



Dimensões geométricas das fibras do músculo sóleo de ratos exercitados em esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas*

Maila K. Mattos de Brito, José Carlos Silva Camargo Filho, Luiz Carlos Marques Vanderlei, Mário Hissamitsu Tarumoto, Vitalino Dal Pai¹ e José A. Giacometti

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma nova metodologia para análise de imagens digitalizadas de cortes transversais de fibras musculares esqueléticas de ratos submetidos ao exercício físico em esteira rolante. Foram utilizados segmentos do músculo sóleo de ratos obtidos de cortes histológicos e corados com hematoxilina e eosina (HE). Foram avaliadas 100 fibras musculares para cada animal e medidos o perímetro, a área e os diâmetros máximo, médio e mínimo por meio do processo de segmentação de imagens digitalizadas das seções das fibras usando o programa computacional *Image-Pro-Plus*. As dimensões geométricas como a área, perímetro e os diâmetros mínimos, médios das seções transversais das fibras musculares revelaram-se adequados para a análise do efeito do treinamento dos ratos. A análise revelou a existência de interação entre os grupos de ratos e a duração do exercício físico. O coeficiente de correlação de Pearson foi maior entre diâmetro médio e a área das fibras (0,97) seguida pela correlação entre os diâmetros máximo e médio com o perímetro (0,93). Concluiu-se que a mensuração do grau de hipertrofia das fibras musculares pode ser feita através da determinação do diâmetro médio ou da área da seção transversal da fibra, constituindo uma metodologia adequada e eficiente especialmente para as fibras musculares com acentuado polimorfismo.

ABSTRACT

Geographical dimensions of fibers from the soleum muscle in rats exercised on treadmill: the importance of the analysis by means of digitalized images

The purpose of this paper was to assess a new methodology to analyze digitalized cross sectional images from the skeletal muscular fibers in rats submitted to physical exercise on treadmill. It was used portions of the soleum muscle of rats attained from histological cuts and tinted with hematoxylin and eosin (HE). 100 muscular fibers were assessed from each animal, and their perimeter, the area, and the maximal, medium and minimal diameters were measured by means of the segmentation process from digitalized images of the fibers' sections using the software *Image-Pro Plus*. The geometrical dimensions such as the area, the perimeter and the medium and minimal diameters of the cross section of muscular fibers revealed to be adequate to analyze the effect of the training in rats. The analysis revealed the existence of an interaction between the group of rats and the duration of the phys-

Palavras-chave: Fibras musculares. Treinamento físico com animal. Microscopia por vídeo.

Keywords: Muscular fibers. Physical training with animals. Video microscopy.

Palabras-clave: Fibras musculares. Educación física del animal. Microscopia por vídeo.

ical exercise. The Pearson's correlation coefficient was higher between the medium diameter and the area of the fibers (0.97), followed by the correlation between the maximal and medium diameter with the perimeter (0.93). It can be concluded that the measurement of the grade of the hypertrophy of the muscular fibers can be performed by determining the medium diameter or the cross sectional area of the fiber, and thus constituting an adequate and effective methodology especially for muscular fibers with accentuated polymorphism.

RESUMEN

Dimensiones geométricas de las fibras de los músculos sóleo de ratones ejercitados en cinta rodante: la importancia del análisis por medio de imágenes digitalizadas

El objetivo de este trabajo era evaluar una nueva metodología para el análisis digitalizado de las imágenes de cortes transversales de fibras musculares esqueléticas de ratones sometidos al ejercicio físico en la cinta rodante. Los segmentos del músculo sóleo de ratones obtenidos por cortes histológicos y fueron coloreados con Hematoxilina y Eosina (ÉL). Se estimaron 100 fibras musculares para cada animal, y se midió el perímetro moderado, el área, y el máximo de los diámetros, medio y mínimo a través del proceso de segmentación de digitalizaciones de las imágenes de las secciones de las fibras usando un programa computarizado *Image Pro-Plus*. Las dimensiones geométricas como el perímetro área y los diámetros mínimos, medio de las secciones atravesado de las fibras musculares que ellos se revelaron apropiado para el análisis del efecto del entrenamiento de los ratones. El análisis reveló la existencia de la interacción entre los grupos de ratones y la duración del ejercicio físico. El coeficiente de correlación de Pearson era más grande entre el diámetro elemento y el área de las fibras (0,97) siguiendo para la correlación entre el máximo de los diámetros y medio con el perímetro (0,93). fue Acabado que pueden hacerse las medidas del grado de hipertrofia de las fibras musculares a través de la determinación del diámetro elemento o del área de la sección atravesado de la fibra, constituyendo una metodología apropiada y eficaz sobre todo para las fibras musculares con haber acentuado el polimorfismo.

* Faculdade de Ciências e Tecnologia, Unesp, CP 467 – 19060-900 – Presidente Prudente, SP, Brasil.

1. Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Rua José Bongiovani, 700 – 19050-900 – Presidente Prudente, SP, Brasil.

Recebido em 00/00/05. Versão final recebida em 00/00/05. Aceito em 14/11/05.

Endereço para correspondência: José A. Giacometti, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Unesp, Rua Roberto Simonsen, 305, Caixa Postal 467 – 19060-900 – Presidente Prudente, SP. E-mail: giacometti@prudente.unesp.br

INTRODUÇÃO

A sobrecarga funcional induzida pelo exercício físico promove o aumento da tensão muscular e a produção de energia tornando o músculo esquelético suscetível a alterações^(1,2). Durante as fases mais adiantadas do exercício, uma adaptação notável é a hipertrofia das fibras musculares^(3,4), por exemplo, como aquelas que ocor-

rem no músculo quadríceps de indivíduos submetidos a treinamento de resistência e força⁽⁵⁾. Uma das formas de se estudar as alterações das fibras musculares, como a hipertrofia, é por meio da mensuração das dimensões geométricas⁽⁶⁾ das seções transversais das fibras. Técnica similar também tem sido utilizada no estudo da detecção de células cancerígenas⁽⁷⁾ e das características morfofuncionais das fibras do músculo esquelético de espécies animais com interesse econômico com o intuito de obter informações sobre a qualidade da carne⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Nos estudos morfométricos do tecido muscular são frequentemente avaliadas as dimensões geométricas dos cortes transversais das fibras como os diâmetros ortogonais, o perímetro da seção e a área^(11,12). Um dos métodos usados na análise quantitativa da fibra é a mensuração do seu menor diâmetro como proposto por Dubowitz⁽¹³⁾. Esta metodologia tem sido amplamente utilizada na avaliação da hipertrofia induzida pelo exercício físico e nos processos atroficos induzidos pelo desuso ou desnervação⁽¹²⁾. O estudo da geometria dos cortes transversais de fibras musculares como proposta por Dubowitz tem sido realizado através de retículos de oculares e com o uso de desenhos em câmaras claras acoplados a um microscópio óptico. Esta metodologia é um conjunto de procedimentos lentos, com acentuado dispêndio de tempo, levando a resultados por vezes dependentes, em parte, da subjetividade do pesquisador. A utilização de imagens digitais é uma necessidade em pesquisas nas áreas da biologia, no diagnóstico médico, no sensoriamento remoto, na astronomia e automação, etc.⁽¹⁴⁾.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a aplicação do método morfométrico, por meio do uso da análise computacional de imagens digitalizadas para o estudo das alterações morfológicas em cortes transversais de fibras do músculo sóleo de ratos submetidos ao exercício físico em esteira rolante. A presente metodologia visa obter um processo objetivo no sentido de simplificar e quantificar matematicamente as medidas das dimensões geométricas dos cortes transversais das fibras musculares.

MÉTODOS

As imagens usadas neste trabalho foram obtidas utilizando-se lâminas obtidas de fibras musculares preparadas em trabalho anterior de um dos autores⁽¹⁵⁾. Como os procedimentos de obtenção das imagens são importantes para a avaliação do trabalho, é feito um resumo do treinamento dos ratos e da preparação das imagens das fibras musculares. Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albina), com idade entre 100 e 180 dias, mantidos em gaiolas plásticas com dimensões de 30 x 16 x 19cm, com cinco ratos em cada gaiola, à temperatura média de 22°C, ciclo claro/escuro de 12 horas, iniciando-se o ciclo claro em torno das 7:00 horas e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Os ratos foram aleatoriamente divididos em seis grupos (três grupos denominados de exercitados e três de controle), com cinco ratos por grupo, caracterizando, portanto, um experimento fatorial completamente aleatorizado 2x3. Os ratos dos grupos exercitados foram submetidos ao treinamento físico em esteira rolante em duas fases: a primeira fase de adaptação e a segunda de treinamento. Na fase de adaptação os ratos foram submetidos a sessões diárias de exercícios em esteira rolante, com duração de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos, durante os cinco primeiros dias de experimento e na fase de treinamento a sessões diárias de exercícios, com duração de 60 minutos, cinco dias por semana, entre 14:00 e 17:00 horas. Os três grupos de ratos exercitados foram sacrificados após 30, 45 e 60 dias de treinamento. Os ratos de controle foram submetidos aos mesmos procedimentos que os ratos exercitados, com exceção de que eles não foram submetidos aos exercícios físicos na esteira rolante.

Para coleta do material os ratos foram sacrificados com a injeção de pentobarbital sódico, 20mg/100g de peso corporal⁽¹⁶⁾ e imediatamente iniciado o procedimento cirúrgico para a retirada do

músculo sóleo do membro pélvico direito. Amostras do ventre do músculo sóleo medindo aproximadamente 2cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro, com as fibras longitudinais dispostas no maior eixo do comprimento, foram congeladas em N-Hexana, resfriada a -70°C⁽¹⁷⁾. A seguir, os cortes histológicos de 8µm de espessura foram feitos em um micrótomo criostato modelo *HM 505 E Microm*, perpendicularmente ao maior eixo das fibras, à temperatura de -20°C e em seguida foram corados pelo método hematoxilina e eosina (HE)⁽¹⁸⁾.

Imagens de 100 fibras (corte transversal) de cada rato foram digitalizadas com aumento de 50x utilizando-se uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico *Leica* e suas dimensões foram calibradas usando-se uma régua micrométrica. Conforme justificativa apresentada na seção de discussão, foram utilizadas apenas 100 fibras, o que representa a metade do número que tem sido frequentemente usado na literatura.

Para a avaliação das dimensões das fibras musculares utilizou-se o programa "*Image-Pro-Plus*" versão 4.5. Este aplicativo permite a segmentação das seções transversais das fibras musculares das imagens, obtendo-se assim as suas dimensões geométricas. O programa fornece 53 parâmetros de uma imagem, tais como a coloração, a intensidade, a densidade da imagem e as dimensões geométricas. Neste trabalho os parâmetros de coloração, de densidade e de intensidade das imagens não são de interesse. As determinações dos valores dos diâmetros mínimo, máximo e médio são feitos matematicamente da seguinte forma. Inicialmente o aplicativo determina a posição do centróide da figura correspondente à seção transversal da fibra. Após isto são determinados os comprimentos do conjunto de retas (diâmetros) que passam pelo centróide da fibra e que unem dois pontos da curva perimetral da fibra. A partir do conjunto de retas o aplicativo determina os valores dos comprimentos do diâmetro mínimo, máximo e médio. Outras variáveis matemáticas das seções transversais das fibras fornecidas pelo programa são: o fator de forma, os ângulos dos eixos principais e a fractalidade das imagens. Neste trabalho estas variáveis também foram descartadas por não apresentarem variações significativas nos experimentos com os ratos.

Para a análise das fibras foram selecionadas as seguintes dimensões geométricas: área, perímetro e os diâmetros mínimos, máximos e médios, cujos valores foram armazenados numa planilha no formato do programa "*Excel*". A análise estatística dos resultados das dimensões geométricas foi realizada utilizando o programa *Statistical Analysis System - SAS*. Para o estudo da comparação para os grupos de ratos e os períodos de exercício aplicou-se a análise de variância *ANOVA Two-Way*, obtendo-se o efeito de grupo de ratos, dos dias de treinamento e da interação entre dias e grupos. Para as dimensões que apresentaram variações significativas, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%. Este procedimento foi adequado considerando-se a utilização de um experimento fatorial e completamente aleatorizado. Os resultados seguem uma distribuição normal (teste de Shapiro-Wilks, com nível de significância de 5%) e os grupos são independentes^(19,20). Não foi testada a homogeneidade das variâncias, pois se considera que a análise de variância é uma técnica robusta⁽²¹⁾.

RESULTADOS

A figura 1 mostra um corte transversal do músculo sóleo de um animal submetido a 30 dias de treinamento físico. Pode-se observar que o tecido muscular possui o padrão fascicular normal delimitado pelo perimísio e cada fibra é circundada pelo endomísio. As fibras possuem contornos poligonais, tendo um ou mais núcleos em posições periféricas. Não se mostram as imagens das fibras de ratos de controle, pois as mesmas não apresentam diferenças visuais significativas quando comparadas com as imagens das fibras da figura 1.

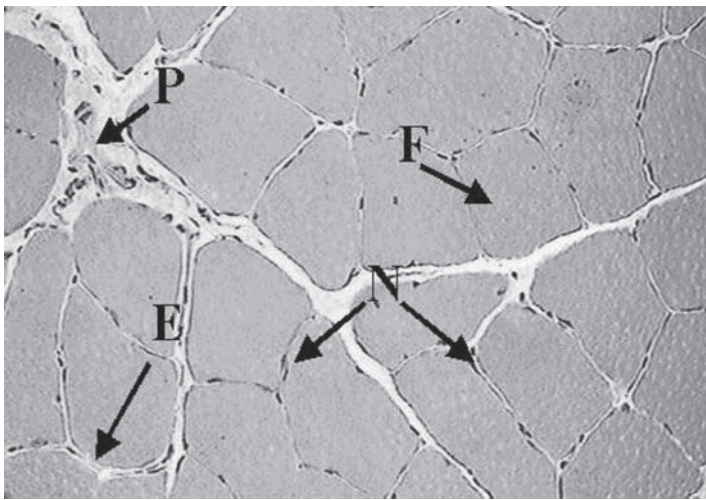


Figura 1 – Corte transversal do músculo sóleo de rato exercitado (30 dias). Observa-se na figura que as seções das fibras são poligonais (F) e têm núcleos periféricos (N), perimísio com vasos sanguíneos (P) e endomísio (E). HE. 50x.

Na figura 2 tem-se um exemplo da imagem digitalizada de um corte transversal do músculo sóleo mostrando as imagens de fibras em tonalidade escura sendo trabalhadas no ambiente do programa "Image-Pro-Plus". Os números mostrados na figura identificam cada uma das fibras que já foram segmentadas, cujas dimensões serão armazenadas na planilha do programa e posteriormente exportadas pelo programa no formato Excel.

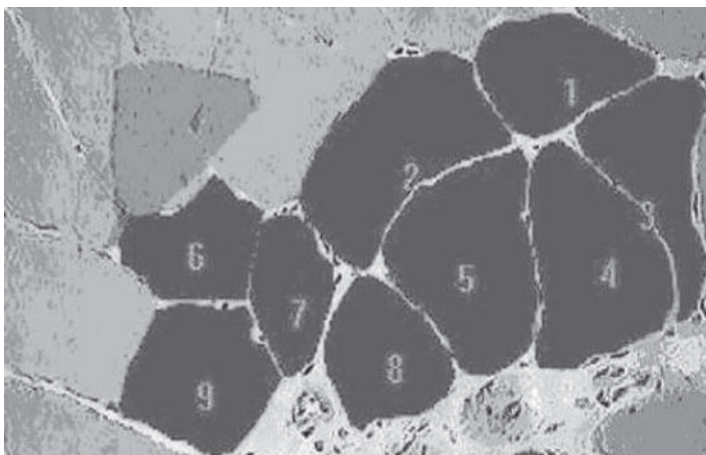


Figura 2 – Corte transversal do músculo sóleo de rato exercitado (60 dias). Em tonalidade escura são mostradas as fibras delimitadas através do programa "Image-Pro-Plus". Os números de 1 a 9 identifica as fibras delimitadas (1 a 9). HE. 50x.

Como exemplo dos resultados, a tabela 1 mostra os resultados obtidos para as dimensões: diâmetros máximo, mínimo e médio das seções transversais das fibras musculares dos ratos dos grupos treinados em diferentes tempos e os correspondentes resultados obtidos para os grupos de controle. De acordo com os dados apresentados na tabela 1, os grupos submetidos ao treinamento físico apresentaram sistematicamente valores de diâmetros superiores aos observados nos grupos de controle.

A análise de variância foi aplicada para comparar as médias entre os grupos de ratos exercitados e ratos de controle, tendo obtido p-valor < 0,05 em todas as comparações realizadas, ou seja, as diferenças entre elas foram significativas ao nível de 5%. A análise de variância mostrou ainda que existe a interação entre os grupos de ratos e a duração do exercício, ou seja, que o efeito destes ao longo do tempo foram diferentes para os dois grupos estudados.

TABELA 1
Médias e desvios-padrões das dimensões diâmetro médio (Dmed.), diâmetro mínimo (Dmin.) e diâmetro máximo (Dmax.) das seções transversais das fibras de ratos treinados e de ratos de controle

		30 dias µm	45 dias µm	60 dias µm
Dmed.	Treinados	68 ± 11 ^a	68 ± 13 ^a	69 ± 13 ^a
	Controles	63 ± 10 ^b	66 ± 12 ^c	60 ± 11
Dmin.	Treinados	48 ± 10 ^{a,d,e}	50 ± 10 ^a	50 ± 10 ^a
	Controles	46 ± 9 ^{b,c}	49 ± 10	43 ± 9
Dmax.	Treinados	94 ± 21 ^{a,d}	91 ± 21 ^a	92 ± 22 ^a
	Controles	84 ± 19 ^b	88 ± 20 ^c	80 ± 18

^a Médias estatisticamente diferentes em relação ao respectivo grupo controle; ^b Idem em relação ao grupo controle de 45 dias; ^c Idem em relação ao grupo controle de 60 dias; ^d Idem em relação ao grupo exercitado de 45 dias; ^e Idem em relação ao grupo exercitado de 60 dias.

Para os ratos exercitados ocorreram diferenças significativas para o diâmetro máximo entre 30 e 45 dias, enquanto que, para o diâmetro mínimo, além da diferença observada entre 30 e 45 dias, ocorreu também uma diferença entre os animais com 30 e 60 dias. Para o diâmetro médio não foi observada diferença significativa entre os dias de treinamento. Nos ratos de controle houve diferenças significativas das médias dos diâmetros médio e máximo entre 30 e 45 dias e 45 e 60 dias e, para o diâmetro mínimo, também ocorreram diferenças entre 30 e 60 dias.

A tabela 2 contém os resultados da análise estatística para as dimensões: área e perímetro das seções transversais das fibras musculares dos ratos treinados, com diferentes tempos de treinamento e os correspondentes resultados para as fibras dos ratos de controle. Pode-se observar um aumento estatisticamente significativo da área e do perímetro nos ratos submetidos a treinamento físico quando comparados com os seus respectivos de controle em todos os tempos considerados. A análise de variância mostrou que existe a interação entre os grupos de ratos e a duração do exercício, isto é, o perfil de respostas entre os grupos de ratos, considerando-se os dias de treinamento, variou ao longo do tempo entre os grupos de ratos. Os ratos treinados não apresentaram alterações significativas da área e perímetro ao longo do período de treinamento, enquanto que, para os ratos de controle, as médias do perímetro apresentaram diferenças significativas, ao nível de 5%, entre 30 e 45 dias e entre 45 e 60 dias, sendo que a área não mostrou diferenças significativas.

TABELA 2
Médias e desvios-padrões das dimensões da área e perímetro das seções transversais das fibras de ratos treinados e de ratos de controle

		30 dias µm ²	45 dias µm	60 dias µm
Área	Treinados	3.568 ± 1.157 ^a	3.640 ± 1.242 ^a	3.661 ± 1.312 ^a
	Controles	3.108 ± 1.044	3.372 ± 1.119	2.797 ± 1.027
Perímetro	Treinados	247 ± 43 ^a	243 ± 48 ^a	247 ± 47 ^a
	Controles	226 ± 43 ^b	236 ± 43 ^c	216 ± 41

^a Médias estatisticamente diferentes em relação ao respectivo grupo controle; ^b Idem em relação ao grupo controle de 45 dias; ^c Idem em relação ao grupo controle de 60 dias.

Na tabela 3 mostram-se os coeficientes de correlação de Pearson entre as dimensões geométricas das seções das fibras. Pelo teste de correlação de Pearson todos os coeficientes calculados são significativos (p-valor < 0,01); contudo, observa-se um valor para o coeficiente de Pearson bastante elevado entre diâmetro médio com a área e diâmetro médio com o perímetro. Além disso, observa-se que o coeficiente de correlação entre as dimensões dos diâmetros máximo e mínimo foi o menor deles. Este fato pode

estar diretamente relacionado ao plano de corte utilizado neste experimento. Estes resultados mostram, de forma geral, uma associação positiva entre as medidas consideradas. Deve-se tomar certo cuidado nesta interpretação, pois uma associação positiva não significa necessariamente que todas as medidas são coincidentes, mas indica somente que elas estão relacionadas.

TABELA 3
Coeficiente de correlação de Pearson
entre as dimensões geométricas das fibras

	Dmax.	Dmin.	Dmédio	Área	Perímetro
Dmax.	1,00	0,33	0,87	0,81	0,93
Dmin.		1,00	0,68	0,76	0,54
Dmed.			1,00	0,97	0,93
Área				1,00	0,89
Perímetro					1,00

Nota: Para verificar se a correlação é nula no teste de hipótese obtivemos p-valor < 0,01.

DISCUSSÃO

A análise deste trabalho mostra que as cinco dimensões da forma geométrica dos cortes transversais das fibras do músculo sóleo (diâmetros máximos, mínimos e médios, área e perímetro) aumentaram em ratos submetidos a treinamento físico, em comparação com seus respectivos ratos de controle, indicando que ocorreu a hipertrofia muscular. Modificações no tamanho e no número de fibras musculares em ratos submetidos aos exercícios físicos foram também relatadas por Paul e Rosenthal⁽²²⁾ e Giddings *et al.*⁽²³⁾.

A mensuração do tamanho das fibras, especialmente dos subtipos, tem-se mostrado essencial para fins de diagnóstico^(7,13) nas análises de biópsias musculares associadas a diferentes patologias e em condições experimentais, tais como, a hipertrofia provocada pelo estresse repetitivo e trabalho sustentado, a atrofia por desuso, por desnervação e a divisão longitudinal (*splitting*) de fibras. O processo de hipertrofia da fibra muscular pode ocorrer no intervalo de meses, mas o músculo estriado esquelético pode atingir hipertrofia dentro de curtos intervalos de tempo, como foi o caso observado neste trabalho⁽²²⁻²⁴⁾. As alterações observadas nas dimensões geométricas nas seções das fibras dos ratos de controle, ao longo do tempo, podem ser em parte atribuídas ao envelhecimento dos ratos.

Para o estudo da morfometria dos cortes transversais das fibras musculares dos ratos, a metodologia utilizada neste trabalho mostra duas vantagens em relação ao processo de análise visual das imagens das fibras: a primeira é a agilidade do processo, visto que foi obtido um resultado estatístico confiável utilizando um número total de fibras inferior proposto por Dubowitz^(7,8) e a segunda, a eliminação da subjetividade do pesquisador. As dimensões geométricas são determinadas através da análise matemática dos contornos das fibras, diferente do trabalho de Dubowitz, no qual se utiliza uma mensuração mais subjetiva^(15,25,26).

Das dimensões geométricas analisadas, observa-se um coeficiente de correlação de Pearson muito próximo de um entre diâmetro médio e a área e um pouco menor para os diâmetros máximo e médio com o perímetro, mostrando que diâmetro médio e área são as dimensões mais indicadas para mensuração das fibras musculares. A utilização do diâmetro médio das fibras como parâmetro de análise visa superar principalmente a variabilidade das medidas em fibras musculares com acentuado polimorfismo, em que a mensuração do menor diâmetro conduz a resultados pouco consistentes e de difícil reprodução⁽¹⁵⁾.

Conforme o critério de Dubowitz^(13,25,26), frequentemente são utilizadas cerca de 200 fibras musculares, das quais é mensurado o menor diâmetro em uma região central ou próxima ao centro da fibra, em posição ortogonal em relação ao maior eixo da fibra. Neste

trabalho as análises realizadas procuraram também determinar o número mínimo de fibras que devem ser analisadas para a confiabilidade dos resultados. Fixando-se um nível de confiança de 95% e um erro relativo máximo de 6%, chegou-se à conclusão de que a amostragem de 100 fibras por animal é suficiente para este tipo de estudo. Por essa razão, as nossas análises foram feitas com esse número de fibras.

O valor matemático das dimensões geométricas das seções das fibras desta pesquisa pode ter um significado distinto do menor diâmetro proposto por Dubowitz⁽¹³⁾. Entretanto, as cinco variáveis determinadas mostram que elas poderiam ser usadas na avaliação do grau de hipertrofia das fibras musculares após os exercícios físicos. Houve o maior fator de correlação entre os valores do diâmetro médio e do perímetro, podendo eles ser escolhidos com segurança para a morfometria das fibras. É intuitivo que se o corte das fibras for realizado transversalmente ao maior eixo das fibras, qualquer uma das variáveis determinadas neste trabalho poderia ser usada para estudo morfométrico. Este fato é esperado matematicamente, pois todas essas dimensões geométricas são proporcionais entre si. Fica como sugestão para um trabalho futuro testar esta metodologia em cortes histológicos realizados propositalmente de forma a não serem perpendiculares ao comprimento das fibras musculares.

CONCLUSÃO

A aplicação da presente metodologia matemática permitiu avaliar com segurança e maior eficiência e rapidez a ocorrência de hipertrofia das fibras dos ratos exercitados em esteira rolantes. Embora a mensuração do menor diâmetro das fibras descrita por Dubowitz⁽¹³⁾ represente um critério seguro neste campo da investigação, nossos resultados mostram que outras dimensões geométricas das fibras tal como o diâmetro médio podem ser utilizadas. Para tanto, faz-se necessário que a orientação do plano de corte do tecido durante a microtomia seja feita perpendicularmente ao eixo ao longo do comprimento da fibra.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, CNPq e FUNDUNESP pelo apoio financeiro ao projeto e à Dra. Ana M. Osório pela permissão do uso do microscópio óptico.

Todos os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* 1991;12:184-207.
2. Takekura H, Fujinami N, Nishizawa T, Ogasawara H, Kasuga N. Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2001;533:571-83.
3. Wernig A. Regeneration capacity of skeletal muscle. *Ther Umsch* 2003;60:383-9.
4. Argaw A, Desaulniers P, Gardiner PF. Enhanced neuromuscular transmission efficacy in overloaded rat plantaris muscle. *Muscle Nerve* 2004;29:97-103.
5. Jackson CG, Dickinson AL, Ringel SP. Skeletal muscle fibers area alterations in two opposing modes of resistance – exercise training in the same individual. *Eur J Appl Physiol* 1990;61:37-41.
6. Altman DG, Bland JM. Variables and parameters. *BJM* 1999;318:1667.
7. Heckman CA, Jamasbi RJ. Describing shape dynamics in transformed cells through latent factors. *Experimental cell research* 1999;246:69-82.
8. Velotto S, Guida G, Marino M, Mase G, Crasto A. Histomorphometrical and comparative analysis of three muscles of Buffalo (*Bubalus bubalis* L.). *J Anat Embryol* 2002;107:233-42.
9. Dal Pai V, Dal Pai SM, Carvalho ED, Fujihara CY, Gregório EA, Curi PR. On the growth characteristics of myotomal muscle fibers in the fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1888). *Anat Histol Embriol* 2000;29:283-9.

10. Dal Pai SM, Freitas EMS, Dal Pai V, Rodrigues AC. Morphological and histochemical study of the myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) during the initial phases of growth. Arch Fish Mar Res 2003;50:149-60.
11. Edstrom L, Nystrom B. Histochemical type and sizes of fibres in normal human muscles. A biopsy study. Acta Neurol Scand 1969;45:257.
12. Mattiello-Sver AC, Chimelli L, Teixeira S, Pierre M, Oliveira L. Effects of chronic heart disease on skeletal muscle fiber size. Braz J Med Biol Res 2005;38:303-7.
13. Dubowitz V. Histological and histochemical stains and reactions. Muscle biopsy: a modern approach. London: Saunders, 1973;20-102.
14. Perricone MA, Saldade V, Hyde DM. Quantitation of fibroblast population growth rate in situ using computerized image analysis. Microsc Res Tech 1995;31:257-64.
15. Oliveira Junior SA, Oliveira DAR, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Belangero WD. Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. [monografia]. Presidente Prudente: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, 2002.
16. Marshall S, Milligan A, Yates R. Experimental techniques and anesthesia in the rat and mouse. Anzccarte Facts Sheet Anzccart News 1994;7:4.
17. Dal Pai, V. Histologia: teoria e prática. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1995:50.
18. McManus JFA, Mowry RW. Staining methods: histologic and histochemical medical division. New York: Harper & Brother, 1960.
19. Box GEP, Draper NR. Empirical model-building and response surfaces. New York: John Wiley & Sons, 1987.
20. Der G, Everitt BS. A handbook of statistical analyses using SAS. London: Chapman-Hall, 2002.
21. Cody RP, Smith JK. Applied statistics and the SAS programming language. New York: Elsevier, 1987.
22. Paul AC, Rosenthal N. Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. J Cell Biol 2002;4:751-60.
23. Giddings CJ, Neaves WB, Goneya WJ. Muscle fiber turnover induced by prolonged weight-lifting exercise in the cat. Anat Rec 1985;211:133-41.
24. Goneya WJ. Exercise induced increases in muscle fiber number. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1986;55:137-41.
25. Dubowitz V, Brooke M. Muscle biopsy: a modern approach. London: W.B. Saunders, 1984.
26. Dubowitz V. Muscle biopsy: a practical approach. 2nd ed. London: Bailliere Tindall, 1985.

“ De acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do campus de Ribeirão Preto, USP-SP. Aprovado na reunião de 09/03/2005, protocolo número: 04.1.810.53.9” .