **Einstein** (São Paulo). 2017 Jan-Mar;15(1):77-84. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1679-45082017AO3613>>. PMID: 28444094; PMCID: PMC5333312.

MEAKIN, L. B.; PRICE, J. S.; LANYON, L. E. *The Contribution of Experimental in vivo Models to Understanding the Mechanisms of Adaptation to Mechanical Loading in Bone*. **Front Endocrinol** (Lausanne). 2014 Oct 1;5:154. Disponível em: <<http://doi.org/10.3389/fendo.2014.00154>>. PMID: 25324829. PMCID: PMC4181237.

MILISTETD, M. *et al. Analysis of the Competitive Organization of Sports for Children and Youths: Structural and Functional Adaptations*. **Rev. Bras. Ciênc. Esporte**. v. 36, n. 3, p. 671-678, Jul. 2014. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2179-325520143630012>>.

MINAMOTO, V. B. **Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão**. *Fisioterapia e pesquisa*, v. 12, n. 3, p. 50-55, 2005.

MIOT, H. A. *Assessing normality of data in clinical and experimental trials*. **J Vasc Bras**. 2017;16(2):88-91. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1677-5449.041117>>. ISSN 1677-7301.

MONTANARI, T. **Tecido Conjuntivo. In: Histologia. Texto, atlas e roteiro de aulas práticas.** [online]- 2. ed. Porto Alegre: Edição do autor, 2013. Disponível em: <<http://www.ufgrs.br/livrodehisto/>>.

MUSTAFY, T. *et al.* *High impact exercise improves bone microstructure and strength in growing rats.* **Sci Rep.** 2019 Sep 11;9(1):13128. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49432-2>>. PMID: 31511559. PMCID: PMC6739374.

NEBOT, E. *et al.* *Effects of Hypertrophy Exercise in Bone Turnover Markers and Structure in Growing Male Rats.* **Int. J. Sports Med.** 2017 Jun; 38(6):418–425. Disponível em: <<https://doi.org/10.1055/s-0043-101910>>. Epub 2017 Apr 7. PMID: 28388781.

NIKOLIĆ, M.; JOVANOVIĆ, R.; STANKOVIĆ, A. *Characteristics of Physical Activity Among Healthy Serbian Adolescents.* **Rev. Bras. Med. Esporte** [online]. 2020, v. 26, n. 1 [Acesso 24 Mai 2022], pp. 30-33. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1517-869220202601187598>>. Epub 13 Jan 2020. ISSN 1806-9940.

OLIVEIRA FILHO, P. F. **Testes Paramétricos. In: Epidemiologia e Bioestatística: Fundamentos para a Leitura Crítica.** 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2015. pp.133-36.

OZAKI, G. A. T. *et al.* *Adaptations of Muscle Tissue of Rats Submitted to Aerobic and Anaerobic Physical Training in Different Ergometer Models.* **Int. J. Morphol.** v. 36, n. 4, p. 1161-1167, Dez. 2018. SciELO Agencia Nacional de Investigacion y Desarrollo (ANID). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/s0717-95022018000401161>>.

PEDISIC, Z. *et al.* *Is running associated with a lower risk of all-cause, cardiovascular and cancer mortality, and is the more the better? A systematic review and meta-analysis.* **Br. J. Sports Med.** 2020 Aug;54(15):898-905. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100493>>. Epub 2019 Nov 4. PMID: 31685526.

PEIXINHO-PENA, L. F. *et al.* *A strength exercise program in rats with epilepsy is protective against seizures.* **Epilepsy Behav.** 2012 Nov;25(3):323–8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.08.011>>. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23103304.

PORTIER, H.; BENAÏTREAU, D.; PALLU, S. *Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats?* **Life** (Basel). 2020 Sep 23;10(10):217. Disponível em: <<http://doi.org/10.3390/life10100217>>. PMID: 32977460. PMCID: PMC7598192.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício – Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho.** 8. ed. Barueri/SP: Manole, 2014, 672p.

RIVERA, E. K. B. **Anestesia em animais de experimentação.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2002a. pp. 254-262. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-30.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

RIVERA, E. K. B. **Estresse em animais de laboratório.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2002b. pp. 262-273. Disponível em:

<<http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-31.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

ROACH, H. I. *et al.* Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despite presence of a physis. **J. Histochem. Cytochem.** 2003 Mar;51(3):373-83. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/002215540305100312>>. PMID: 12588965.

RODRIGUES, M. D.; BORIN, S. H.; SILVA, C. A. Relações metabólicas em ratos sob o treinamento anaeróbio em escada. **Rev Bras Ciênc Esporte.** 2017;39(1):63-67. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbce.2016.01.014>>.

ROESLER, H. The history of some fundamental concepts in bone biomechanics. **J Biomech.** 1987;20(11-12):1025-34. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0021-9290\(87\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0021-9290(87)90020-0)>. PMID: 3323196.

ROSIQUE-ESTEBAN, N. *et al.* Leisure-time physical activity, sedentary behaviors, sleep, and cardiometabolic risk factors at baseline in the PREDIMED-PLUS intervention trial: A cross-sectional analysis. **PLoS One.** 2017 Mar 8;12(3):e0172253. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172253>>. PMID: 28273154; PMCID: PMC5342184.

SALHOTRA, A. *et al.* Mechanisms of bone development and repair. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2020 Nov;21(11):696-711. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>>. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32901139. PMCID: PMC7699981.

SANTOS, K. R. P. *et al.* Manual de técnica histológica de rotina e de colorações. Universidade Federal de Pernambuco. Vitória de Santo Antão, 2021. 32p.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods.** 2012 Jul;9(7):671-5. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>>. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **J. Int. Med. Prev.** Vol. 4,6 (2013): 624-30.

SIEBLER, T. *et al.* Glucocorticoids, thyroid hormone and growth hormone interactions: implications for the growth plate. **Horm. Res.** 2001;56 Suppl 1:7-12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000048127>>. PMID: 11786678.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA - SBP. Departamento Científico de Endocrinologia. *Uso de esteroides anabolizantes androgênicos por adolescentes: uma realidade.* Nº11, 29 Junho 2021.

SPAGNOL, A. R. *et al.* Análise da plasticidade muscular de ratos submetidos a um protocolo de treinamento físico concorrente. **R. bras. Ci. e Mov.** 2012;20(3):118-124.

SUDA, T. *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocr. Rev.** 1999 Jun;20(3):345-57. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0367>>. PMID: 10368775.

TÓTH, K.; OROSZI, T.; VAN DER ZEE, E. A.; NYAKAS, C.; SCHOEMAKER, R. G. *The effects of exercise training on heart, brain and behavior, in the isoproterenol-induced cardiac infarct model in middle-aged female rats.* **Sci Rep.** 2022 Jun 16;12(1):10095. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14168-z>>. PMID: 35710575; PMCID: PMC9203707.

VICKERTON, P. *et al.* *Morphological and histological adaptation of muscle and bone to loading induced by repetitive activation of muscle.* **Proc. Biol. Sci.** 2014 Aug 7;281(1788):20140786. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.0786>>. PMID: 24966314; PMCID: PMC4083794.

WOEHL V. M.; WOEHL O. M. **Histologia.** In: **Biologia.** 3. ed. UFSC. Florianópolis. 2016.

WOLFF, R. B. *et al.* *Molecular features of sexual steroids on cartilage and bone.* **Rev. Assoc. Med. Bras.** (1992). 2012 Jul-Aug;58(4):493-7. English, Portuguese. PMID: 22930031.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1>. Acesso em: maio 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/adolescent-health#tab=tab_1>. Acesso em: 16 mar. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmitibles 2014. Ginebra: WHO: 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guideline: Management of adolescents 10-19 years of age with obesity for improved health, functioning and reduced disability: a primary health care approach. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/events/detail/2021/10/28/default-calendar/3rd-GDG-meeting-management-of-adolescents-10-19-years-of-age-with-obesity-for-improved-health-functioning-and-reduced-disability-a-primary-health-care-approach>>. Acesso em: 01 dez. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines on Physical Activity and Sedentary Behaviour: at a glance. Geneva: World Health Organization; [2020].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global action plan on physical activity 2018–2030: more active people for a healthier world. Geneva: World Health Organization; 2018. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

YAMADA, A. K.; PERTILLE, A.; BUENO JUNIOR, C. R. *Resistance training/mechanical overload and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling on muscle hypertrophy in different experimental models.* **Rev. Bras. Ciênc. Mov.** 2017;25(1):168-182.

YANAGUIZAWA, M. *et al.* *Imaging of growth plate injuries.* **Radiol. Bras.** 2008;41(3):199–204. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-39842008000300013>>. Epub 15 Jul 2008. ISSN 1678-7099.

ZANCHI, N. E. *et al.* *Experimental chronic low frequency resistance training produces skeletal muscle hypertrophy in the absence of muscle damage and metabolic stress markers.* **Cell Biochem Funct.** 2010;28(3):232-8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cbf.1665>>.