Paulo Henrique de Matos Alves

**Caracterização histoquímica das fibras do músculo gastrocnêmio
de ratos Wistar submetidos à tenotomia e tenorrafia**

São Paulo
2010

Paulo Henrique de Matos Alves

**Caracterização histoquímica das fibras do músculo gastrocnêmio
de ratos Wistar submetidos à tenotomia e tenorrafia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2345
FMVZ

Alves, Paulo Henrique de Matos

Caracterização histoquímica das fibras do músculo gastrocnêmico de
ratos Wistar submetidos à tenotomia e tenorrafia / Paulo Henrique de Matos
Alves. -- 2010.

144 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Músculo gastrocnêmio. 2. Microscopia eletrônica de transmissão.
3. NADH-tr. 4. Histoquímica. 5. Tipos de fibras musculares. I. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **21** nas fls. **68** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Edson Aparecido Liberti, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Caracterização histoquímica das fibras do músculo gastrocnêmio na desinserção e reinserção tendínea** do qual participou(aram) o(s) alunos **Paulo Henrique de Matos Alves, Regina de Sousa Bolina Matos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **26.03.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 30 de março de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Alves, Paulo Henrique de Matos

Título: Caracterização histoquímica das fibras do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar submetidos à tenotomia e tenorrafia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

**Processo
134252/2008 – 0**

DEDICO

Dedico este trabalho à minha esposa Regina.
Qualquer palavra, escrita ou falada, seria
incapaz de traduzir meus sentimentos
por você.

Aos meus pais Clêidina e Cotegeipe; pelo
esforço, dedicação e compreensão,
em todos os momentos desta e de
outras caminhadas.

AGRADEÇO ESPECIALMENTE...

A Deus

O senhor é meu pastor e nada me faltará
Salmo 23

Obrigado Senhor, Foi a tua mão que encontrei estendida, quando realmente precisei de um amigo em todos os momentos de grandes dificuldades

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

Nada nasce grande e toda a grandeza é fruto da busca incessante pela felicidade que só é conquistada através do trabalho, do espírito de fraternidade, respeito mútuo e amor ao próximo.

Autor desconhecido

A vida é construída diariamente por pequenos detalhes, assim como uma grande obra é construída tijolo por tijolo. São pequenas minúcias que valorizam e dão verdadeiro significado a nossa vida e, que constroem a história individual de cada um de nós e, isto temos aprendido no laboratório diariamente com os seus ensinamentos para a vida, mas não para qualquer vida e sim para uma vida digna. Obrigado por este aprendizado que, com certeza, é muito maior do que o aprendizado conquistado nesta pesquisa.

A minha família

Ninguém consegue ser feliz sozinho, já que a felicidade só é plena quando podemos sentir o brilho no olhar amigo e o sorriso nos lábios de quem está a nossa volta.

Autor desconhecido

Aprendi em minha vida com vocês, que a vida para ser grandiosa tem que haver renúncia, sacrifício, luta, disposição, respeito e acima de tudo muita humildade. Aprendi também que a grandeza de um grande homem está na sua simplicidade e na capacidade de proporcionar aos seus momentos de felicidade. E espero estar proporcionando felicidade neste momento de subida de um difícil degrau da vida acadêmica!

E a todos os meus familiares que pediram a Deus por mim e que mesmo de longe sempre se fizeram presentes

AGRADEÇO...

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, por proporcionar um desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e a esta coordenadoria pelo auxílio concedido.

À Professora Doutora **Maria Angélica Miglino**, pela oportunidade única aceitando-me como aluno do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo

À Professora Dra **Silvia de Campos Boldrini**, por sua competência e colaboração, pela serenidade e principalmente pelo carinho, amizade e aconselhamentos.

Aos companheiros do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e a Cirurgia – LAFACC/ICB/USP, **Aline, Ana Paula, Bruna, Carol, Cibeles, Diana, Eduardo, Fabiana, Flávio, Giovanna, Karina, Lynda, Josemberg, Josy, Leonardo Liberti, Lucilene, Marcelo, Márcio, Mariana, Maritza, Nathália, Ricardo Eustáquio, Ricardo Fontes, Ricardo Bandeira, Sabrina, Thelma, Thiago e Valquíria**, pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração por ocasião de algumas coletas e processamento de materiais tornando o trabalho menos árduo e por todos os dias da semana que passamos juntos durante todo o tempo destinado à realização desta dissertação.

Relativamente aos companheiros de laboratório agradeço especialmente à **Flávia de Oliveira, ao Willian Mayer e ao Adriano Ciena** que outrora e com muita paciência me ajudaram no início e no decorrer desta pesquisa. Obrigado por todas as informações e ajuda durante os procedimentos experimentais.

As amigas **Luciana (Byllu) e Luciana (Lú)**, a amizade de vocês foi importante para vencer esse desafio.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, **Ricardo Bandeira, Alessandro Rodrigo Martins, Fábio França e Renivaldo de Souza**.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Anatomia, **Sebastião Boleta, Sônia Regina Yokomizo e Marta Maria Righetti** pela paciência, dedicação e auxílio com as técnicas histológicas e ultraestruturais.

Finalmente agradeço aos componentes da Banca de Avaliação desta Dissertação, Professores Doutores **Edson Aparecido Liberti, Flávia de Oliveira, Silvia de Campos Boldrini, Eduardo Pompeu, José Roberto Kfoury Jr e Rose Eli Grassi Rici** pela disponibilidade. Muito obrigado!

**Se o tendão calcâneo fosse lesado ou cortado,
além de causar febre, induziria ao choque,
desestruturaria a mente e em sua evolução
acabaria trazendo a morte**

Hipócrates

RESUMO

ALVES, P. H. M. **Caracterização histoquímica das fibras do músculo gastrocnêmio em ratos Wistar submetidos à tenotomia e tenorrafia.** [Histochemical characterization of gastrocnemius muscle fibers in Wistar rats submitted to tenotomy and tenorrhaphy]. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As lesões tendíneas são uma das mais comuns que ocorrem nos esportes, sua frequência é de 10 a 55% de todas as lesões ocorridas. A cabeça medial do músculo gastrocnêmio (GCm) é constituído por duas regiões bem distintas: uma região profunda "vermelha" e uma região superficial "branca". Dada essa característica de distribuição dos tipos de fibras, torna-se possível determinar se, no mesmo músculo, a tenotomia afeta as fibras de maneira diferente, dependendo do tipo de fibra predominante em cada região. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da tenotomia e tenorrafia experimental na GCm. Foram usados 38 ratos Wistar machos pesando aproximadamente 300 g divididos em três grupos: Controle (C), Tenotomizado (T) e Tenorrafado (R), avaliados aos 14 e 21 dias pós-cirurgia. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de alojamento, alimentação, temperatura umidade e luz. No grupo T, o tendão calcâneo do membro pélvico esquerdo foi dissecado e seccionado transversalmente no terço médio. No grupo R, este mesmo tendão foi imediatamente submetido à sutura de Kessler modificada após a tenotomia. Foram realizadas seções de 10 µm de espessura em criostato e, em seguida, estas seções foram submetidas às técnicas da hematoxilina e eosina, picro-sirius, NADH-tr e para análise em microscopia eletrônica de transmissão. A significância estatística das diferenças inter-grupos foi determinada pela análise de variância, (ANOVA) e foi aceito $p < 0,05$. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos C, T e R. Observou-se uma grande variação no tamanho e formato das fibras musculares e, ainda, uma desorientação e degeneração das miofibrilas e desorganização dos sarcômeros nos animais do grupo T. Ambos os grupos, T e R, apresentaram diminuição da área de secção transversa e comprimento da GCm.

Palavras-chave: Músculo gastrocnêmio. Microscopia eletrônica de transmissão. NADH-tr. Histoquímica. Tipos de fibras musculares.

ABSTRACT

ALVES, P. H. M. **Histochemical characterization of gastrocnemius muscle fibers in Wistar rats submitted to tenotomy and tenorrhaphy.** [Caracterização histoquímica das fibras do músculo gastrocnêmio em ratos Wistar submetidos à tenotomia e tenorrafia]. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Tendon injuries are one of the most commonly occurring in sports, its frequency is 10 to 55% of all injuries. The medial head of gastrocnemius muscle (GCm) consists of two clearly distinct regions: a deep region “red” and, a superficial region “white”. Because of that characteristic distribution of fiber types, it becomes possible to determine if the same muscle tenotomy affects differently, depending on the predominant fiber type in each region. The aim of this study was to evaluate the effect of experimental tenotomy and tenorrhaphy on GCm. We used 38 male Wistar rats weighing approximately 300 g divided into three groups: control (C), tenotomized (T) and Tenorrhaphized (R). They were evaluated at 14 and 21 days after the surgery. Animals were kept under the same conditions of accommodation, feeding, temperature, humidity and light. In T group, calcaneal tendon of the left pelvic limb was dissected and sectioned in the middle third. In R group, the same tendon was immediately submitted to the modified Kessler suture after tenotomy. Sections were performed in 10 µm thick in a cryostat and they were then stained according to hematoxylin and eosin, Picrosirius, NADH-tr methods and they were analyzed by transmission electron microscopy. The statistical significance of inter-group differences was determined by analysis of variance (ANOVA) and was accepted $p < 0.05$. Significant differences were found between C, T and R groups. There was a wide variation in size and shape of muscle fibers and also a disorientation and degeneration of myofibrils and disorganization of sarcomeres in T group. Both T and R groups showed a decrease in cross-sectional area and length of the GCm.

Key word: Gastrocnemius muscle. Transmission electron microscopy. NADH-tr. Histochemistry. Muscle fiber type.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características estruturais, bioquímicas e morfofuncionais das fibras musculares esqueléticas Tipo I, IIA e IIB.....	30
Figura 2	Distribuição do número de animais, de acordo com o grupo e o tempo pós-operatório.....	38
Figura 3	Esquema do procedimento para a obtenção dos espécimes utilizados nesta pesquisa.....	38
Figura 4	Técnica utilizada para a tenorrafia.....	39
Figura 5	Procedimento cirúrgico.....	40
Figura 6	Procedimentos para a obtenção das partes da GCm.....	42
Figura 7	Seqüência de obtenção e de preparação histológica da GCm, onde foram determinadas as localizações dos campos para a mensuração da DF e AST das fibras musculares.....	45
Figura 8	Determinação da AST da GCm.....	46
Figura 9	Determinação da AST das fibras musculares da GCm.....	47
Figura 10	Determinação da densidade de fibras musculares da GCm.....	48
Figura 11	Secção transversa da GCm de ratos dos grupos C14 (A,B); T14 (C,D) e R14 (E,F)	52
Figura 12	Secção transversa da GCm de ratos dos grupos C21 (A,B); T21 (C,D) e R21 (E,F)	54
Figura 13	Secção transversa da GCm de ratos dos grupos C14 (A), C21(B), T14 (C), T21 (D), R14 (E) e R21 (F) evidenciando o tecido colágeno.....	56
Figura 14	Secção transversa da GCm de ratos dos grupos C14 (A-C); T14 (D-F); R14 (G-I); T21 (J-L) e R21 (M-O). (Picro-sirius sob luz polarizada).....	58
Figura 15	Secção transversa da GCm de ratos do grupo C14; fibra glicolítica (G), fibra glicolítica-oxidativa (GO) e oxidativa (O). (NADH-tr).....	59
Figura 16	Corte transversal em pequeno aumento.....	61
Figura 17	Microscopia eletrônica de transmissão da GCm dos grupos de 14 dias.....	63

Figura 18	Microscopia eletrônica de transmissão da GCm dos grupos de 21 dias.....	65
Figura 19	Média e desvio padrão do Peso Final – Peso Inicial da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	66
Figura 20	Média e desvio padrão do Peso da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	67
Figura 21	Média e desvio padrão do Comprimento da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	68
Figura 22	Média e desvio padrão da AST da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	69
Figura 23	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares (μm^2) na região S dos grupos avaliados com 14 dias.....	70
Figura 24	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 14 dias.....	71
Figura 25	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 14 dias.....	72
Figura 26	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região S dos grupos avaliados com 21 dias.....	73
Figura 27	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 21 dias.....	74
Figura 28	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 21 dias.....	75
Figura 29	Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 14 dias.....	76
Figura 30	Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 14 dias.....	77
Figura 31	Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 14 dias.....	78
Figura 32	Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 21 dias.....	79
Figura 33	Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 21 dias.....	80
Figura 34	Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 21 dias.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e desvio padrão do Peso Final – Peso Inicial da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	66
Tabela 2	Média e desvio padrão do Peso da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	67
Tabela 3	Média e desvio padrão do Comprimento da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	68
Tabela 4	Média e desvio padrão da AST da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.....	69
Tabela 5	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região S dos grupos avaliados com 14 dias.....	70
Tabela 6	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 14 dias.....	71
Tabela 7	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 14 dias.....	72
Tabela 8	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região S dos grupos avaliados com 21 dias.....	73
Tabela 9	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 21 dias.....	74
Tabela 10	Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 21 dias.....	75
Tabela 11	Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 14 dias.....	76
Tabela 12	Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 14 dias.....	77
Tabela 13	Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 14 dias.....	78
Tabela 14	Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 21 dias.....	79
Tabela 15	Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 21 dias.....	80
Tabela 16	Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 21 dias.....	81

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	área de secção transversa
ATPase	adenosina trifosfatase
C	grupo controle
EDL	extensor digital longo
fl	fibular longo
G	glicolítica
GCM	cabeça medial do músculo gastrocnêmio
GO	glicolítica-oxidativa
HE	hematoxilina-eosina
In	região intermediária
ME	microscopia eletrônica
MHC	miosina de cadeia pesada
NADH-tr	nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase
NBT	nitro blue tetrazolium
O	oxidativas
P	região profunda
R	grupo tenorafiado
S	região superficial
T	grupo tenotomizado
ta	tibial anterior

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	22
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1	Reparo tendíneo.....	24
3.2	O Sistema muscular.....	26
3.3	Tipos de fibras musculares.....	27
3.4	Plasticidade do músculo esquelético.....	31
3.5	O Músculo gastrocnêmio do rato.....	33
3.6	Repercussões da tenotomia e tenorrafia na morfologia muscular..	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Delineamento para a tenotomia e a tenorrafia.....	39
4.2	Período pós-cirúrgico.....	40
4.3	Peso e sacrifício dos animais.....	41
4.4	Dissecação: individualização e obtenção da cabeça medial do músculo gastrocnêmio.....	41
4.5	Procedimentos histológicos.....	42
4.6	Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	43
4.7	Estudo morfométrico.....	44
4.7.1	Área das secções transversas da GCm.....	45
4.7.2	Área das secções transversas das fibras musculares.....	46
4.7.3	Densidade das Fibras Musculares.....	47
4.8	Tratamento estatístico.....	48
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Aspectos clínicos.....	50
5.2	Análise qualitativa.....	51
5.2.1	Microscopia de luz.....	51
5.2.1.1	<i>Hematoxilina-eosina e picro-sirius.....</i>	<i>51</i>
5.2.1.2	<i>Histoquímica para a NADH-tr.....</i>	<i>59</i>
5.2.2	Ultraestrutura das fibras musculares.....	62

5.3	Análise quantitativa.....	66
5.3.1	Peso dos animais.....	66
5.3.2	Peso da GCm.....	67
5.3.3	Comprimento da GCm.....	68
5.3.4	Área de Secção Transversa da GCm.....	69
5.3.5	Área da Secção Transversa das fibras musculares.....	70
5.3.5.1	<i>AST das fibras na região S dos grupos avaliados com 14 dias.....</i>	<i>70</i>
5.3.5.2	<i>AST das fibras na região In dos grupos avaliados com 14 dias.....</i>	<i>71</i>
5.3.5.3	<i>AST das fibras na região P dos grupos avaliados com 14 dias.....</i>	<i>72</i>
5.3.5.4	<i>AST das fibras na região S dos grupos avaliados com 21 dias.....</i>	<i>73</i>
5.3.5.5	<i>AST das fibras na região In dos grupos avaliados com 21 dias.....</i>	<i>74</i>
5.3.5.6	<i>AST das fibras na região P dos grupos avaliados com 21 dias.....</i>	<i>75</i>
5.3.4	Densidade das fibras musculares.....	76
5.3.4.1	<i>DF na região S dos grupos avaliados com 14 dias.....</i>	<i>76</i>
5.3.4.2	<i>DF na região In dos grupos avaliados com 14 dias.....</i>	<i>77</i>
5.3.4.3	<i>DF na região P dos grupos avaliados com 14 dias.....</i>	<i>78</i>
5.3.4.4	<i>DF na região S dos grupos avaliados com 21 dias.....</i>	<i>79</i>
5.3.4.5	<i>DF na região In dos grupos avaliados com 21 dias.....</i>	<i>80</i>
5.3.4.6	<i>DF na região P dos grupos avaliados com 21 dias.....</i>	<i>81</i>
6	DISCUSSÃO.....	83
6.1	Modelo experimental.....	83
6.2	Considerações sobre os resultados qualitativos e quantitativos...	85
7	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	95
	ANEXO.....	114

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As características genéticas, morfofisiológicas e bioquímicas distintas (DUBOWITZ; PEARSE, 1960), juntamente com a distribuição e frequência dos tipos de fibras, conferem ao tecido muscular uma ampla diversidade estrutural e funcional (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994; PETTE; STARON, 2000). Em adição, as fibras musculares exibem uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas e funcionais, em resposta a estímulos específicos (PETTE; STARON, 2000; MAGAUDDA et al., 2004).

A ruptura do tendão calcâneo, além de ser uma lesão grave, é uma das mais comuns dentre as lesões tendíneas (STHENO-BITTEL et al., 1998). Reynolds e Worrel (1991) relatam que as grandes incidências de lesão no tendão calcâneo ocorrem em esportes de alto impacto, como a corrida e o salto, pois nessas atividades o tendão do gastrocnêmio e do sóleo é bastante estressado durante a contração muscular excêntrica.

A reparação tendínea tem início logo após a lesão; esta passa por diferentes etapas de cicatrização as quais, por sua vez, constam de diversos eventos de reparo que podem ser avaliados ultraestruturalmente (ENWEMEKA, 1989).

Os padrões de sutura ideais para as tenorrafias devem prover uma junção tendínea mais resistente à tensão de tração com formação mínima de espaço; apresentar adesões reduzidas e não interferir na cicatrização; preservar a irrigação sangüínea intrínseca do tendão e resistir aos rigores do movimento precoce (EASLEY et al., 1991; GREENWALD; HONG; MAY, 1994; MORAES, 2001).

Embora diferentes estudos tenham detalhado as propriedades bioquímicas e arquiteturais dos músculos após a tenotomia, e seus resultados incorporados no meio clínico, pouca informação está disponível considerando a resposta biológica e mecânica dos músculos, à tenorrafia (JAMALI et al., 2000). Estas têm sido avaliadas, experimentalmente, com propósitos diferentes, como por exemplo, avaliar os efeitos histológicos de fios de sutura nos tendões; a força de tensão variando com o tipo de fio de sutura (CARLSTEDT; SKAGERVALL, 1986), e o tipo de técnica utilizada (GREENWALD; HONG; MAY, 1994).

Com vistas a se analisar os efeitos da tenotomia no ventre muscular, McLachlan (1983); Maxwell, Moody e Enwemeka (1992) e Fabis, Danilewicz e

Omulecka (2001) relataram uma diminuição no diâmetro das fibras musculares e aumento do tecido conjuntivo, assim como uma maior percentagem de fibras do tipo II.

Castle e Reyman (1984) ao avaliar os tipos de fibras em músculos de cães submetidos à tenotomia com posterior tenorrafia e transferência tendínea, não observaram alterações significativas quanto ao padrão de distribuição dos tipos de fibras. Todavia, nos animais submetidos à tenorrafia e transferência do tendão, verificaram um aumento do percentual das fibras tipo I e, conseqüentemente, uma diminuição das fibras do tipo II. Após 27 meses, os músculos dos cães submetidos à tenorrafia exibiram quase completa reversão da composição das fibras, ao passo que, aqueles submetidos à transferência tendínea, demonstraram uma persistência no padrão de alteração dos tipos de fibras, sugerindo uma tendência dos mesmos a permanecerem com as características do músculo original do local da inserção.

Considerando-se, particularmente em relação ao comportamento da distribuição dos tipos de fibras no ventre muscular, ou mesmo o tipo de tensão por ele exercida podem alterar o padrão dessa distribuição, o presente estudo tem por objetivo fundamental avaliar a plasticidade muscular relativa a esses fatores.

A escolha do músculo gastrocnêmio do rato, fundamenta-se no fato de o mesmo oferecer a vantagem de ter uma localização superficial, minimizando ao máximo o trauma cirúrgico e facilitando, assim, a execução da técnica experimental. Por fim, julga-se pertinente a escolha deste modelo experimental por proporcionar a obtenção de resultados reprodutíveis em humanos e animais que venham a ter lesões tendíneas, com implicações clínicas nos campos da cirurgia geral, ortopedia e fisioterapia.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar, na cabeça medial do músculo gastrocnêmio (GCm) de ratos jovens submetidos à tenotomia e posterior tenorrafia.

Qualitativamente:

- os aspectos das fibras musculares, e do tecido conjuntivo associado;
- os tipos de fibras musculares, através de métodos histoquímicos;
- as características ultraestruturais dos componentes musculares;

Quantitativamente:

- a área das secções transversas (AST) do músculo;
- a AST das fibras musculares;
- a densidade das fibras musculares (DF).

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os tendões são estruturas anatômicas interpostas entre os músculos e ossos. Sua função é transmitir a força criada no músculo para os ossos tornando possível o movimento articular. Tendões normais são brancos e brilhantes e possuem uma textura fibroelástica, mostrando grandes resistências à cargas mecânicas (BIRK; TRELSTAD, 1986; STOLINSKI, 1995; MCNEILLY et al., 1996; JÓZSA; KANNUS, 1997; KHAN et al., 1999).

Desde que foi descrito por Ambroise Paré em 1575 (CETTI et al., 1993), a ruptura do tendão calcâneo tem sido alvo da atenção de muitos pesquisadores. Segundo Soma e Mandelbaum (1995), 75% de todas as rupturas do tendão calcâneo ocorrem em atletas com idades entre 30 e 40 anos. A maior frequência de rupturas ocorre em esportes como o futebol, e atletismo (REYNOLDS; WORREL, 1991).

3.1 Reparo tendíneo

As fases da reparação tendínea incluem inflamação, proliferação e maturação ou remodelamento (STADLER et al., 2001). Porém o tecido tendíneo possui baixa capacidade de regeneração devido a sua baixa vascularidade, oxigenação e nutrição, quando comparado, por exemplo, ao tecido muscular (ENWEMEKA, 1989; ENWEMEKA et al., 1990; ENWEMEKA, 1991; GUM et al., 1997; PARIZOTTO, 1998; REDDY et al., 1998; ENWEMEKA e REDDY, 2000).

De acordo com Enwemeka (1989); Kuschner et al. (1991); Enwemeka e Spielholz, (1992) e Józsa; Kannus, (1997), o processo de reparação se dá em 3 fases distintas, entretanto sobrepostas:

1. Fase inflamatória ou exudativa vascular = inicia-se imediatamente após a lesão, sendo uma resposta natural do organismo ao trauma lesivo. As células inflamatórias atuam principalmente para a limpeza da área lesada de tecido

necrótico e microorganismos. Esse objetivo é alcançado por volta do 5º ao 7º dia pós-lesão e a partir daí inicia-se, então, a fase proliferativa.

2. Fase proliferativa e neoangiogênica = A fase proliferativa inicia-se com o acúmulo de fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais na área lesada. A migração e a proliferação dessas células são estimuladas por fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e macrófagos teciduais. Gelberman (1985) observou o aparecimento de novos vasos sanguíneos em tendões lesados por volta do 7º dia após a lesão. Toda esta fase acontece de 5 a 21 dias pós-lesão.

3. Fase de remodelamento = O tecido muda gradualmente de celular para fibroso, com grande quantidade de fibras colágenas. Quando a cicatriz encontra-se completamente madura, cerca de 3% de seus elementos são celulares (fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos) e o restante é colágeno. Há um aumento na força da cicatriz e um aumento da estabilidade das ligações intermoleculares.

Estudos relatam que o processo de remodelamento inicia-se por volta da 2ª semana de cicatrização e se estende por um período de 1 ano ou mais (JÓZSA; KANNUS, 1997), sendo este, cerca de trinta semana para uma tenotomia parcial (POSTACCHINI; DE MARTINO, 1980).

Józsa e Kannus (1997) acreditam que o tendão lesado leva cerca de 4 a 12 meses para alcançar uma boa força tensiva, porém o tecido tendíneo lesado nunca conseguiria atingir uma morfologia e função biomecânica de tendões normais.

Segundo Chan et al. (1997), o reparo de tendões é similar a outros processos de reparação que ocorrem com outros tecidos biológicos. Na sequência do reparo há proliferação e migração de vários tipos de células, síntese de colágeno e angiogênese para a formação do tecido de granulação, e por fim, orientação das células do tendão e fibras de colágeno de maneira altamente organizada na tentativa de restaurar a estrutura e função do tendão lesado.

3.2 O Sistema muscular

O sistema Muscular é um sistema de células contráteis que envolvem um elevado grau de interação entre as proteínas de actina e miosina. Composto, nos mamíferos, por quatro células especializadas: células do músculo esquelético, células do músculo cardíaco, células do músculo liso e células mioepiteliais, diferenciadas entre si em estrutura e função (ALBERTS et al., 1997). São altamente adaptados para desempenharem diversas funções como a locomoção, o desenvolvimento de tensão, manutenção da postura e até transdução de energia, na medida em que transforma a energia química armazenada em energia mecânica química em energia mecânica (CLOSE, 1972).

Genericamente, os músculos esqueléticos podem ser classificados em músculos de contração rápida, mais adaptados aos trabalhos de curta duração e velocidade e músculos de contração lenta, adequados aos trabalhos de duração prolongada e de sustentação, de acordo com o tipo predominante de fibra muscular (EDGERTON; SIMPSON, 1969; GUTH; SAMAHA; ALBERTS, 1970). Em geral, os músculos de contração lenta são responsáveis pela manutenção da postura, e os músculos de contração rápida, pela execução de movimentos articulares (HUGHES; BLAU, 1992).

O músculo estriado esquelético dos vertebrados origina-se dos somitos e da lâmina mesodérmica precordial, realizando sua diferenciação terminal junto ao ciclo celular, em um dinâmico processo que envolve muitas proteínas reguladoras (ZACKSENHAUS et al., 1996). Salgado (1999), afirma ser o músculo esquelético a maior estrutura do corpo humano, uma vez que este ocupa, aproximadamente, 40% do peso corporal total.

Os músculos estriados são compostos por fibras, as quais se desenvolvem durante a embriogênese por fusão de mioblastos mononucleados, formando células multinucleadas (HUGHES; BLAU, 1992). A diferenciação do músculo esquelético é controlado estritamente por fatores de transcrição miogênica (MyoD, Myf5, miogenina e MFR4) e por fatores de transcrição denominado de fator-2 de crescimento de miócitos (MEF2A – MEF2D). As proteínas MyoD e Myf5 são expressas durante a proliferação de mioblastos não diferenciados e são ativadas

para iniciar a diferenciação músculo-esquelética, que finalmente conduz à fusão dos mioblastos, resultando em miotubos multinucleados (GUTTRIDGE et al., 2000).

Para Alberts et al. (1997), as células do músculo estriado esquelético geram forças contráteis por meio de sistemas de filamentos organizados, actina e miosina. No ser humano adulto apresentam tamanho aproximado entre 2 e 3 cm de comprimento e 100 mm de diâmetro, sendo freqüentemente referidas como fibras musculares, devido à sua forma altamente alongada.

As fibras musculares constituintes do músculo estriado esquelético apresentam-se perfiladas, de tal forma que os pontos com a mesma densidade encontram-se alinhados, dando a aparência de discos cruzando toda a espessura da fibra muscular. Diferenças ocorrem quando em presença de lesão, onde se observa desarranjo no alinhamento das fibras musculares (SALGADO, 1999),

Bornemann, Maier e Kuschel (1999), afirmam que não ocorre aumento no número de fibras musculares após o período pós-natal e que o crescimento do músculo estriado esquelético se dá pelo aumento do diâmetro transversal da fibra muscular. Ou seja, as células do músculo estriado esquelético não apresentam capacidade mitótica; assim, lesões que comprometem a integridade da fibra muscular podem causar danos irreversíveis ao aparelho locomotor.

Segundo Carlson (1986), a regeneração do músculo esquelético do homem é limitada, e se a lesão for grande, a regeneração pode não ocorrer, e o músculo perdido, será substituído por tecido conjuntivo. A lesão no músculo esquelético pode ter regeneração após lesão parcial ou total da fibra muscular e esta regeneração está associada a três fatores: população de células satélites, reinervação e revascularização (BODINE-FOWLER, 1994).

3.3 Tipos de fibras musculares

No membro inferior é possível encontrar os dois tipos de fibras musculares em todos os músculos, diferindo apenas a proporção entre esses dois tipos de fibras, fato que caracteriza o padrão contrátil do músculo estriado esquelético. Porém, músculos em regiões tipicamente superficiais apresentam maiores quantidades de fibras de contração rápida quando comparados aos músculos de

regiões mais profundas, como aqueles adjacentes às estruturas ósseas (HUGHES; BLAU, 1992).

Diferentes classificações têm sido usadas por muitos pesquisadores para identificar os tipos de fibras musculares (BARNARD et al., 1971; SMERDU et al., 1995). Os aspectos metabólicos de cada fibra ou o agrupamento de fibras musculares esqueléticas podem ser avaliados por técnicas histoquímicas como a adenosina trifosfatase (ATPase) e nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase (NADH-tr), permitindo diferenciar os diferentes tipos (STEIN e PADYKULA, 1962; WERNECK, 1981; ROSE; ROTHSTEIN, 1982; DUBOWITZ, 1985; PETTE; STARON, 1997).

A miosina é o motor molecular da contração no músculo esquelético. Ela é uma proteína-chave na determinação do tipo de fibra e tem um papel vital na função muscular, como resultado de sua interação com actina. Cada molécula de miosina contém seis subunidades de cadeias, duas cadeias pesadas e quatro miosinas de cadeias leves (MLC). A miosina de cadeia pesada (MHC) tem importante significado funcional relacionado com a velocidade máxima de contração da fibra muscular. (BOTTINELLI et al., 1994). Muitos músculos são um mosaico dessas fibras, enquanto outros são predominantemente lentos ou rápidos.

A diferenciação dos tipos de fibras inicia-se gradativamente a partir da 22ª semana de vida fetal, após a inervação já estar estabelecida. Inicialmente existem apenas fibras semelhantes ao tipo 2c. Somente após a 30ª semana de vida fetal é possível diferenciar os três tipos de fibras e identificar o padrão em mosaico característico, quando as fibras já são capazes de expressar isoformas de MHC com contração rápida. Já no nascimento observa-se uma proporção dos vários tipos de fibras similar à do adulto, exceto que o recém nascido possui até 20% de fibras indiferenciadas (2c) enquanto o adulto apenas 1 - 2% (SARNAT, 1982; ELDER e KAKULAS, 1993; CARPENTER; KARPATTI, 2001).

Ranvier¹ (1873 apud EDGERTON; SIMPSON, 1969, p. 1) descreveu pela primeira vez as fibras vermelhas e brancas e que estas eram morfologicamente diferentes, sendo que os dois tipos de fibras poderiam estar misturados em um mesmo músculo. Ogata (1958) classificou as fibras musculares em vermelhas, intermediárias e brancas. Brooke e Kaiser (1970) reconheceram, três tipos principais

¹RANVIER, L. Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs, chez les lapins et chez les rales. *Acad. Sci.* v. 77, p.1030, 1873.

de fibras musculares, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB, reconhecendo ainda, um terceiro subtipo de fibras do tipo II, que foram denominadas como fibras IIC de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase na porção globular da miosina.

Brooke, Williamson e Kaiser (1971), sugeriram que as fibras IIC são precursoras das fibras do tipo I, bem como das fibras do tipo IIA e IIB. Isto foi confirmado pelo estudo histoquímico baseado no desenvolvimento do músculo esquelético humano. Esses autores relataram que as fibras indiferenciadas durante a primeira fase de desenvolvimento são as do tipo IIC e que, após 20 semanas de gestação, as fibras do tipo I começaram a aparecer. Após 30 semanas de gestação, surgiram as dos tipos IIA e IIB. Descreveram ainda que, ao nascimento, o processo de diferenciação não se encontra completo, existindo cerca de 15 a 20% de fibras IIC indiferenciadas e que a proporção de fibras IIA é ainda maior do que a de fibras IIB (FARKAS-BARGETON et al., 1977; COLLING-SALTIN, 1978). De acordo com Dubowitz (1985) as fibras do tipo IIC são raras no músculo normal humano, porém, estão presentes no músculo em desenvolvimento e podem ocorrer em circunstâncias patológicas.

Alguns autores correlacionaram o tipo histoquímico de fibras musculares com suas funções fisiológicas, resultando em um diferente sistema de nomenclatura. Esses trabalhos aceitaram a classificação em vermelhas, brancas e intermediárias, com base na reação histoquímica por adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase (NADH-tr), isto é, com reatividade forte, fraca e intermediária, respectivamente (BARNÁRD et al., 1971).

Peter e Wolf (1972) sugeriram que as fibras deveriam ser mais apropriadamente nomeadas como oxidativas lentas (SO), glicolíticas rápidas (FG) e glicolíticas-oxidativas rápidas (FOG). Burke, Levine e Zajac (1971) identificaram três tipos de fibras da unidade motora com base na sua velocidade de contração e resistência à fadiga e, que foram designadas como S (Contração lenta), FR (Contração rápida, resistente à fadiga) e FF (Contração rápida, sensível à fadiga), sendo a S correspondente a fibra do tipo 1, a FR a do tipo IIA e a FF a do tipo IIB.

Os avanços nas técnicas de histoquímica e imunohistoquímica permitiram a identificação de sete tipos de fibras musculares no ser humano, baseadas na integridade de coloração para ATPase ou conjugação com anticorpos específicos:

tipo I, Ic, Ilc, Ilac, Ila, Ilab e I Ib (HÄMÄLÄINEN; PETTE, 1993; SCOTT; STEVENS; MACLEOD, 2001).

Considerando vários parâmetros descritos para identificar os diferentes tipos de fibras musculares, tais como: as diferenças nas isoformas das MHCs, o perfil das enzimas metabólicas, as características bioquímicas e fisiológicas, e suas propriedades estruturais e contráteis de acordo com Peter; Barnárd; Edgerton, (1972); Simoneau e Bouchard (1995); Pette e Staron (2001) e D'Antona et al. (2006) tem sido utilizada uma nomenclatura geral para classificar os diferentes tipos de fibras musculares (Figura 1).

1 - Fibras de contração lenta: Tipo I (slow-twitch fibers), dependentes do metabolismo oxidativo (SO – slow oxidative).

2 - Fibras de contração rápida: Tipo IIA (fast-twitch fibers), dependentes do metabolismo oxidativo e glicolítico (FOG – fast oxidative and glycolytic).

3 - Fibras de contração rápida: Tipo IIB (fast-twitch fibers), dependentes do metabolismo glicolítico (FG – fast-twitch glycolytic).

CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES			
Características	Tipos de Fibras		
	Contração Rápida		Contração Lenta
	Tipo IIB (FG)	Tipo IIA (FOG)	Tipo I (SO)
Morfologia			
Cor	Branca	Branca/Vermelha	Vermelha
Área da fibra	Grande	Intermediária	Pequena
Capilares/mm ²	Baixo	Intermediário	Alto
Densidade mitocondrial	Baixa	Intermediária	Alta
Substratos Energéticos			
Reserva de fosfocreatina	Alta	Alta	Baixa
Reserva de glicogênio	Alta	Alta	Baixa
Reserva de triglicerídeos	Baixa	Média	Alta
Histoquímica e Bioquímica			
Atividade da mATPase	Alta	Alta	Baixa
Atividade de enzimas glicolíticas	Alta	Alta	Baixa
Atividade de enzimas oxidativas	Baixa	Média/Alta	Alta
Capacidade Glicolítica	Alta	Alta	Baixa
Capacidade Oxidativa	Baixa	Média/alta	Alta
Função e Contratilidade			
Velocidade de contração	Rápida	Rápida	Lenta
Velocidade de relaxamento	Rápida	Rápida	Lenta
Resistência à fadiga	Baixa	Moderada/alta	Alta
Produção de força	Alta	Intermediária	Baixa
Elasticidade	Alta	Alta	Baixa

Fonte: Adaptado de Kraus, Torgam e Taylor (1994)

Figura 1 – Características estruturais, bioquímicas e morfofuncionais das fibras musculares esqueléticas Tipo I, IIA e IIB

Sher e Cardasis (1976) baseado na reação da ATPase, com pré-incubação em pHs diferentes, relata a presença de 3 tipos de fibras musculares (I, IIA e IIB) no músculo gastrocnêmio do camundongo adulto apresentando um padrão de distribuição típico em 3 zonas:

1 - Zona externa: compreende a maior parte do músculo, ocupando a periferia e a metade externa. Observa-se uma coloração mais clara, sendo composta quase totalmente por fibras IIA (94%), com uma pequena fração de fibras tipo IIB (6%), gradualmente maior na proximidade da zona média.

2 - Zona média: apresenta uma coloração intermediária, com 28% de fibras do tipo IIB e 3% do tipo I e predomínio das fibras do tipo IIA (69%).

3 - Zona interna: situa-se na porção profunda do músculo, apresenta uma coloração mais escura e é dividida em duas partes, cada uma delas separada pela zona média. As fibras apresentam um padrão de distribuição em mosaico, com 25% de fibras tipo I e 15% do tipo IIA, e predomínio das fibras II (61%).

3.4 Plasticidade do músculo esquelético

Os músculos esqueléticos são constituídos por uma população heterogênea de fibras com propriedades variáveis de resistência à fadiga e velocidade de contração, permitindo uma ampla variedade de capacidades realizadas por este sistema de forma a poderem ajustar-se eficazmente as demandas permanentes e variadas de força, resistência e velocidade na contração. As fibras musculares podem adaptar-se alterando a composição dos tipos de fibras, bem como seu diâmetro (GUTH; SAMAHA; ALBERTS, 1970; HUGHES; BLAU, 1992; HÄMÄLÄINEN; PETTE, 1993; SMERDU et al., 1995; SCOTT; STEVENS; MACLEOD, 2001).

A diversidade funcional e metabólica dos diferentes tipos de fibras confere ao músculo esquelético uma alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais (CAMPOS et al., 2002). Contudo, as fibras musculares exibem uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, como resposta a estímulos específicos (HUGHES; BLAU,

1992; PETTE; STARON, 2000; SCOTT; STEVENS; MACLEOD, 2001; FLUCK; HOPPELER, 2003; ERZEN, 2004; MAGAUDDA et al., 2004). Erzen (2004) relatou que o músculo esquelético é uma estrutura muito plástica e com grande potencial de regeneração promovido por células satélites que são as únicas células do músculo capaz de se multiplicar e promover novas fibras musculares. Alguns autores utilizando agente miotóxico, transporte homotópica e heterotópica e estimulação elétrica de alta frequência conseguiram transformar completamente um músculo rápido em um músculo lento (SNOJ-CVETKO et al., 1996 a,b; ERZEN et al., 2000).

Com relação à plasticidade muscular esquelética, esta tem sido investigada em diferentes situações, tais como: tenotomia do calcâneo (HNÍK et al., 1963; HNÍK, 1964; KARPATI; CARPENTER; EISEN, 1972; BAKER; HALL-CRAGGS, 1980; BAKER; MARGOLIS 1987; JÓZSA et al., 1988; JÓZSA et al., 1990; JAKUBIEC-PUKA et al., 1992; CETTI; HENRIKSEN; JACOBSEN, 1994; TROOP et al., 1995; JAMALI et al., 2000; KROCHMAL; KUZON; URBANCHEK, 2008), transferência de tendão (CASTLE; REYMAN, 1984), intervenção nutricional (MOURA et al., 2002; WILLOUGHBY; ROSENE, 2003; ANDERSEN et al., 2005; OLIVEIRA, 2006; SILVADO; WERNECK, 2006), imobilização (JÓZSA et al., 1988; JÓZSA et al., 1990; BARRY et al., 1994; MAYER, 2008), estimulação elétrica (SIMONEAU; PETTE, 1988), denervação (GUTMANN; MELICHNA; SYROVY, 1972; MCLACHLAN, 1983), reinervação cruzada (BULLER; LEVINE; ZAJAC, 1960), treinamento de resistência (DEMIREL et al., 1999), treinamento de força (HARBER et al., 2004), queimadura (OLIVEIRA, 2006), microgravidade (CAIOZZO et al., 1996; FITTS; RILEY; WIDRICK, 2001), tratado com agente miotóxico (MAURO, (1961); SNOJ-CVETKO et al., 1996 a,b; ERZEN et al., 2000), envelhecimento (KLITGAARD et al., 1990; FRONTERA et al., 1991) e fatores hormonais (CAIOZZO; HERRICK; BALDWIN, 1992; ADAMS et al., 1999).

Entretanto, ainda que a inervação e outras influências extrínsecas, como hormônios, possam modular o tipo de fibra muscular, os efeitos parecem ser limitados por diferentes fatores intrínsecos próprios das fibras musculares (HUGHES; BLAU, 1992).

3.5 O Músculo gastrocnêmio do rato

Os tipos de fibras do músculo gastrocnêmio do rato são equivalentes aos tipos de fibra encontrados no músculo gastrocnêmio humano, permitindo a extrapolação dos achados em ratos para o homem (BROOKE; KAISER 1970; BROOKE; WILLIAMSON; KAISER, 1971).

Na porção posterior do membro pélvico do rato encontram-se dois grupos musculares. O grupo superficial que é composto pelo músculo tríceps sural, formado pelos músculos gastrocnêmio e sóleo, que se originam independentemente e terminam em um único tendão, e pelo músculo plantar. O grupo profundo é composto pelos músculos poplíteo, flexor longo do hálux, flexor longo dos dedos e o tibial posterior (GREENE, 1959).

O músculo gastrocnêmio é composto por duas porções que surgem de pontos diferentes. A porção medial origina-se do epicôndilo medial do fêmur e a porção lateral origina-se do epicôndilo lateral. Ao nível do terço médio da perna as duas porções se fundem e dão origem a um tendão comum que quando unido ao tendão do músculo sóleo, passa a denominar-se tendão do calcâneo, inserindo-se no tubérculo do calcâneo (GREENE, 1959).

O gastrocnêmio apresenta um predomínio de fibras tipo II. Entretanto na cabeça medial do gastrocnêmio ocorrem três tipos de fibras, distribuídas em um padrão de mosaico, semelhante ao encontrado no músculo humano (BROOKE e KAISER 1970; SHER; CARDASIS 1976; BANKER; ENGEL 1994). Hämäläinen e Pette, (1993), sugerem a presença do tipo de fibra IID no músculo gastrocnêmio de ratos visualizadas através da reação histoquímica da ATPase. Staron et al., (1999), observaram na parte superficial do músculo gastrocnêmio de ratas fibras dos tipos I, IIA, IIAD, IID, IIDB, IIB e na parte profunda, fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB, IIB, através das reações histoquímicas da ATPase com pré-incubação em pHs diferentes.

3.6 Repercussões da tenotomia e tenorrafia na morfologia muscular

A palavra tenotomia quando usada na literatura clínica indica divisão cirúrgica do tendão para substituir uma deformidade que é causada por um encurtamento muscular congênita ou adquirida (STEDMAN'S MEDICAL DICTIONARY, 1990).

Existem várias implicações clínicas das mudanças que ocorrem em tendões e músculos após a tenotomia. Apesar de numerosos estudos detalharem as propriedades bioquímicas e arquiteturais dos tendões após a tenotomia e esses resultados terem sido incorporados no meio clínico, pouca informação está disponível considerando a resposta biológica e mecânica dos músculos frente à tenotomia cirúrgica e ao ferimento traumático do tendão (JAMALI et al., 2000).

A tenotomia cirúrgica é largamente usada na oftalmologia para realinhamento do eixo óptico (SAUNDERS et al., 1994), é executada no pé, e no tornozelo para tratamento do hálux valgo (BRZEZIENSKI; SCHNEIDER, 1995), em medicina do esporte para tratamento da tendinite (LEADBETTER et al., 1992), na transferência de vascularização neuromuscular (KROCHMAL; KUZON; URBANCHEK, 2008), em tratamento de doenças reumatológicas como a tenotomia do tendão dos isquiotibiais para a artropatia hemofílica do joelho, na ortopedia pediatria para a correção das deformidades na paralisia cerebral (PATRICK, 1996; CORNELL et al., 1997) e em traumatologia para o gerenciamento da síndrome da contratura (HARGENS et al., 1989).

Segundo Jamali et al. (2000), os efeitos imediatos da tenotomia ou a ruptura do tendão no músculo são diretos. Os músculos normais possuem uma tensão que está tipicamente acima da tensão de repouso e, após a perda de uma de suas fixações (como na tenotomia total ou parcial), existe uma diminuição na tensão no músculo, assim como um encurtamento do sarcômero. Adicionalmente, os sensores neurais especializados são afetados no que diz respeito ao comprimento e à informação da tensão que os mesmos recebem e retransmitem.

As alterações em músculos submetidos à tenotomia podem ser subdivididas em categorias: moleculares, arquitetônica e funcional. As alterações moleculares incluem alterações transitórias na composição da MHC. As alterações arquiteturais incluem desorganização fibromuscular, necrose do núcleo central, desalinhamento da linha Z, fibrose das fibras e dos órgãos tendinosos de Golgi, alterações no

número de sarcômeros, e alterações no número de partículas de membrana. Funcionalmente, o músculo tenotomizado diminui a tetânica máxima, a tensão e a contração muscular (JAMALI et al., 2000).

As tenorrafias têm sido objeto de interesse experimental para muitos pesquisados com diferentes intuitos como: efeitos histológicos de fios de sutura (HAGBERG; WIK; GERDIN, 1991), avaliação de meios de imobilização nos animais (RANTANEN; HURME; KALIMO, 1999), técnica utilizada (YU; JI-FU; WEI, 1990; GREENWALD; HONG; MAY, 1994; AOKI et al., 1995) e a força de tensão de acordo com o tipo de fio de sutura (O'BROIN et al., 1995; KROCHMAL; KUZON; URBANCHEK, 2008)

A tenorrafia para obter resultados satisfatórios vai depender diretamente da solidez da tenorrafia propriamente dita, a qual mantém a continuidade da estrutura anatômica e manutenção da capacidade de deslizamento e mobilidade do tendão (ELY, 1997).

Segundo Reinke e Kus (1982), o fio de sutura que melhor atende as expectativas de uma boa tenorrafia deve ser o de mononáilon ou polipropileno. E a sutura que melhor se presta à tenorrafia em medicina veterinária é a sutura de Kessler modificada (BLOOMBERG, 1993; KILLINGSWORTH, 1993; RAISER 1995). Na sutura de Kessler modificada, o posicionamento do nó, fora da linha de reparação, evita a ação enzimática sobre esses nós na área de reparação (RAISER, 2001), uma vez que as suturas geralmente se rompem nos nós (WANG, 1998). Métodos de sutura para tendões, que provêm maior resistência à tensão de tração, foram testados para uso no homem, em cães (BERG; EGGER, 1986), em coelhos (GREENWALD; HONG; MAY, 1994) e também em eqüinos utilizando-se ensaios mecânicos de tração (NIXON et al., 1984; EASLEY et al., 1991; GREENWALD; HONG; MAY, 1994). Os resultados destes estudos preconizam, dentre os diversos tipos de suturas, aquela conhecida como "locking-loop" ou de Kessler, uma sutura de tensão utilizada para aposição de extremidades tendíneas totalmente separadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 32 ratos machos, da linhagem Wistar Hannover (*Rattus norvegicus albinus*) com, aproximadamente, 90 dias de idade ($318\text{g} \pm 24,4$) provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III) da Universidade de São Paulo (USP).

Para o delineamento experimental, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

Controle (C): constituído por seis animais que serviram de parâmetro para avaliar as possíveis alterações ocorridas no GCM dos demais grupos e foram avaliados em dois momentos distintos: com 14 dias à partir do início do experimento ($n=3$) e com 21 dias à partir do início experimento ($n=3$).

Tenotomizado (T): constituído por dez animais que serviram de parâmetro para avaliar possíveis alterações ocorridas no GCM, no que tange à disposição das fibras. Avaliados em dois momentos distintos: 14 dias pós-operatório ($n=5$) e 21 dias pós-operatório ($n=5$).

Tenorrafiado (R): constituído por dez animais e que foram avaliados em dois momentos distintos: 14 dias pós-operatório ($n=5$) e 21 dias pós-operatório ($n=5$).

No biotério supracitado, com sala climatizada (21°C), iluminação artificial e ciclo claro/escuro de 12/12, os animais de todos os grupos foram mantidos individualmente em gaiolas retangulares de polipropileno com tampa metálica protetora medindo aproximadamente $60 \times 35\text{ cm}$, com maravalha autoclavada e trocada diariamente. Sete dias antes do início do experimento (tempo considerado suficiente para a adaptação dos animais) e durante os tempos dos procedimentos (14 e 21 dias), os animais receberam sem restrições, água filtrada e ração comercial para roedores, (Nuvitab CR-1 da empresa Nuvital Nutrientes S/A). Os esquemas das figuras 2 e 3 ilustram a distribuição dos animais nos diferentes grupos (C, T e R), bem como os períodos em que foram realizados os procedimentos experimentais.

Figura 2 – Distribuição do número de animais, de acordo com o grupo e o tempo pós-operatório

Figura 3 – Esquema do procedimento para a obtenção dos espécimes utilizados nesta pesquisa (C- controle; T- tenotomia; R- tenorrafia)

4.1 Delineamento para a tenotomia e a tenorrafia

Os animais constituintes dos grupos que foram submetidos e a esses procedimentos (T e R) foram anestesiados, por via intraperitoneal, com Cloridrato de Ketamina a 10% (95mg/kg) e Cloridrato de Xilazina a 2% (12mg/kg) e mantidos em decúbito ventral (ARRUDA et al., 2007). Em seguida, procedeu-se com a tricotomia do membro pélvico esquerdo, que foi higienizado com solução de água destilada e iodo, embebida em gaze (100% algodão). Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm foi realizada paralelamente à linha média do membro, permitindo a exposição do tendão calcâneo, que foi seccionado transversalmente em sua parte média, entre a sua inserção no osso calcâneo e a junção miotendínea (CARRINHO et al., 2006).

Os animais do grupo R tiveram o tendão imediatamente suturado (figura 5 A) com linha não absorvível (monofilamento de seda, 5-0 Techsuture), segundo a técnica da sutura de Kessler (Figura 4) modificada por Masson e Allen (ZUMIOTTI, 1993). Após a sutura da pele (figura 5 B), também com linha não absorvível (monofilamento de seda, 4-0 Techsuture), a região foi higienizada com iodo. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram cobertos com um tecido aquecido, para evitar a hipotermia e auxiliar na recuperação dos efeitos causados pelos anestésicos, sendo monitorados até que cessasse os efeitos do agente anestésico.

Fonte: Modificado de Strickland (1995).

Figura 4 – Técnica utilizada para a tenorrafia. Esquema da sutura de Kessler

Figura 5 – Procedimento cirúrgico. A- Aspecto da tenorrafia, imediatamente após a tenotomia. B- Aspecto da sutura da pele, finalizando a cirurgia

4.2 Período pós-cirúrgico

No presente experimento optou-se por manter os animais dos grupos T e R sem nenhum tipo de imobilização (permitindo, portanto, suporte de peso pós-cirúrgico) a fim de que não alterar a postura natural da espécie, procedimento este, de acordo com outros estudos (SARTORI FILHO; GANDOLF; BANDARRA, 1997; REZENDE et al., 2001; KROCHMAL; KUZON; URBANCHEK, 2008).

A analgesia durante esse período foi mantida administrando-se, por via subcutânea, Flunixin-Meglumine² (2,5 mg/kg) em doses diárias, durante 3 dias consecutivos (FLECKNELL, 1999).

² Schering-Plough Animal Health

4.3 Peso e sacrifício dos animais

O peso dos animais de todos os grupos (C, T, R) foi determinado considerando-se a variação de peso, que consiste na diferença entre o peso final e o peso inicial de cada animal. Para tanto, o peso inicial foi verificado no dia 0 (Figura 3) e o peso final, imediatamente antes do sacrifício, que foi realizado com o auxílio de uma câmara de dióxido de carbono³ (CO₂).

4.4 Dissecção: individualização e obtenção da cabeça medial do músculo gastrocnêmio

Após uma incisão longitudinal ampla da pele (aproximadamente 4 cm) do membro pélvico, a mesma foi rebatida a fim de se expor o GCm. Em seguida à exposição da cabeça medial do músculo, a mesma foi coletada, pesada e medida longitudinalmente, utilizando-se um paquímetro (Mytutoyo). Cada espécime foi seccionado transversalmente nas partes proximal, média e distal, de maneira equitativa (Figura 6), sendo o terço médio fixado, pela sua face distal, em uma base de cortiça, utilizando-se um meio de inclusão especial para congelamento de tecido biológicos (KILLIK – EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) e Tragacanth (Sigma). Depois de fixado em sua base, a amostra foi totalmente coberta pelo meio de inclusão e imediatamente colocada em uma cuba com isopentano, que foi imersa em nitrogênio líquido, até atingir uma temperatura de aproximadamente -150°C a fim de evitar possíveis artefatos decorrentes da baixa temperatura. O armazenamento das amostras foi feito em freezer a -80°C (Thermo Forma: -86C ULT Freezer).

³ Biotério do Departamento de Anatomia - ICB/USP.

Figura 6 – Procedimentos para a obtenção das partes da GCm. A- Dissecação do compartimento posterior do membro pélvico. B- Identificação da GCm. C- Delimitação das partes da GCm. D- Partes da GCm individualizadas (P- proximal; M- média; D- distal)

4.6 Procedimentos histológicos

Após retirados do freezer, os espécimes foram fixados em um criostato (Leica CM 1850) com temperatura de sua câmara a -25°C , onde permaneceram por aproximadamente 30 minutos, período suficiente para a adaptação da temperatura. Cortes seriados de $10\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos segundo critérios estereológicos estabelecidos por Howard e Reed (2005), acomodados em lâminas armazenadas à temperatura ambiente, até que fossem submetidos aos diferentes métodos de coloração histoquímicos e não histoquímicos.

A fim de se evidenciar a citoarquitetura do tecido muscular, empregou-se a coloração da Hematoxilina-Eosina (BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1975); o sistema de fibras colágenas foi analisado em cortes corados pelo método do Picro-Sirius, analisado sob luz polarizada, conforme preconizado por Junqueira, Bignolas e Brentani (1979).

A caracterização dos diferentes tipos de fibras musculares segundo parâmetros metabólicos e funcionais foi realizada utilizando-se a reação histoquímica da NADH-tr (NADH-tr, Sigma, N8129), conforme o protocolo estabelecido por Barnárd et al. (1971) e Silva (1999). Esse método de coloração utiliza as reações de óxido-redução do ciclo de Krebs. Por ação enzimática, o Nitro Blue Tetrazolium (NBT), sal de cor amarela, reduz, fica insolúvel e precipita, originando um composto de cor azul-violeta, a formazana. A enzima responsável por essa reação está presente nas regiões fibrilares internas, nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático das células musculares. Portanto, as fibras oxidativas, por conterem essas estruturas e organelas em maior concentração, coram-se mais intensamente (SILVA, 1999).

Desta forma, as lâminas foram incubadas durante 40 minutos a 37°C, em uma solução contendo Tampão Tris (0,2M; pH 7,4), 5mg de NBT (Sigma, N6876) e 12,5mg de NADH-tr. Após a incubação, as lâminas foram imersas em uma seqüência de acetona (60%, 90% e 60%), álcool (do 70% ao absoluto) e diafanizadas em xilol, sendo em seguida montadas com Bálsamo do Canadá sintético (Synth).

4.6 Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para preparação das amostras para a MET, os animais foram previamente anestesiados (vide item 4.1) e submetidos a uma toracotomia, seguida de perfusão ventricular cardíaca por solução de Karnovsky modificada (1% paraformaldeído e 3% glutaraldeído em 0,07M de tampão cacodilato, pH 7,4). Para a coleta da amostra procedeu-se como já relatado no item 4.5.

Desta forma, os fragmentos musculares destinados à MET, foram imersos em solução fixadora de karnovsky modificada, onde, posteriormente foram divididos, com o auxílio de lâmina de bisturi, em fragmentos menores, permanecendo nesta mesma solução, por um período de 2 horas à temperatura de 4°C.

Em seguida, estes fragmentos foram lavados em tampão fosfato salino (0,1M e pH 7,4) por três vezes em solução tampão cacodilato (0,1M; pH 7,3) e pós-fixados

em tetróxido de ósmio 1%, em solução tampão cacodilato, durante 2 horas à temperatura de 4°C.

Feita a lavagem no tampão anteriormente citado, os espécimes foram tratados com acetato de uranila, permanecendo nessa solução por 12 horas, em temperatura ambiente e protegido de luz. Em seguida, foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (60 a 100%) e três passagens de 15min em óxido de propileno puro. Os espécimes foram, então, infiltrados por resina epóxi + óxido de propileno (1:1) durante 4 horas, incluídos em resina pura e mantidos em estufa (60°C), durante cinco dias.

Os blocos obtidos foram trimados para a realização de cortes semi-finos (300nm de espessura) que foram corados pelo método de azul de toluidina para verificação da integridade do material. Posteriormente, foi realizado cortes ultrafinos (50nm de espessura), que foram colhidos em telas apropriadas (200 mesh) e contra-corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963).

4.7 Estudo morfométrico

A mensuração da AST do músculo, foi realizada em 5 secções por animal de cada grupo, selecionadas com base na tabela de números randômicos (vide Anexo A). Para a DF e a AST das fibras musculares, os cortes foram inicialmente divididos em três regiões: profunda (P), Superficial (S) e Intermediária (In), utilizando-se como delimitação desta última, o vaso sanguíneo localizado na transição entre as regiões S e P. Desta forma, foram escolhidos seis campos em cada secção, sendo dois para cada uma das três regiões (P, In e S), conforme ilustrado na figura 7.

Fonte: Modificado de Oliveira (2006)

Figura 7 – Seqüência de obtenção e de preparação histológica da GCM, onde foram determinadas as localizações dos campos para a mensuração da DF e AST das fibras musculares. (L- lateral; M- medial; S- superficial; P- profunda; In- intermediária)

4.7.1 Área das secções transversas da GCM

Para a quantificação da área das secções transversas da GCM utilizou-se as secções coradas pelo método histoquímico da NADH-tr.

Para se determinar a média das secções transversas foi utilizada a metodologia da figura 7. A aquisição das imagens foi realizada através de uma lupa estereoscópica⁴, com uma câmera fotográfica digital acoplada⁵. O processamento das imagens foi realizado em equipamento de imagem computadorizado⁶. A área de

⁴ Carl Zeiss Microimaging, modelo Stemi® SV6 – LAFACC – ICB/USP

⁵ Power shot A640, Canon, China – LAFACC – ICB/USP

⁶ Axiovision Rel. 4.6, Göttingen, Alemanha – LAFACC – ICB/USP

secção transversa foi obtida em μm^2 , circundando-se os cortes com o cursor do mouse (Figura 8).

Figura 8 – Determinação da AST da GCm

4.7.2 Área das secções transversas das fibras musculares

Para a quantificação da área do perfil das fibras musculares dos tipos O, GO e G utilizou-se as secções coradas pelo método histoquímico da NADH-tr, com imagens processadas pelo mesmo equipamento de imagem computadorizada descrito no item anterior, acoplado a um microscópio binocular⁷ com objetiva de 20X de aumento. Circundando-se os cortes, a área de secção transversa foi obtida em μm^2 (Figura 9).

⁷ Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioskop 40, Göttingen, Alemanha – LAFACC – ICB/USP.

Figura 9 – Determinação da AST das fibras musculares da GCm

4.7.3 Densidade das Fibras Musculares

Para a quantificação dos tipos de fibras musculares, nas secções coradas pelo método histoquímico da NADH-tr, foi utilizado o sistema de imagem computadorizada⁸ com objetiva de 20X de aumento, seguindo a metodologia da figura 6, somando-se, no mínimo 100 fibras de cada tipo. Para esta quantificação foi utilizado um sistema teste formado por 4 quadrados constituídos de linhas de exclusão (contínuas) e linha de inclusão (pontilhadas) de 30,7 mm² (HOWARD; REED, 2005) (Figura 10).

⁸ Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioskop 40 e câmera Axiocam ligados ao software Axiovision Rel. 4.6, Göttingen, Alemanha – LAFACC – ICB/USP.

Figura 10 – Determinação da densidade de fibras musculares da GCm

4.8 Tratamento estatístico

A análise estatística foi feita com o auxílio do Software estatístico GraphPad Prism 5 e levado em consideração os princípios de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (GUNDERSEN et al., 1999)

Para determinação da AST do músculo gastrocnêmio (μm^2), da AST das fibras musculares (μm^2) e da DF dos tipos de fibras musculares (n° de fibras/ mm^2) dos diferentes grupos e períodos experimentais, foi empregado a análise de variância (ANOVA – one way) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey.

O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% (ZAR, 1984), ou seja, valores foram considerados como significativos quando a probabilidade e índice de significância (p) forem menores que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Durante todas as fases dos procedimentos experimentais, os animais foram assistidos clinicamente, não sendo registrado nenhum óbito nos períodos avaliados.

5.1 Aspectos clínicos

O tempo de ação do anestésico foi de aproximadamente quarenta minutos, tempo suficiente para a realização do procedimento cirúrgico adotado neste estudo.

Observou-se que, entre 3 e 5 min após a administração do anestésico, os animais adotavam a posição de decúbito lateral. Após 10 min (período em que obteve certeza do sucesso anestésico) iniciou-se a cirurgia nos animais dos grupos T e R, cujas pálpebras permaneceram abertas, exibindo reflexo discreto. Para evitar o ressecamento dos olhos foi administrado soro fisiológico constantemente à temperatura ambiente, até o restabelecimento completo do reflexo palpebral.

Durante esta fase do experimento, não foram observados episódios de vômito, salivação, eliminação de urina ou defecação. Em média entre 90 e 120 minutos após administração do anestésico observou-se, de forma seqüencial, a movimentação da cabeça, dos membros torácicos e, por último, pouquíssima movimentação dos membros pélvicos, cujos dedos mostraram-se afastados entre si, e os tornozelos e joelhos fletidos.

Esses animais somente voltaram a apresentar a postura natural da espécie aproximadamente uma semana após a cirurgia, quando estas observações não mais existiam e a sua marcha era, praticamente, igual àquela verificada nos animais do grupo C. Ainda, durante a primeira semana, observou-se progressivamente o restabelecimento normal da ingesta de água e ração, bem como uma boa cicatrização.

5.2 Análise qualitativa

A estrutura e a ultraestrutura da GCm foram avaliadas como descrito a seguir.

5.2.1 Microscopia de luz

A estrutura da GCm foi avaliada através de técnicas rotineiras de histologia (HE e picro-sírius), bem como histoquímica para a NADH-tr.

5.2.1.1 Hematoxilina-eosina e picro-sírius

Verificou-se nos animais do grupo C14, fascículos musculares bem definidos com o perímio delgado e frouxamente arranjado, onde encontram-se vasos e nervos destinados ao músculo. O endomíio era constituído por uma delicada camada de tecido conjuntivo e envolvia cada fibra muscular. Estas apresentavam diâmetros semelhantes entre si, acomodando-se umas às outras e exibindo contorno poligonal com ângulos arredondados; seus mionúcleos ocupavam posição periférica e subsarcolemal (Figura 11 A e B).

No grupo T14, particularmente na região P, ocorreu uma dilatação do espaço ocupado pelo perímio e endomíio, com as fibras musculares exibindo contornos variados e irregulares, desde pequenas células alongadas a células de grande diâmetro. Aparentemente, ocorreu uma maior densidade de núcleos de células do tecido conjuntivo circunjacente. (Figura 11 C e D)

No grupo R14, o contorno assumido pelas células musculares em muito se assemelhou ao verificado para o grupo C14, inclusive com uma aparente diminuição da densidade de núcleos conjuntivos relativamente ao grupo T14. Todavia, os espaços entre os fascículos e as fibras musculares permaneceram mais dilatados em relação ao grupo C14 (Figura 11 E e F).

Figura 11 – Secção transversa da GCm de ratos dos grupos C14 (A,B); T14 (C,D) e R14 (E,F). Notar, no grupo controle (A,B) a organização dos fascículos, a distribuição uniforme dos núcleos conjuntivos, bem como o delgado espaço ocupado pelo perimísio (seta branca) e o aspecto poligonal das fibras musculares. Nos animais tenotomizados (C,D) predominam fibras de contorno irregular (*), espaço dilatado do perimísio (seta branca) e do endomísio (cabeça de seta), densidade elevada e de distribuição irregular de núcleos conjuntivos (seta preta). Nos animais tenorriados (E,F), observa-se também o espaço dilatado do perimísio (seta branca) e do endomísio (cabeça de seta) e uma distribuição uniforme dos núcleos conjuntivos. (Hematoxilina e Eosina)

Os aspectos histológicos dos fascículos e fibras musculares descritos para o grupo C14, também se aplicam aos animais do grupo C21, ou seja, fascículos envoltos por um perimísio delgado, fibras de contorno predominantemente poligonal e densidade e distribuição dos núcleos conjuntivos de maneira uniforme (Figura 12 A e B).

No grupo T21, muito embora tenha sido notada uma tendência a uma melhor organização dos fascículos, juntamente com a regularização do contorno das fibras musculares, muitas fibras ainda apresentaram-se irregulares e com alta densidade de núcleos conjuntivos ao seu redor. Além disso, o espaço que compreende o perimísio mostrou-se ainda dilatado, quando comparado ao grupo C21 (Figura 12 C e D).

Muito embora as características do grupo R21 tenham se aproximado daquelas verificadas para o grupo C21, o espaço relativo ao perimísio permaneceu dilatado (Figura 12 E e F).

Figura 12 – Secção transversa da GCm de ratos dos grupos C21 (A,B); T21 (C,D) e R21 (E,F). Notar, no grupo controle (A,B) a organização dos fascículos, a distribuição uniforme dos núcleos conjuntivos, bem como o delgado espaço ocupado pelo perimísio (seta branca) e o aspecto poligonal das fibras musculares. Nos animais tenotomizados (C,D) permanecem fibras de contorno irregular (*), espaço dilatado do perimísio (seta branca), delgada camada do endomísio (cabeça de seta), densidade elevada e de distribuição irregular de núcleos conjuntivos (seta preta). Nos animais tenorrafados (E,F), observa-se também o espaço dilatado do perimísio (seta branca), endomísio com espessamento normal (cabeça de seta) e uma distribuição uniforme dos núcleos conjuntivos. (Hematoxilina e Eosina)

Os grupos C14 e C21 apresentaram uma delgada camada de tecido conjuntivo que forma o perimísio envolvendo os fascículos e uma camada ainda mais delgada, o endomísio, pouco perceptível, envolvendo cada fibra muscular. Os grupos T14 e T21 apresentaram o perimísio e o endomísio mais espessos do que os do grupo controle. Os grupos R14 e R21 apresentaram espessuras do perimísio e endomísio semelhantes ao grupo C (Figura 13).

Figura 13 – Secção transversa da GCm de ratos dos grupos C14 (A), C21(B), T14 (C), T21 (D), R14 (E) e R21 (F) evidenciando o tecido colágeno. Notar no grupo C14 (A) e C21 (B) a delgada camada de tecido conjuntivo, perímísio (seta maior) e uma camada ainda mais delgada, o endomísio (seta menor). Nos grupos T14 (C) e T21 (D) o perímísio (seta maior) e o endomísio (seta menor) apresentam-se mais espessos do que os do grupo controle. Relativamente a esses aspectos, os grupos R 14 (E) e R21 (F) assemelham-se ao grupo controle. (Picro-sirius)

Nos animais do grupo C observou-se, sob luz polarizada, o epimísio constituído por fibras colágenas do tipo I (vermelho e amarelo) e fibras colágenas do tipo III (verde). O perimísio adjacente aos vasos sanguíneos de maior calibre, constituído de fibras colágenas dos tipos I e III, mostrou-se em maior quantidade do que o perimísio localizado entre os fascículos, de constituição única de fibras colágenas do tipo I (Figura 14 A,B,C).

Nos animais dos grupos T14 e R14 observou-se a constituição do epimísio por fibras colágenas do tipo III. O perimísio mostrou-se composto pelos dois tipos de fibras colágenas (I e III) nas regiões próximas aos vasos, com aparente aumento de fibras colágenas do tipo III nos animais do grupo R14 em relação aos grupos C e T14 (Figura 14 D-I).

Os animais dos grupos T21 e R21 exibiram constituição dos tipos de fibras colágenas do epimísio, semelhante ao observado nos grupos T14 e R14, ou seja, constituição única de fibras do tipo I. Na região adjacente aos vasos, os grupos T21 e R21 apresentaram constituição do perimísio semelhante àquela encontrada nos animais do grupo C, tanto em relação à quantidade quanto ao tipo de fibra colágena. O perimísio na região entre os fascículo apresentou fibras colágenas do tipo I e mostrou-se aumentado nesta região em comparação com os demais grupos (Figura 14 J-O).

Figura 14 – Secção transversa da GCM de ratos dos grupos C14 (A-C); T14 (D-F); R14 (G-I); T21 (J-L) e R21 (M-O). Notar, no grupo controle (A-C) o epimísio (*) e o perimísio (cabeça de seta) constituídos por fibras colágenas dos tipos I e III. Entre os fascículos, onde o perimísio se adelgaça, sua constituição é de fibras do tipo I (seta). Nos animais dos grupos experimentais tenotomizados e tenorafiados de 14 e 21 dias (D, G, J, M), o epimísio (*) está constituído somente por fibras colágenas do tipo I. Em linhas gerais, o perimísio dos grupos experimentais apresentou fibras colágenas dos tipos I e III, sendo detectado um aumento aparente destas últimas nos animais do grupo tenorafiado de 14 dias. (Picro-sirius)

5.2.1.2 Histoquímica para a NADH-tr

A intensidade desta reação reflete a capacidade oxidativa no metabolismo da célula, permitindo a distinção das fibras musculares nos tipos I, IIA e IIB ou O, GO e G, respectivamente. Como as fibras do tipo I têm intensa atividade oxidativa, estas aparecem em escuro; entretanto, as fibras do tipo IIB, que dependem mais da glicólise anaeróbia, aparecem claras e as fibras do tipo IIA, com metabolismo glicolítico e oxidativo, exibem coloração intermediária. Adicionalmente à coloração, as fibras O exibem diâmetro pequeno; as GO diâmetro intermediário e as G, diâmetro grande.

A figura 15 ilustra as diferentes colorações exibidas pelas fibras musculares G, GO e O, decorrentes da reatividade à NADH-tr.

Figura 15 Secção transversa da GCm de ratos do grupo C14; fibra glicolítica (G), fibra glicolítica-oxidativa (GO) e oxidativa (O). (NADH-tr)

Em linhas gerais, na região S ocorreu o predomínio das fibras G. A região P, embora seja aquela onde se concentra a maior quantidade de fibras O, é também o local onde são encontrados os três tipos de fibras (G, O, GO) distribuídas em um padrão mosaico, de maneira aparentemente equitativa. Na extremidade medial dessa região, há um predomínio nítido de fibras G. Esse padrão mosaico também pode ser notado na região In (Figura 16).

Nas imagens, em pequeno aumento, de cortes transversos do GCm dos animais C14 comprovou-se a disposição geral anteriormente descrita, sendo possível verificar dimensões equivalentes, bem como a proporcionalidade dos tipos de fibras correspondentes às regiões S e P (Figura 16).

Nos animais do grupo T14 há uma discrepância na dimensão entre a região S e P, tendo a região S maior dimensão que a P; nesta última, a extremidade medial permanece com o padrão verificado no grupo C14. A região In do grupo T14 não apresenta o padrão mosaico característico, exibindo-se como uma divisão nítida entre as regiões S e P (Figura 16).

Em R14 verifica-se um aumento da área de secção transversa do músculo como um todo, ou seja, as três regiões aumentam proporcionalmente entre si, mantendo-se o padrão mosaico da região In do grupo C14 (Figura 16).

Observando-se o grupo C21 pode-se admitir que a distribuição das fibras nas diferentes regiões de GCm é semelhante àquela observada para os animais do grupo C14 (Figura 16).

No grupo T21, diferentemente do observado em T14, a região S apresenta-se menor que a P, evidenciando-se na região In, o padrão mosaico característico (Figura 16).

A área seccional transversa aumentada de maneira proporcional em relação aos grupos C21 e T21, bem como a disposição das fibras nas diferentes regiões do músculo, são semelhantes ao verificado nos animais do grupo R14 (Figura 16).

Figura 16 – Corte transversal em pequeno aumento. C14 (A), C21 (B), T14 (C), T21 (D), R14 (E), R21(F)

5.2.2 Ultraestrutura das fibras musculares

Em uma análise ultraestrutural geral aos 14 dias (Figura 17), verificou-se que as miofibrilas estavam preservadas nos animais dos grupos C e R. Em diversos locais do GCm dos animais do grupo T foram observadas miofibrilas rompidas ou com desalinhamento dos sarcômeros, condizentes com fibras em processo de degeneração (Figura 17 B, C). Ainda nesse grupo, a proporção banda A/banda I mostrou-se alterada, com esta última exibindo uma extensão quase igual àquela da banda A (Figura 17 C). Muito embora as miofibrilas do GCm dos animais do grupo R tenham apresentado o sarcômero alinhado, comprovado pela disposição da linha Z (Figura 17 D, E), algumas características peculiares a este grupo devem ser ressaltadas, desta forma, foi nítida a diminuição da espessura das miofibrilas, bem como ficou evidente um maior espaçamento entre os miofilamentos (Figura 17 E). Em determinados pontos, não foi possível distinguir perfeitamente os componentes da banda I (Figura 17 F).

Figura 17 – Microscopia eletrônica de transmissão da GCm dos grupos de 14 dias. A- C14. B, C- T14. D, E, F- R14. Notar em (A) a proporção de aproximadamente 3 vezes o comprimento da banda A em relação a banda I, (C) proporção próxima entre a banda A e banda I (E) a proporção entre a banda A e a banda I semelhante ao grupo controle (linha vermelha- banda A, linha azul- banda I, estrela- mitocôndria, seta branca pequena- desalinhamento do sarcômero, seta grande- linha Z, cabeça de seta- degeneração da miofibrila, seta pequena preta- espaçamento entre os miofilamentos)

Aos 21 dias (Figura 18), permaneceram muitas das características verificadas nos grupos de 14 dias. Relativamente ao GCm dos animais do grupo C, todos os aspectos anteriores descritos estavam preservados. Nos animais do grupo T, houve uma nítida tendência ao alinhamento dos sarcômeros; porém, ainda a proporção banda A/banda I manteve-se alterada, ou seja, da mesma forma como verificada nos animais do grupo T14. Também nesse grupo, em certos locais, identificou-se fibras em degeneração. As miofibrilas do GCm dos animais do grupo R exibiram característica do grupo C, porém, pontos de degeneração também foram observados, mas em menor quantidade do que aqueles observados no grupo T.

Figura 18 – Microscopia eletrônica de transmissão da GCm dos grupos de 21 dias. A- C21. B, C, D- T21. E, F- R21. Notar em (A) a proporção de aproximadamente 3 vezes o comprimento da banda A em relação a banda I, (C) proporção próxima entre a banda A e banda I (E) a proporção entre a banda A e a banda I semelhante ao grupo controle. (linha vermelha- banda A, linha azul- banda I, cabeça de seta- degeneração da miofibrila)

5.3 Análise quantitativa

Os resultados quantitativos de peso, comprimento, AST e DF estão descritos a seguir

5.3.1 Peso dos animais

Não foi observada diferença significativa entre a média do Peso final - Peso inicial entre os animais em ambos os períodos avaliados (14 e 21 dias) (Figura 19, Tabela 1).

Figura 19 - Média e desvio padrão do Peso Final – Peso Inicial da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

Tabela 1 - Média e desvio padrão do Peso Final – Peso Inicial da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

Grupo	C-14	T-14	R-14	C-21	T-21	R-21
Peso Final – Peso Inicial	16±4,83	12,2±4,66	17±3,92	47±9,14	38,75±2,87	37±4,60

5.3.2 Peso da GCm

Os grupos de animais avaliados com 14 dias não apresentaram diferença no peso dos espécimes, entretanto nos grupos avaliados com 21 dias, os valores foram menores, tanto em T quanto em R comparados ao C (Figura 20, Tabela 2). Isto sugere que a lesão tende a levar o músculo a perder massa muscular com o passar do tempo.

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

Figura 20 - Média e desvio padrão do Peso da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

Tabela 2 - Média e desvio padrão do Peso da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

Grupo	C-14	T-14	R-14	C-21	T-21	R-21
Peso do Músculo	0,68±0,03	0,59±0,07	0,58±0,13	0,80±0,06	0,56±0,04	0,62±0,05

5.3.3 Comprimento da GCm

A análise da figura 21 e tabela 3 permite inferir que, o comprimento da GCm foi menor nos grupos T e R comparado ao C, em ambos os períodos (14 e 21 dias).

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

Figura 21 - Média e desvio padrão do Comprimento da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

Tabela 3 - Média e desvio padrão do Comprimento da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

Grupo	C-14	T-14	R-14	C-21	T-21	R-21
Comprimento do Músculo	29,24±0,43	24,8±1,30	26,6±1,29	29,6±0,89	25,5±0,50	26,875±1,81

5.3.4 Área de Secção Transversa da GCm

Os grupos T e R apresentaram maior AST da GCm, em comparação ao grupo C, sendo o grupo R diferente de T e este primeiro apresentando um maior valor dentre os demais, nos períodos de 14 e 21 dias (Figura 22, Tabela 4).

CR $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e R

CT $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e T

Figura 22 - Média e desvio padrão da AST da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

Tabela 4 - Média e desvio padrão da AST da GCm dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias

AST Músculo	14 dias	21 dias
C	27493916,8±1666359,17	28590937±1335680,03
T	30286092±1889464,27	34239100,8±1860731,91
R	45113914,2±950549,40	37304287±1383521,40

5.3.5 Área da Secção Transversa das fibras musculares

Resultados obtidos para as AST das fibras G, GO e O, nas regiões S, In e P, dos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.

5.3.5.1 AST das fibras na região S dos grupos avaliados com 14 dias

A figura 23 e a tabela 5 evidenciam maior AST das fibras G nos grupos T e R em comparação ao grupo C, e nenhuma diferença significativa para as fibras GO e O, demonstrando que as alterações foram somente nas fibras glicolíticas que apresentam maior concentração nesta região.

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

Figura 23 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares (μm^2) na região S dos grupos avaliados com 14 dias

Tabela 5 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região S dos grupos avaliados com 14 dias

Grupo	AST - G	AST - GO	AST - O
C-14	2988,43±628,95	2053,93±455,50	1380,14±359,16
T-14	4107,58±568,33	2395,14±367,31	1204,63±322,34
R-14	3822,31±430,96	2076,71±160,75	1107,76±172,87

5.3.5.2 AST das fibras na região In dos grupos avaliados com 14 dias

Na figura 24 e tabela 6 observou-se aumento da AST em todos os tipos de fibras (G, GO e O), nos grupos T e R comparados ao grupo C.

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

Figura 24 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 14 dias

Tabela 6 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 14 dias

Grupo	G	GO	O
C-14	2749,04±363,83	1974,51±266,64	1273,97±177,57
T-14	4768,19±577	3125,61±538,63	1885,31±353,82
R-14	4398,18±700,17	3272,48±131,66	1872,9±239,87

5.3.5.3 AST das fibras na região P dos grupos avaliados com 14 dias

Na região P, os animais do grupo R apresentaram maior AST em todos os tipos de fibras em comparação ao grupo C. O grupo T apresentou maior AST das fibras G e O em comparação ao grupo C, e fibras GO com AST semelhante estatisticamente ao grupo C (Figura 25, Tabela 7).

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

*CT $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e T

Figura 25 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 14 dias

Tabela 7 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 14 dias

Grupo	G	GO	O
C-14	2666,40±519,49	2240,69±394,41	1581,03±224,40
T-14	3864,97±663,93	2490,09±297,71	2066,09±358,67
R-14	3549,97±703,21	3311,94±164,80	2366,586±384,21

5.3.5.4 AST das fibras na região S dos grupos avaliados com 21 dias

Como evidenciado na figura 26 e tabela 8, o grupo R não apresentou diferença estatisticamente significativa da AST das fibras G, GO e O comparado ao grupo C. Entretanto o grupo T apresentou menor AST das fibras G e O em comparação ao grupo C, sendo que as fibras G também apresentaram menor AST em comparação ao grupo R.

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

*CR $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e R

Figura 26 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região S dos grupos avaliados com 21 dias

Tabela 8 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região S dos grupos avaliados com 21 dias

Grupo	G	GO	O
C-21	4382,99±408,11	2793,57±366,09	1615,06±181,14
T-21	3561,81±346,23	2203,31±89,93	1405,69±134,15
R-21	4411,57±376,05	2537,45±207,27	1507±180,63

5.3.5.5 AST das fibras na região In dos grupos avaliados com 21 dias

A análise da figura 27 e tabela 9 permite inferir que as fibras G do grupo R foram as únicas que apresentaram diferença estatisticamente significativa na região In, apresentando maior AST em comparação ao grupo C e T, ao passo que a AST das fibras GO e O dos grupos C, T e R mostraram-se semelhantes.

*CT $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e T

Figura 27 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 21 dias

Tabela 9 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região In dos grupos avaliados com 21 dias

Grupo	G	GO	O
C-21	2476,86±196,68	2479,80±318,09	1771,53±276,38
T-21	2648,03±135,38	2405,52±182,47	1954,67±154,95
R-21	3466,24±338,51	2324,20±250,85	1705,66±329,60

5.3.5.6 AST das fibras na região P dos grupos avaliados com 21 dias

Relativamente às fibras G, GO e O no grupo T, a AST das fibras foi semelhante ao grupo C. No grupo R, as fibras G e O apresentaram AST maior que C e T, ao passo que as fibras GO não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 28, Tabela 10). Observou-se, portanto, que a hipertrofia das fibras G e O do grupo T14 não é mais observada em T21, ao contrário de R21, que permanece com maior AST das fibras G e O desde a avaliação com 14 dias (Figura 25, Tabela 7).

*CT $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e T

Figura 28 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 21 dias

Tabela 10 - Média e desvio padrão da AST das fibras musculares na região P dos grupos avaliados com 21 dias

Grupo	G	GO	O
C-21	2721,76±331,78	2842,81±325,71	2257,19±190,12
T-21	2959,92±336,84	2964,25±509,81	2179,58±232,30
R-21	3418,43±255,70	3200,68±303,96	3659,80±487,21

5.3.4 Densidade das fibras musculares

Resultados obtidos considerando o número de fibras musculares dos tipos G, GO e O por área de $30,7\text{mm}^2$, nas regiões S, In e P, nos grupos C, T e R avaliados com 14 e 21 dias.

5.3.4.1. DF na região S dos grupos avaliados com 14 dias

O grupo R mostrou-se estatisticamente semelhante ao grupo C, relativamente às fibras G, GO e O. O grupo T, comparativamente aos grupos C e R, apresentou DF G semelhante; DF GO menor e DF O maior (Figura 29, Tabela 11).

*R $p < 0,05$ em comparação com o grupo R

*CR $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e R

Figura 29 - Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 14 dias

Tabela 11 - Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 14 dias

Grupo	G	GO	O
C-14	24,35±4,74	8±2,23	1,1±0,74
T-14	20,25±1,64	5,5±2,06	4,5±1,50
R-14	24,3±1,20	9,5±1,12	1,8±0,45

5.3.4.2 DF na região In dos grupos avaliados com 14 dias

O grupo T, comparativamente aos grupos C e R, apresentou menor DF GO e, DF O semelhante estatisticamente. O grupo R, apresentou menor DF G em relação ao grupo C e DF G com valor estatisticamente semelhante em relação ao grupo T (Figura 30, Tabela 12).

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

*CR $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e R

Figura 30 - Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 14 dias

Tabela 12 - Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 14 dias

Grupo	G	GO	O
C-14	16,6±5,22	16,6±2,51	10,4±3,51
T-14	8,62±1,08	9±0,71	8,62±1,78
R-14	6±0,71	14,5±1,12	11,6±1,08

5.3.4.3 DF na região P dos grupos avaliados com 14 dias

O grupo T, comparado ao C, apresentou-se com menor DF G e GO enquanto a DF O apresentou-se estatisticamente semelhante. O grupo R mostrou-se com menor DF G, comparado ao grupo C e T, enquanto a DF GO mostrou-se maior comparado ao grupo T, porém menor que o grupo C (Figura 31, Tabela 13).

*CR $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e R

*CT $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e T

*TR $p < 0,05$ em comparação com o grupo T e R

Figura 31 - Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 14 dias

Tabela 13 - Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 14 dias

Grupo	G	GO	O
C-14	10,31±2,04	19,61±1,65	14,52±2,92
T-14	5±0,71	11±2,12	14±2,74
R-14	1,8±0,45	15,9±0,74	15,1±1,60

5.3.4.4 DF na região S dos grupos avaliados com 21 dias

Relativamente ao grupo T, comparado aos grupos C e R, não foi observado nenhuma diferença estatisticamente significativa da DF G, porém a DF O foi maior. O grupo R apresentou-se com DF G e GO semelhante ao grupo C e T (Figura 32, Tabela 14).

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

*CR $p < 0,05$ em comparação com o grupo C e R

Figura 32 - Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 21 dias

Tabela 14 - Média e desvio padrão da DF na região S dos grupos avaliados com 21 dias

Grupo	G	GO	O
C-21	22,3±4,41	8,74±1,16	1,4±1,14
T-21	22,4±2,70	6,2±2,17	5,2±2,68
R-21	18±2,55	6,5±0,87	1,25±1,30

5.3.4.5 DF na região In dos grupos avaliados com 21 dias

A análise da figura 33 e tabela 15 permite inferir que as fibras G tiveram maior DF no grupo T comparada com os grupos C e T.

*CT p<0,05 em comparação com o grupo C e T

Figura 33 - Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 21 dias

Tabela 15 – Média e desvio padrão da DF na região In dos grupos avaliados com 21 dias

Grupo	G	GO	O
C-21	10,4±2,41	16,6±3,05	10±3,54
T-21	14,2±1,30	13,8±5,54	14,2±4,32
R-21	10,5±2,06	15±1,22	12,25±1,64

5.3.4.6 DF na região P dos grupos avaliados com 21 dias

A DF G, comparativamente aos grupos T e R, não apresentou diferença significativa, porém ambos foram menores em comparação ao grupo C. A DF GO e O não apresentou diferença significativa entre os grupos C, T e R (Figura 34, Tabela 16).

*C $p < 0,05$ em comparação com o grupo C

Figura 34 - Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 21 dias

Tabela 16 - Média e desvio padrão da DF na região P dos grupos avaliados com 21 dias

Grupo	G	GO	O
C-21	10,25±3,27	17,4±2,41	11±2,35
T-21	5,6±1,82	14±3,39	12±2,00
R-21	2,25±1,09	19,5±6,58	14±3,94

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste capítulo serão avaliados os resultados obtidos e confrontados com aqueles da literatura pertinente.

6.1 Modelo experimental

A escolha do rato como modelo animal do presente experimento deve-se ao fato de, primeiramente, ser este tipo de animal de fácil obtenção e manuseio, com baixo custo de manutenção, não sendo por acaso que o mesmo seja utilizado em pesquisas científicas. Todavia, para a presente pesquisa, o mais importante é que o tamanho e o tipo das fibras musculares nos vários músculos desse modelo animal são amplamente conhecidos (STEIN; PADYKULA, 1962; BROOKE; KAISER, 1970; BROOKE; WILLIAMSON; KAISER, 1971; ARIANO; ARMSTRONG; EDGERTON, 1973; SHER; CARDASIS, 1976). Acrescente-se a isso, primeiramente ao fato de os tipos de fibras constituintes do músculo gastrocnêmio do rato ser equivalente aos encontrados no músculo gastrocnêmio humano, permitindo a comparação de resultados (BROOKE; KAISER, 1970; BROOKE; WILLIAMSON; KAISER, 1971); e em segundo lugar, o tendão calcâneo do rato situa-se superficialmente, minimizando ao máximo, o trauma cirúrgico e facilitando, a execução da técnica experimental.

Relativamente ao material cirúrgico e à técnica cirúrgica empregados observou-se que a utilização dos fios de sutura monofilamentares inabsorvíveis foi correta, uma vez que permaneceu por todo o período experimental, fator incondicional para que não fosse alterada a força de tração muscular, no período de cicatrização do tendão (CARLSTEDT; SKAGERVALL, 1986). Também foi possível comprovar a eficiência da técnica da sutura de Kessler modificada, verificada também em estudo comparativo da resistência à tração de seis técnicas de sutura em tendões de porcos (ZATITI; MAZZER; BARBIERI, 1997). Segundo Bloomberg (1993); Killingsworth (1993) Raiser (1995) e Aoki et al. (1995) a sutura de Kessler modificada é a que melhor se presta para tenorrafia em medicina veterinária, uma vez que, os reparos geralmente se rompem nos nós de suturas e, neste tipo, o

posicionamento dos nós, fora da linha de reparação tecidual, evita a ação enzimática sobre os mesmos.

Apesar de alguns estudos colocarem a imobilização como fator de reabilitação após a tenorrafia, os autores descrevem os efeitos degenerativos da baixa atividade no sistema musculoesquelético, destacando-se a atrofia muscular, o encurtamento do músculo e a proliferação de tecido conjuntivo (JÓZSA et al., 1990; FABIS; DANILEWICZ; OMULECKA, 2001). Assim, na presente pesquisa optou-se pela não imobilização do membro operado do animal, com o objetivo de expor o músculo às tensões normais de funcionamento, o que está de acordo com os estudos de Sartori-Filho, Gandolf e Bardarra (1997); Rezende et al. (2001); Krochmal, Kuzon e Urbanchek (2008) e Fridén et al. (2010). Além disso, muito embora não tenha sido o propósito deste estudo avaliar os componentes estruturais tendíneos, considerou-se o descrito por Enwemeka, Spielholz e Nelson (1988) e Postacchini e De Martino (1980), segundo os quais relatam que, a carga mecânica imposta precocemente ao tecido acelera o alinhamento paralelo e a polimerização das fibrilas, dentro das fibras de colágeno. Desta forma, o processo de alinhamento fibrilar pode-se iniciar entre 4 a 5 dias após a ruptura ou incisão tendínea.

A opção pelo GCm para a análise dos diferentes tipos de fibras musculares, foi feita, principalmente, pela sua constituição diversificada, ou seja, a presença de fibras musculares dos tipos I, IIA e IIB e também, por ser um modelo experimental utilizado em trabalhos relativos, desenvolvidos por nosso grupo de trabalho (OLIVEIRA, 2006). Ainda na literatura, é raro observar trabalhos que avaliam músculos de constituição mista de fibras, ou seja, que levam em consideração a proporção dos tipos de fibras de acordo com as regiões superficiais e profundas destes músculos, sendo o de Starom et al. (1999), um dos que contempla este aspecto.

Essa opção difere daquelas descritas na literatura em que se avaliam as possíveis alterações dos tipos de fibras decorrentes de diferentes injúrias, onde os autores têm dado preferência por músculos com predominância de um determinado tipo de fibra e os comparam entre si, não avaliando, portanto, a proporção que cada tipo de fibra contribui para a arquitetura dos músculos estudados. Dentre esses trabalhos, cita-se o de Jacobson e Turinsky (1982) que compararam taxas metabólicas de glicocorticóides nos músculos sóleo (predominantemente de fibras oxidativas) e o plantar (predominantemente de fibras glicolíticas); o de Newman et

al. (1982) que realizaram uma análise comparativa da atividade da enzima citrato sintase nos músculos sóleo (fibras oxidativas) e epitrocleares (fibras glicolíticas) e os de Fang et al (1995, 1998) que compararam, respectivamente, o extensor digital longo (predominantemente de fibras glicolíticas), o fluxo protéico e a expressão gênica dos músculos sóleo (predominantemente oxidativo).

Autores têm descrito, através da tenotomia e da tenorrafia induzidas experimentalmente, principalmente o processo de reparação tendínea (ENWEMEKA; SPIELHOLZ; NELSON, 1988; ENWEMEKA, 1989, 1991; ENWEMEKA et al., 1990; STEHNO-BITTEL et al., 1998; GUM et al., 1997; REDDY et al., 1997; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998; ENWEMEKA; REDDY, 2000; CERVI; BREBNER; LIPTAK, 2010; SONG et al., 2010; WU et al., 2010); porém, são escassos os trabalhos que avaliam os efeitos da tenotomia e posterior tenorrafia sobre a morfologia das fibras musculares, como o que se realizou neste estudo (CASTLE; REYMAN, 1984; MAXWELL; MOODY; ENWEMEKA, 1992; TSAI, 1998; KROCHMAL; KUZON; URBANCHEK, 2008).

6.2 Considerações sobre os resultados qualitativos e quantitativos

Segundo Jamali et al. (2000) a tenotomia causa diminuição da massa muscular, e seus efeitos específicos dependem da espécie e do músculo estudado.

Um fator importante a ser considerado é a magnitude da tenotomia. Fabis, Danilewicz e Omulecka (2001) avaliaram os efeitos da tenotomia parcial e total no músculo supra-espinal em coelhos, e verificaram que houve redução dos diâmetros das fibras dos tipos I e II em ambos os grupos; porém, essas mudanças ocorreram mais precocemente no grupo com tenotomia total.

Avaliando os músculos sóleo e gastrocnêmio de gatos tenotomizados, Engel Brooke e Nelson (1966) perceberam que, músculos com predominância de fibras de contração lenta (O) atrofiam mais que os músculos compostos predominantemente por fibras de contração rápida (G).

Tomanek e Cooper (1972) e Dias (1979) relataram que as fibras O são mais susceptíveis aos efeitos da tenotomia. Bassaglia e Gautron (1995) reforçam que

estas fibras mostram menos propriedades regenerativas quando comparadas às fibras G.

Jakubiec-Puka, Catani e Carraro. (1992) observaram que após a tenotomia, o músculo sóleo sofreu maior atrofia do que o músculo gastrocnêmio. No 12º dia após a tenotomia, o conteúdo total de MHC diminuiu cerca de 85% no músculo sóleo e, somente cerca de 35% no músculo gastrocnêmio. No músculo sóleo a proporção de MHC-1/MHC-2 permaneceu praticamente inalterada, mostrando que a diminuição de ambas as isoformas ocorre de forma similar. No músculo gastrocnêmio a relação MHC-2A/MHC-2B, diminuiu, mostrando principalmente a perda de MHC-2A. Entretanto os autores ainda sugerem que estas mudanças nas isoformas MHC seriam transitórias, pois nenhuma mudança a longo prazo foi observada, demonstrando que as fibras O são mais sensíveis à tenotomia.

Mesmo com a reparação tendínea, Maxwell, Moody e Enwemeka (1992) verificaram que em coelhos tenotomizados e tenorrafiados, o músculo plantar, que contém muitas fibras G, não atrofiou como o músculo sóleo, que contém principalmente fibras O.

Os resultados do presente estudo mostram que, as mudanças na morfologia e função das fibras musculares, ocorrem diferentemente entre as regiões S, In e P do GCm. Apesar das fibras O do grupo T14 apresentarem-se hipertrofiadas, a região P onde se encontra a maior parte dessas fibras foi menor, proporcionalmente à região S, quando se comparou com o grupo C. Esta menor proporção da região P indica que há menor número de fibras nesta região, corroborando com a maior fragilidade das fibras O descritas na literatura.

Diferentemente do relatado na literatura, sobre a maior susceptibilidade das fibras O em animais submetidos à tenotomia, o presente estudo mostra que no grupo T21 houve redução na AST das fibras G da região S, enquanto que as fibras O da região P permaneceram com os valores semelhantes aos do grupo C, sugerindo que as mudanças nas fibras O ocorrem apenas nos primeiros 14 dias após a lesão. Relativamente à DF percebeu-se, em linhas gerais, que esses valores eram relacionados aos valores da AST das fibras, de maneira que, o aumento da AST era concomitante à diminuição da DF e, a diminuição da AST coincidia com o aumento da DF.

Buller e Lewis (1965); McLachlan (1983); Józsa et al. (1990) e Jakubiec-Puka, Catani e Carrato (1992) verificaram que no músculo sóleo de ratos (formado

somente por fibras O) após 12 dias à tenotomia, houve uma diminuição de 50% da sua massa, quando comparado ao músculo normal. É possível que no presente estudo, o GCm, por ser um músculo com características distintas ao utilizado por esses autores, tenha apresentado resultados diferentes relativo ao período da perda de massa muscular. Na presente pesquisa demonstrou-se que não houve diminuição do peso do GCm tanto no grupo T14 quanto no R14, fato ocorrido somente nos grupos T21 e R21. Esses dados indicam que a lesão pode promover a perda da massa de GCm em tempos mais tardios pós-cirurgia (neste caso, aos 21 dias).

Venema e Overweg (1974) estudaram 10 parâmetros de medidas do tamanho e da forma das seções transversas de fibras musculares humanas processadas por métodos histoquímicos à fresco e, concluíram que todos eles apresentam imperfeições, principalmente, pela obliquidade da secção de corte na fibra muscular. Entretanto, eles admitiram que a medida da área (AST) é um parâmetro isolado, porém, adequado para o dimensionamento da fibra muscular, método que foi aqui empregado.

A resposta do músculo sóleo do rato para a transecção proximal do tendão foi analisada por McLachlan (1983), entre 4 dias e 6 semanas após a tenotomia. O autor observou que a AST aumentou inicialmente e, em seguida, diminuiu relativamente ao controle, sete dias após a tenotomia. O número de fibras diminuiu para cerca de 20% e, em seguida, manteve-se constante, aparentemente por regeneração de novas fibras, substituído as atrofiadas.

É provável que o aumento da AST nos grupos T e R nos diferentes períodos (14 e 21 dias), observado no presente estudo, decorra de vários fatores como encurtamento muscular, hipertrofia (principalmente das fibras G) e proliferação do tecido conjuntivo. Quanto à estabilização desses valores deve-se considerar que o período de 21 dias é insuficiente para determinar o fim dos processos de mudanças decorrentes à tenotomia e tenorrafia.

Apesar de ser relativamente bem conhecido, o assunto referente à propriedade de mudança entre os diferentes tipos de fibras musculares, isto é, a plasticidade muscular, que ainda é controverso na literatura, principalmente quando se avalia a direção em que essas mudanças ocorrem, ou seja, de fibra G para O ou, do tipo II para o tipo I ou, vice-versa. Assim, Buller e Lewis (1965) atribuem o aumento da velocidade de contração muscular, após 3 semanas de tenotomia em

tornozelo de coelhos, à conversão das fibras de contração lenta (O) em fibras de contração rápida (G). No entanto, para Scott, Stevens e Macleod (2001), a conversão de fibras G para O é mais comum. Todavia, a conversão de fibras do tipo O para as do tipo G só é possível em casos severos de falta de condicionamento ou lesão da medula espinal, sendo descrita apenas em estudos sobre músculos denervados e cronicamente ativados por eletroestimulação.

Na tenotomia, a conexão entre o músculo e o osso é interrompida, ocasionando um encurtamento artificial do tecido muscular. Este encurtamento foi observado no presente estudo, não somente nos animais do grupo T21, mas também nos animais do grupo R21 demonstrando que, aos 21 dias após a tenorrafia, o músculo não foi capaz de voltar ao seu comprimento normal. Apesar de a tenotomia induzir ao encurtamento muscular, Elder e Toner (1998) verificaram que este encurtamento não reduz os níveis da atividade do músculo sóleo de ratos.

Quanto à estrutura do músculo, alguns trabalhos sugerem que a maioria das mudanças ocorre nos primeiros sete dias, frente ao desuso muscular (BOOTH, 1977; WILLIAMS; GOLDSPINK, 1984; JÓZSA et al., 1988; THOMASON; BOOTH, 1990; OKITA et al., 2004). Outros apontam evidências de que existem alterações na massa e na área das fibras musculares anteriormente ao período de 4 dias (KONDO et al., 1993; SMITH et al., 2000; AHTIKOSKI et al., 2001; AHTIKOSKI et al., 2003). Entre os trabalhos que relatam mudanças precoces na morfologia do músculo, está o de Baker (1983), que descreve alterações morfológicas 1 dia após a tenotomia, incluindo degeneração das miofibrilas e desalinhamento da linha Z. Na pesquisa ora desenvolvida, essas mudanças são ainda visíveis após 14 e 21 dias (T14 e T21), mas não nos animais do grupo R. Isto foi demonstrado pelo alinhamento das linhas Z no grupo R, podendo-se inferir que a tenorrafia reconduziu o músculo ao alinhamento dos sarcômeros e evitou a degeneração das miofibrilas.

Baker e Hall-Craggs (1980) demonstraram que a tenotomia proximal e distal dos tendões do músculo sóleo de ratos não apenas leva ao encurtamento do ventre muscular, como esperado, mas que esta redução é distribuída para os sarcômeros, de tal forma que reduz seu comprimento proporcionalmente

A tenotomia também modifica a ultraestrutura da fibra muscular. De acordo com Eisenberg, Brown e Salmons (1984), a distribuição das mitocôndrias é mais heterogênea nas fibras oxidativas, com densidade de volume superior nas áreas próximas à membrana do que ao núcleo da fibra. Em contraste, nas fibras

glicolíticas, a distância das mitocôndrias parece ser mais homogênea. Além dessa heterogeneidade na distribuição anatômica da mitocôndria, em alguns tipos de fibras, há evidências de que a capacidade oxidativa das mitocôndrias é diferente em diferentes regiões da fibra muscular (PHILIPPI; SILLAU, 1994).

Jamali et al. (2000) acrescenta que o número de sarcômeros é um valor que pode se adaptar às novas condições impostas ao músculo, e as fibras que são paralelas ao longo eixo da fibra têm a maior redução relativa e maior grau de remodelação, em comparação com as fibras de orientações oblíqua.

Baker (1983) tentando explicar o mecanismo de diminuição dos sarcômeros observou necrose de fibras em ambas as extremidades proximal e distal tenotomizadas do músculo sóleo de ratos, com uma significativa infiltração inflamatória por células fagocíticas e lisossomos, um dia após a tenotomia.

Outros trabalhos demonstraram que o encurtamento muscular provocado pela tenotomia induzida, causa inicialmente diminuição no comprimento do sarcômero e, posteriormente um aumento, enquanto que, o comprimento do músculo permanece em seu estado reduzido (ABRAMS et al., 2000).

Os resultados encontrados na literatura a respeito da ultraestrutura das fibras musculares corroboram com os achados do presente trabalho, onde é possível identificar um maior comprimento da banda I nos animais do grupo T, indicando que além do aumento no comprimento do sarcômero, houve também diminuição no número de sarcômeros em série, visto que o músculo estava com seu comprimento total diminuído.

Tsai (1998) observou que, um dia após a tenotomia do músculo EDL de coelhos, houve um declínio de 50% na produção máxima de tensão muscular que continuou a diminuir durante 3 semanas. Em outro experimento, os tendões foram submetidos à tenorrafia, uma semana após a tenotomia. Apurou-se então que durante as primeiras três semanas, após a tenorrafia, o declínio observado anteriormente foi evitado e a produção máxima da tensão aumentou vertiginosamente após um dia e, depois progressivamente até 21 dias após a reparação.

Krochmal, Kuzon e Urbanchek (2008) promoveram cirurgicamente, através das tenotomia e tenorrafia, alterações do comprimento do tendão do músculo EDL de ratos, através das secções proximal e distal do tendão. Após 12 semanas, observou que não havia mudança na percentagem dos tipos de fibras; porém, o

grupo com o comprimento do tendão diminuído revelou hipertrofia das fibras tipo II, comparado ao grupo com o comprimento aumentado e o grupo controle.

Como a tenotomia causa diminuição na tensão muscular e a tenorrafia devolve a tensão ao músculo, baseando-se no estudo de Krochmal, Kuzon e Urbanchek (2008) pode-se sugerir, no presente estudo que, a tenorrafia previne o músculo contra a atrofia.

Castle e Reyman (1984) avaliaram nos músculos tibial anterior (ta) e fibular longo (fl) de cães, os efeitos da tenotomia e transferência de tendão sobre os tipos de fibras musculares. Dividiram os animais nos seguintes grupos: tenotomia e reinserção após 24 semanas (G1), tenotomia e transferência do tendão de fl para o ta após 24 semanas (G2) e tenotomia e transferência imediata do fl para o ta (G3). As biopsias para análise foram coletadas 24 semanas e 27 meses após a cirurgia. Os resultados mostraram que em G1 houve uma atrofia inicial com posterior normalização do diâmetro das fibras; em G2 houve atrofia e aumento da percentagem de fibras do tipo I e IIB e em G3, houve, inicialmente, hipertrofia das fibras tipo II com posterior normalização do diâmetro, ao passo que, tardiamente, houve um aumento de fibras do tipo I e IIB, levando esse músculo a assemelhar-se ao músculo do local de inserção para o qual foi transferido.

No presente estudo (Figura 15), verificou-se que a tenotomia causou mudanças significativas na proporção entre as regiões S e P do GCm no grupo T14 e T21, entretanto o grupo R não apresentou diferenças entre as mesmas regiões do GCm. Estes dados sugerem que, as mudanças causadas pela tenotomia em T14 e T21, foram evitadas pela tenorrafia em R14 e R21. Desta forma, pode se dizer que, as mudança dos tipos de fibras têm grande relação com a mudança de sua função, sendo possível a alteração de suas características para adaptar-se a novas situações, estando de acordo com Salvini (2000), que afirma que a plasticidade das fibras musculares esqueléticas permitem que estas sejam capazes de se adaptar, deflagrando mudanças no seu tipo ou tamanho.

Apesar de algumas alterações causadas pela tenotomia, não serem evitadas pela tenorrafia, os resultados encontrados nos animais do grupo R (14 e 21 dias) são os que mais se aproximam do grupo C. Esses dados indicam a eficiência da tenorrafia e sugerem que, as mudanças ocasionadas pela lesão e reparação são um processo de adaptação e fruto da plasticidade muscular.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com as proposições estabelecidas, a metodologia utilizada e os resultados qualitativos e quantitativos obtidos, comparativamente aos grupos controles (C14 e C21), é lícito concluir-se que:

1 - Os animais dos grupos T14 tiveram grande variação de tamanho e formato das fibras musculares, apresentando também, desorganização dos fascículos com aparente aumento na densidade de núcleos de células do tecido conjuntivo.

2 - O perimísio dos animais dos grupos T21 e R21 apresentou-se espesso e constituído basicamente por fibras colágenas do tipo I, relativamente aos grupos C14, C21, T14 e T21.

3 - Fibras colágenas do tipo I constituíram o epimísio dos animais dos grupos T (14 e 21 dias) e R (14 e 21 dias), diferentemente dos animais do grupo C (14 e 21 dias) que exibiram fibras colágenas tipo I e III.

4 - Houve maior desalinhamento dos sarcômeros e degeneração das miofibrilas nos animais do grupo T em comparação aos animais do grupo R.

5 - Houve diminuição da massa do GCm nos animais dos grupos T21 e R21, apesar desses animais não apresentarem diminuição do peso corpóreo.

6 - O comprimento total do GCm foi menor nos grupos T (14 e 21 dias) e R (14 e 21 dias).

7 - A AST do GCm aumentou nos animais dos grupo T (14 e 21 dias) e R (14 e 21 dias), relativamente aos respectivos controles (C14 e C21 dias).

8 - Na região S, os animais do grupo T14 exibiram aumento da AST das fibras G e os do grupo T21, diminuição da AST de todos os tipos de fibras (G, GO e O). Os

animais do grupo R14 exibiram aumento da AST das fibras G e os do grupo T21, equivalente ao grupo C21, da AST de todas as fibras (G, GO e O).

9 - Na região P, os animais do grupo T14 exibiram aumento da AST das fibras G e O; e os do grupo T21, equivalente ao grupo C21, da AST de todas as fibras (G, GO e O). Os animais do grupo R14 exibiram aumento da AST das fibras G, GO e O e os do grupo T21, aumento da AST das fibras G e O.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, R. A.; TSAI, A. M.; MATSON, B.; JAMALI, A.; LIEBER, R. L. Skeletal muscle recovery after tenotomy and 7-day delayed muscle length restoration. **Genes & Development**, v. 23, n. 5, p. 707-714, 2000.
- ADAMS, G. R.; MCCUE, S. A.; ZENG, M.; BALDWIN, K. M. Time course of myosin heavychain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. **The American Journal of Physiology**, v. 276, p. 954-961, 1999.
- AHTIKOSKI, A. M.; KOSKINEN, S. O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V.; RISTELI, J.; TAKALA, T. E. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened an lengthened position. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 172, p. 131-140, 2003.
- AHTIKOSKI, A. M.; KOSKINEN, S. O.; VIRTANEN, P.; KOVANEN, V. TAKALA, T. E. Regulation of synthesis of fibrilar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened an lengthened position. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 172, p. 131-140, 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997.
- ANDERSEN, L.; TUFEKOVIC, G.; ZEBIS, M.; CRAMERI, R.; VERLAAN, G.; KJAER, M.; SUETTA, C.; MAGNUSSON, P.; AAGAARD, P. The effect of resistance training combined with timed ingestion of protein on muscle fiber size and muscle strength. **Metabolism**, v. 54, n. 2, p.151-156, 2005.
- AOKI, M.; PRUITT, D. L.; KUBOTA, H.; MANSKE, P. R. Effect of suture knots on tensile strength of repaired canine flexor tendons. **Journal of Hand Surgery**, v. 20, n. 1, p. 72-75, 1995.
- ARIANO, M. A.; ARMSTRONG, R. B.; EDGERTON, V. R. Hindlimb muscle fiber populationof five mammals. **The journal of Histochemistry and Cytochemistry** v. 21, p. 51-55, 1973.
- ARRUDA, E. R. B.; RODRIGUES, N. C.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N. A. Influencia de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 4, p. 283-288, 2007.

BAKER, J. H. Segmental necrosis in tenotomized muscle fibers. **Muscle Nerve**, v. 6, p. 29-39, 1983.

BAKER, J. H.; HALL-CRAGGS, E. Changes in sarcomere length following tenotomy in the rat. **Muscle Nerve**, v. 3, p. 413-416, 1980.

BAKER, J. H.; MARGOLIS, R. N. Calcium-activated protease activity in tenotomized muscle. **Muscle Nerve**, v. 10, p. 34-40, 1987.

BANKER, B. Q.; ENGEL, A. G. Basic reactions of muscle. In: ENGEL A. G, FRANZONI-ARMSTRONG C, Ed. **Miology**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1994.

BARNÁRD, R. J.; EDGERTON, V. R.; FURUKAWA, T.; PETER, J. B. Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. **The American Journal of Physiology**, v. 220, p. 410-416, 1971.

BARRY, J.; COTTER, M.; CAMERON, N.; PATULLO, M. The effect of immobilization on the recovery of rabbit soleus muscle from tenotomy: modulation by chronic electrical stimulation. **Experimental Physiology**, v. 79, p. 515-525, 1994.

BASSAGLIA, Y.; GAUTRON, J. Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. **The of Muscle Research and Cell Motility**, v. 16, p. 420-429, 1995.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C de.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1975.

BERG, R. J.; EGGER, E. L. In vitro comparison of the three loop pulley and locking loop suture patterns for repair of canine weight bearing tendon and collateral ligaments. **Veterinary Surgery**, v. 15, n. 1, p. 107-110, 1986.

BIRK, D. E.; TRELSTAD, R. L. Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, p. 231-240, 1986.

BLOOMBERG, M. Muscle and tendons. In: SLATTER, D. H. (Ed.). **Textbook of small animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, v. 2, cap. 146, p.1996-2020. 1993.

BODINE-FOWLER, S. Skeletal muscle regeneration after injury – an overview. **Journal of Voice**, v. 8, n. 1, p. 53-62, 1994.

BOOTH, F. W. Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 43, p. 656-661, 1977.

BORNEMANN, A.; MAIER, F.; KUSCHEL, R. Satellite Cells as players and targets in normal and diseased muscle. **Neuropediatrics**, v. 30, p. 167-175, 1999.

BOTTINELLI, R.; BETTO, R.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibers. **The Journal of Physiology**, v. 478, p. 341-349, 1994.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: How many and what kind? **Archives of Neurology**, v. 23, n. 4, p. 369-379, 1970.

BROOKE, M. H.; WILLIAMSON, E.; KAISER, K. K. The behavior of four types in developing and reinnervated muscle. **Archives of Neurology**, v. 25, n. 4, p. 360-366, 1971.

BRZEZIENSKI, M.; SCHNEIDER, L. Extensor tendon injuries at the distal interphalangeal joint. **Hand Clinics**, v. 11, n. 3, p. 373-386. 1995.

BULLER, A. J.; ECCLES, J. C.; ECCLES, R. M. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. **The Journal of Physiology**, v. 150, p. 417-439, 1960.

BULLER, A. J.; LEWIS, D. M. Some observations on the effects of tenotomy in the rabbit. **The Journal of Physiology**, v. 178, p. 326-342, 1965.

BURKE, R. E.; LEVINE, D. N.; ZAJAC, F. E. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. **Science**, v. 174, n. 10, p. 709-712, 1971.

CAIOZZO, V. J.; HADDAD, F.; BAKER, M. J.; HERRICK, R. E.; PRIETTO, N.; BALDWIN, K. M. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. **Journal Applied Physiology**, v. 81, p. 123-132, 1996.

CAIOZZO, V. J.; HERRICK, R. E.; BALDWIN, K. M. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism - maximal shortening velocity and myosin isoforms. **The American Journal of Physiology**, v. 263, p. C86-C94, 1992.

CAMPOS, G. E.; LUECKE, T. J.; WENDELN, H. K.; TOMA, K.; HAGERMAN, F. C.; MURRAY, T. F.; RAGG, K. E.; RATAMESS, N. A.; KRAEMER, W. J.; STARON R. S. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **European Journal Applied Physiology**, v. 88, p. 50-60, 2002.

CARLSON, B. M. Regeneration of entire skeletal muscle. **Federation Proceedings**. v. 45, n. 5, p. 1456-1460, 1986.

CARLSTEDT, C. A.; SKAGERVALL, R. A model for computer-aided analysis of biomechanical properties of the plantaris longus tendon in the rabbit. **Journal of Biomechanics**, v. 19, n. 3, p. 251-256, 1986.

CARPENTER, S.; KARPATTI, G. General aspects of skeletal muscle. In: CARPENTER, S.; KARPATTI, G. **Pathology of skeletal muscle**. New York: Oxford University Press: 2001. p. 28-62.

CARRINHO, P. M.; RENNO, A. C. M.; KOEKE, P. U.; SALATE, A. C. B.; PARIZOTTO, N. A.; VIDAL, B. C. Comparative Study Using 685-nm and 830-nm Lasers in Tissue Repair of Tenotomized Tendons in the Mouse. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 24, p. 754-758, 2006.

CASTLE, M. E.; REYMAN, T. A. The effect of tenotomy and tendon transfers on muscle fiber types in the dog. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 186, p. 302-310, 1984.

CERVI, M.; BREBNER, N.; LIPTAK, J. Short- and long-term outcomes of primary Achilles tendon repair in cats: 21 Cases. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 25, p. 23-25, 2010.

CETTI, R.; CHRISTENSEN, S. E.; EJSTED, R.; JENSEN, N. M.; JORGENSEN, U. Operative versus nonoperative treatment of Achilles tendon rupture - A prospective randomized study and review of the literature. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 21, n. 6, p. 791-799, 1993.

CETTI, R.; HENRIKSEN, L. O.; JACOBSEN, K. S. A new treatment of ruptured Achilles tendons. A prospective randomized study. **Clinical Orthopaedics**, v. 308, p. 155-165, 1994.

CHAN, B. P.; CHAN, K. M.; MAFFULLI, N.; WEBB, S.; LEE, K. K. Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 342, p. 239-247, 1997.

CLOSE, R. I. Dynamic properties of mammalian muscle. **Physiological Reviews**, v. 52, p. 129-130, 1972.

COLLING-SALTIN, A. S. Some quantitative biochemical evaluations of developing skeletal muscles in the human foetus. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 39, n. 2-3, p. 187-198, 1978.

CORNELL, M. S.; HATRICK, N. C.; BOYD, R.; BAIRD, G.; SPENCER, J. D. The hip in children with cerebral palsy. Predicting the outcome of soft tissue surgery. **Clinical Orthopaedics**, v. 340, p. 165-171, 1997.

D' ANTONA, G.; LANFRANCONI, F.; PELLEGRINO, M. A.; BROCCA, L.; ADAMI, R.; ROSSI, R.; MORO, G.; MIOTTI, D.; CANEPARI, M.; BOTTINELLI, R. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibers in male body builders. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 3, p. 611-627, 2006.

DEMIREL, H. A.; POWERS, S. K.; NAITO, H.; HUGHES, M.; COOMBES, J. S. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. **Journal Applied Physiology**, v. 86, p. 1002-1008, 1999.

DIAS, P. L. R. Effects of tenotomy on the motor end plates of fast and slow twitch muscles of the rabbit. **Journal of Anatomy**, v. 129, p. 399-404, 1979.

DUBOWITZ, V. **Muscle Biopsy: a practical approach**. London: Baillière Tindall, 1985.

DUBOWITZ, V.; PEARSE, A. G. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. Abteilung Histochemie**, v. 2, p. 105-117, 1960.

EASLEY, K. J.; STASHAK, T. S.; SMITH, F. W.; VAN SLYKE, G. Mechanical properties of four suture patterns for transected equine tendon repair. **Equine Practice**, v. 13, n. 3, p. 30-35, 1991.

- EDGERTON, V. R.; SIMPSON, D. R. The Intermediate Muscle Fiber of Rats and Guinea Pigs. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 1, p. 828-836, 1969.
- EISENBERG, B. R.; BROWN, J. M.; SALMONS, S. Restoration of fast muscle characteristics following cessation of chronic stimulation. The ultrastructure of slow-to-fast transformation. **Cell and Tissue Research**, v. 238, n. 2, p. 221-230, 1984.
- ELDER, G. B.; KAKULAS, B. A. Hystochemical and contractile property changes during human muscle development. **Muscle Nerve**, v. 16, p. 1246-1253, 1993.
- ELDER, G. C.; TONER, L. V. Muscle shortening induced by tenotomy does not reduce activity levels in rat soleus. **The Journal of Physiology**, v. 512, pt 1, p. 251-265, 1998.
- ELY, J. B. **Tenorrafia e envelope venoso tendinoso (EVT): estudo morfo funcional em cães beagles**. 1997, 102 p. Tese (Doutorado em Medicina) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.
- ENGEL, W. K.; BROOKE, M. H.; NELSON, P. G. Histochemical studies of denervated or tenotomized cat muscle: illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.138, n.1, p.160-185, 1966.
- ENWEMEKA, C. S. Functional loading augments the initial tensile strength and energy absorption capacity of regenerating rabbit Achilles tendons. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 71, n. 1, p. 31-38, 1992.
- ENWEMEKA, C. S. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. **Physical Therapy**, v. 69, n. 10, p. 816-825, 1989.
- ENWEMEKA, C. S. Membrane-bound intracellular collagen fibrils in fibroblasts and myofibroblasts of regenerating rabbit calcaneal tendons. **Tissue and Cell**, v. 23, n. 2, p. 173-190, 1991.
- ENWEMEKA, C. S.; REDDY, K. The biological effects of laser therapy and others physical modalities on connective tissue repair processes. **Laser Therapy**, v. 12, p. 22-30, 2000.

ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUES, O. O.; GALL, N. G.; WALSH, N. E. Morphometrics of collagen fibril populations in HeNe laser photostimulated tendons. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 8, n. 6, p. 47-62, 1990.

ENWEMEKA, C. S.; SPIELHOLZ, N. I. Modulation of tendon growth and regeneration by electrical fields and currents. In: CURRIER, D. P.; NELSON, R. M. **Dynamics of human biologic tissue**. Philadelphia: F. A. Davis Company, cap. 3, p. 231-254, 1992.

ENWEMEKA, C. S.; SPIELHOLZ, N. I.; NELSON, A. J. The effects of early functional activities on experimentally tenotomized Achilles tendons in rats. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 67, n. 6, p. 264-269, 1988.

ERZEN, I. Plasticity of skeletal muscle studied by Stereology. **Image Analysis and Stereology**, v. 23, p.143-152, 2004.

ERZEN, I.; CVETKO, E.; OBREZA, S.; ANGAUT-PETIT, D. Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 59, n. 5, p. 692-697, 2000.

FABIS, J.; DANILEWICZ, M.; OMULECKA, A. Rabbit supraspinatus tendon detachment: effects of size and time after tenotomy on morphometric changes in the muscle. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 72, n. 3, p. 282-286, 2001.

FANG, C. H.; JAMES, H. J.; OGLE, C.; FISCHER, J. E.; HASSELGREN, P. O. Influence of burn injury on protein metabolism in different type of skeletal muscle and the role of glucocorticoids. **Journal of American college of Surgeons**, v.180, p. 33-42, 1995.

FANG, C. H.; LI, B. G.; TIAO, G.; WANG, J. J.; FISCHER, J. E.; HASSELGRAN, P. O. The molecular regulation of protein breakdown following burn injury is different in fast- and slow-twitch skeletal muscle. **International Journal of Molecular Medicine**, v.1, n. 1, p. 163-169, 1998.

FARKAS-BARGETON, E.; DIEBLER, M. E.; ARSENIO-NUNES, M. L. WEHRLE, R.; ROSENBERG, B. Histochemical, quantitative and ultrastructural maturation of human fetal muscle. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 43-49, 1977.

FITTS, R. H.; RILEY, D. R.; WIDRICK, J. J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 3201-3208, 2001.

FLECKNELL, P. Pain – assessment, alleviation and avoidance in laboratory animals **ANZCCART News**, v. 12, n. 4, p. 1-8, 1999.

FLUCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 146, p.160-116, 2003.

FRIDÉN, J.; SHILLITO, M. C.; CHEHAB, E. F.; FINNERAN, J. J.; WARD, S. R.; LIEBER, R. L. Mechanical Feasibility of Immediate Mobilization of the Brachioradialis Muscle After Tendon Transfer. **The Journal of Hand Surgery**, v. 35, n. 9, p.1473-1478, 2010.

FRONTERA, W. R.; HUGHES, V. R.; LUTZ, K. J.; EVANS, W. J. A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 75-yr-old men and women **Journal. Applied Physiology**, v. 7, p. 644-650, 1991.

GELBERMAN, R. H. Flexor tendon physiology: tendon nutrition and cellular activity in injury and repair. **Instructional course lectures**, v. 34, p. 351-360, 1985.

GREENE, E. C. Anatomy of the rat. Muscles. In: GREENE, E. C. **Transactions of the American Philosophical Society**. New York: Hafner Publishing Co.; 1959. v. 27, p. 59-83.

GREENWALD, D. P.; HONG, H. Z.; MAY JR.; J. W. Mechanical analysis of tendon suture techniques. **Journal of Hand Surgery American**, v. 19, n. 4, p. 641-647, 1994.

GUM, S. L.; REEDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 76, n. 4, p. 288-296, 1997.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, F. B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, pt 3, p. 199-211, 1999.

GUTH, L.; SAMAHA, F. J.; ALBERTS, W. The neural regulation of some phenotypic differences between the fiber types of mammalian skeletal muscle. **Experimental Neurology**, v. 26, p. 126-135, 1970.

GUTMANN, E.; MELICHNA, J.; SYROVY, I. Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. **Experimental Neurology**, v. 36, p. 488-497, 1972.

GUTTRIDGE, D. N.; MAYO, M. W.; MADRID, L. V.; WANG, C. Y.; BALDWIN, A. S. J. NF- κ B – Induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. **Science**, v. 289, p. 2363-2366, 2000.

HAGBERG, L.; WIK, O.; GERDIN, B. Determination of biomechanical characteristics of restrictive adhesions and of functional impairment after flexor tendon surgery a methodological study of rabbits. **Journal of biomechanics**, v. 24, p. 935-942, 1991.

HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, IID and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat and Rabbit. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 41, p. 733-743, 1993.

HARBER, M. P.; FRY, A. C.; RUBIN, M. R.; SMITH, J. C.; WEISS, L. W. Skeletal muscle and hormonal adaptations to circuit weight training in untrained men. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 14, p. 176-185, 2004.

HARGENS, A. R.; AKESON, W. H.; MUBARAK, S. J.; OWEN, C.; GERSHUNI, D. H.; GARFIN, S. R.; LIEBER, R. L.; DANZIG, L.; BOTTE, M. J.; GELBERMAN, R. H. Tissue fluid pressures: from basic research tools to clinical applications. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 7, p. 902-909, 1989.

HNÍK, P. The effect of deafferentation upon muscle atrophy due to tenotomy in rats. **Physiologia Bohemoslovenica**, v. 13, p. 209-215, 1964.

HNÍK, P.; BERÁNEK, R.; VYKlick, L.; ZELENÁ, J. Sensory outflow from chronically tenotomized muscles. **Physiologia Bohemoslovenica**, v. 12, p. 23-29, 1963.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Three-dimensional measurement in microscopy. In: _____ **Unbiased stereology**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2005. 246 p.

HUGHES, S. M.; BLAU, H. M. Muscle fiber pattern is independent of cell lineage in postnatal rodent development. **Cell**, v. 68, p. 659-671, 1992.

JACOBSON, H. I.; TURINSKY, J. Effects of injury on glucocorticoid and androgen binding in skeletal muscles with different fiber population. **The Journal of Trauma**, v. 22, n. 10, p. 845-846, 1982.

JAKUBIEC-PUKA, A.; CATANI, C.; CARRARO, U. Myosin heavy-chain composition in striated muscle after tenotomy. **The Biochemical Journal**, v. 15, n. 282, p. 237-242, 1992.

JAMALI, A. A.; AFSHAR, P.; ABRAMS, R. A.; LIEBER, R. L. Skeletal muscle response to tenotomy. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 6, p. 851-862, 2000.

JÓZSA, L.; KANNUS, P. **Human tendon: anatomy, physiology and pathology**. Champaign: Human Kinetics, 1997.

JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THORING, J.; REFFY, A.; JARVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 72, p. 293-297, 1990.

JÓZSA, L.; THORING, J.; JARVINEN, M.; KANNUS, P.; LEHTO, M.; KVIST, M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: An experimental study in the rat calf muscles. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 49, p. 267-278, 1988.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v.11, p. 447-455, 1979

KARPATI, G. M.; CARPENTER, S.; EISEN, A. Experimental core-like lesions and nemaline rods. A correlative morphological and physiological study. **Archives of Neurology**, v. 27, p. 237-251, 1972.

KHAN, K. M.; COOK, J. L.; BONAR, F.; HARCOURT, P.; ASTROM, M. Histopathology of common tendinopathies. **Sports Medicine**, v. 27, n. 6, p. 393-408, 1999.

KILLINGSWORTH, C. R. Repair of injured peripheral nerves, tendons and muscles. In: HARARI, J. **Surgical complications and wound healing in the small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1993. cap. 7, p.169-202.

KLITGAARD, H.; MANTONI, M.; SCHIAFFINO, S.; AUSONI, S.; GORZA, L.; LAURENT-WINTER, C.; SCHNOHR, P.; SALTIN, B. Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men male with different training backgrounds. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 140, p. 41-54, 1990.

KONDO, H.; NAKAGAKI, I.; SASAKI, S.; HORI, S.; ITOKAWA, Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. **The American Journal of Physiology**, v. 265, p. 839-844, 1993.

KRAUS, W.; TORGAN, C. E.; TAYLOR, D. A. Skeletal muscle adaptation low frequency motor nerve stimulations. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 22, p. 313-360, 1994.

KROCHMAL, D. J.; KUZON JR, W. M.; URBANCHEK, M. G. Muscle force and power following tendon repair at altered tendon length. **The Journal of Surgical Research**, v. 146, n. 1, p. 81-89, 2008.

KUSCHNER, S. H.; ORLANDO, C. A.; MCKELLOP, H. A.; SARMIENTO, A. A comparison of the healing properties of rabbit Achilles tendon injuries at different levels. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 272, p. 268-273, 1991.

LEADBETTER, W.; MOOAR, P.; LANE, G.; LEE, S. The surgical treatment of tendinitis. Clinical rationale and biologic basis. **Clinics in Sports Medicine**, v. 1, p. 679-712, 1992.

MAGAUDDA, L.; MAURO, D. D.; TRIMARCHI, F.; ANASTASI, G. Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. **Basic and Applied Mycology**, v. 14, n. 1, p.17-21, 2004.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 493-495, 1961.

MAXWELL, L. C.; MOODY, M. R.; ENWEMEKA, C. S. Muscle atrophy continues after early cast removal following tendon repair. **The Anatomical Record**, v, 233, n. 3, p. 376-386, 1992.

MAYER, W. P. **Características estruturais, ultraestruturais e morfoquantitativas das fibras do músculo tibial anterior e sóleo de ratos jovens submetidos à imobilização da articulação talocrural**. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

MCLACHLAN, E. M. Modification of the atrophic effects of tenotomy on mouse soleus muscles by various hind limb nerve lesions and different levels of voluntary motor activity. **Experimental Neurology**, v. 81, n. 3, p. 669-682, 1983.

MCNEILLY, C. M.; BANES, A. J.; BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. Tendon cell in vivo form a three dimension network of cell processes linked by gap junctions. **The American Journal of Anatomy**, v. 189, p. 593-600, 1996.

MORAES, J. R. E. **Estudo comparado dos aspectos morfofuncionais de tendões na constituição normal e na evolução do processo cicatricial**. 2001. 172 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

MOURA, I. M. W.; DOS SANTOS, F. F.; MOURA, J. A. A.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional área in skeletal muscle fibers of wistar rats after swimming training. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 1, p. 87-95, 2002.

NEWMAN, J. J.; STROME, D. R.; GOODWIN, C. W.; MASON, JR, A. D.; PRUITT JR., B. A. Altered Muscle Metabolism in Rats After Thermal Injury. **Metabolism**, v. 31, n. 12, p. 1229-1233, 1982.

NIXON, A. J.; STASHAK, T. S.; SMITH, F. W.; NORRDIN, R. W. Comparison of carbon fiber and nylon suture for repair of transected flexor tendons in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 2, p. 93-102, 1984.

O'BROIN, E. S.; EARLEY, M. J.; SMYTH, H.; HOOPER, A. C. Absorbable sutures in tendon repair: a comparison of PDS with prolene in rabbit tendon repair. **The Journal of Hand Surgery**, v. 2, n. 4, p. 505-508, 1995.

OGATA, T. A. Histochemical studies on red and white muscle fibers. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibers. **Acta Medica Okayama**, v. 12, p. 233-240, 1958

OKITA, M.; YOSHIMURA, T.; NAKANO, J.; MOTOMURA, M.; EGUCHI, K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat muscle. . **The of Muscle Research and Cell Motility**, v. 25, p. 159-166, 2004.

OLIVEIRA, F. **Características histoquímicas das fibras musculares do m. gastrocnêmio de ratos Wistar submetidos à lesão térmica por escaldamento**. 2006. 140 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PARIZOTTO, N. **Ação do Laser He-Ne sobre o processo de reparo tecidual: um estudo por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectometria infravermelho**. 1998. 181 f. (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, UNICAMP, Campinas, 1998.

PATRICK, J. H. Techniques of psoas tenotomy and rectus femoris transfer: "new" operations for cerebral palsy diplegia - a description. **Journal of Pediatric Orthopaedics - Part B**, v. 5, p. 242-246, 1996.

PETER, H. W.; WOLF, H. U. Kinetics of (Na + ,K +) - ATPase of human erythrocyte membranes. I. Activation by Na + and K +. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 290, n. 1, p. 300-309, 1972.

PETER, J.; BARNARD, R.; EDGERTON, V. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v. 11, p. 2627- 2634, 1972.

PETTE, D; STARON, R. S. Mammalian Skeletal Muscle Fiber Type Transitions. **International Review of Cytology**, v. 170, p. 143-223, 1997.

PETTE, D; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, p. 500-509, 2000.

PETTE, D; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 115, p. 359-372, 2001

PHILIPPI, M.; SILLAU, A. H. Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 189, p. 1-11, 1994.

POSTACCHINI, F.; DE MARTINO, C. Regeneration of rabbit calcaneal tendon maturation of collagen and elastic fibers following partial tenotomy. **Connective Tissue Research**, v. 8, n. 1, p. 41-47, 1980.

RAISER, A. G. Patologia cirúrgica veterinária. In:_____ **Regeneração tecidual**. Santa Maria: Fatec, 1995. cap. 5, p. 115-135.

RAISER, A. G. Reparação do tendão calcâneo em cães. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 351-359, 2001.

RANTANEN, J.; HURME, T.; KALIMO, H. Calf muscle atrophy and Achilles tendon healing following experimental tendon division and surgery in rats. Comparison of

postoperative immobilization of the muscle-tendon complex in relaxed and tensioned positions. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 9, n. 1, p. 57-61, 1999.

REDDY, G. K.; GUN, S.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part II. Effects of combined Laser therapy and electrical stimulation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 6, p. 794-800, 1997.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendon. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 281-287, 1998.

REINKE, J. D.; KUS, S. P. Achilles mechanism injury in the dog. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 4, n. 8, p. 639-646, 1982.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 18, p. 208-213, 1963.

REYNOLDS, N. I.; WORREL, T. W. Chronic Achilles peritendinitis: etiology, pathophysiology, and treatment. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 13, n. 4, p. 171-176, 1991.

REZENDE, C. M. F.; SILVA, M. C.; LARANJEIRA, M. G.; BORGES, A. P. B. Estudo experimental do poliuretano de óleo de mamona (*Ricinus communis*) como substituto parcial do tendão calcâneo comum em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 695-700, 2001.

ROSE, S. L.; ROTHSTEIN, J. M. Muscle Mutability. Part 1. General concepts and adaptations to altered patterns of use. **Physical Therapy**, v. 62, n. 12, p. 1773-1787, 1982.

SALGADO, A. S. I. **Eletro fisioterapia – manual clínico**. Londrina: Midiograf, 1999. p. 71-90.

SALVINI, T. F. Plasticidade e adaptação dos músculos esqueléticos. In: MARQUES, A. P. **Cadeias musculares. Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global**. São Paulo: Manole, 2000.

SARNAT, H. B. Developmental disorders of muscle. In: MASTAGLIA, F. L.; WALTON, J. **Skeletal muscle pathology**. New York: Churchill Livingstone, 1982. p. 140-160.

SARTORI FILHO, R.; GANDOLF, W.; BANDARRA, E. P. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 9, n. 1, p. 69-77, 1997.

SAUNDERS, R.; BLUESTEIN, E.; WILSON, M.; BERLAND, J. Anterior segment ischemia after strabismus surgery. **Survey of ophthalmology**, v. 38, p. 456-466. 1994.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 2, p. 493-501, 1994.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; MACLEOD, S. A. B. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**, v. 81, p. 1810-1816, 2001.

SHER, J.; CARDASIS, C. Skeletal muscle fibers types in the adult mouse. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 54, p. 46-56, 1976.

SILVA, R. H. G. **Análise eletromiográfica e morfológica dos músculos masséteres de macacos-prego (Cebus apella) submetidos à secção unilateral do nervo massetérico**. 1999. 120 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1999.

SILVADO, C. E.; WERNECK, L. C. Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. **Muscle Nerve**, v. 34, n. 1, p. 72-77, 2006.

SIMONEAU, J. A.; BOUCHARD, C. Genetic determinism of fiber type proportion inhuman skeletal muscle. **The FASEB journal**, v. 9, p. 1091-1095, 1995.

SIMONEAU, J. A.; PETTE, D. Species-specific effects of chronic nerve stimulation upon tibialis anterior muscle in mouse, rat, guinea pig, and rabbit. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 412, p. 86-92, 1988.

SMERDU, V.; MIZRACHI, I. K.; CAMPIONE, M.; LEINWAND, L.; SCHIAFFINO, S. Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIB fibers of human skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 267, p. C1723-C1728, 1995.

SMITH, H. K.; MAXWELL, L.; MARTYN, J. A.; BASS, J. J. Nuclear DNA fragmentation and morphological alteration in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. **Cell and Tissue Research**, v. 302, p. 235-241, 2000.

SNOJ-CVETKO, E.; SMERDU, V.; SKETEL, J. J.; DOLENC, I.; D'ALBIS, A.; JANMOT, C.; ERZEN, I. Adaptive range of myosin heavy chain expression in regenerating soleus is broader than in mature muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 17, n. 4, p. 401-409, 1996b.

SNOJ-CVETKO, E.; SKETEL, J. J.; DOLENC, I.; OBREZA, S.; JANMOT, C.; D'ALBIS, A.; ERZEN, I. Regenerated rat fast muscle transplanted to the slow muscle bed and innervated by the slow nerve, exhibits an identical myosin heavy chain repertoire to that of the slow muscle. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 106, n. 5, p. 473-479, 1996a.

SOMA, C. A.; MANDELBAUM, B. R. Repair of acute achilles tendon ruptures. **Orthopedic Clinics of North American**, v. 26, n. 2, p. 239-247, 1995.

SONG, L.; OLSEN, R. E.; SPALAZZI, J. P.; DAVISSON, T. Biomechanical evaluation of acellular collagen matrix augmented Achilles tendon repair in sheep. **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 49, n. 5, p. 438-441, 2010.

STADLER, I.; LANZAFAME, R. J.; EVANS, R.; NARAYAN, V.; DAILEY, B.; BUEHNER, N.; NAIM, J. O. 830 nm irradiation increased the wound tensile strength in a diabetic murine model. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 28, p. 220-226, 2001.

STARON, R. S.; KRAEMER, W. J.; HIKIDA, R. S.; FRY, A. C.; MURRAY, J. D.; CAMPOS, G. E. R. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 111, p. 117-123, 1999.

STEDMAN'S MEDICAL DICTIONARY. Baltimore: Williams and Wilkins; 1990. p. 1562.

STEIN, J. M.; PADYKULA, H. A. Histochemical Classification of Individual Skeletal Muscle Fibers of the Rat. **The American Journal of Anatomy**, v. 110, n. 79, p. 103-123, 1962.

STEHNO-BITTEL, L.; REDDY, G. K.; GUM, S.; ENEWEMEKA, C. S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: Part I. effects of rigid plaster casts and

functional casts. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 30, n. 6, p. 788-793, 1998.

STOLINSKI, C. Disposition of collagen fibrils in human tendon. **The American Journal of Anatomy**, v. 186, p. 577-583, 1995.

STRICKLAND, J. W. Flexor tendon injuries: I foundations of treatment. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 3, p. 44-54, 1995.

THOMASON, D. B.; BOOTH, F. W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. **Journal Applied Physiology**, v. 68, p. 1-12, 1990.

TOMANEK, R.J.; COOPER, R. Ultrastructural changes in tenotomized fast and slow-twitch muscle fibers. **Journal of Anatomy**, v. 113, pt 3, p. 409-424, 1972.

TROOP, R.; LOSSE, G. M.; LANE, J. G.; ROBERTSON, D.; HASTINGS, P. S.; HOWARD, M. E. Early motion after repair of Achilles tendon ruptures. **Foot & ankle international**, v. 16, p. 705-709, 1995.

TSAI, A. M.; JAMALI, A. A.; ABRAMS, R. A.; LIEBER, R. L. Skeletal muscle recovery following tenotomy and simulated seven day delayed tendon repair. **Transactions Orthopaedic Research Society**, v. 23, p. 663, 1998.

VENEMA, H. W.; OVERWEG, J. Analysis if the size and shape of cross sections of muscle fibers. **Medical & Biological Engineering**, v. 12, p. 681-692, 1974.

WANG, D. E. Tendon repair. **Journal of Hand Therapy Philadelphia**, v. 11, n. 2, p. 105-110, 1998.

WERNECK, L. C. O valor da biópsia muscular em neurologia: análise de 290 exames à fresco e pela histoquímica. **Revista Brasileira de Clínica e Terapia**, v. 10, p. 2-24, 1981.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue change in immobilized muscle. **The American Journal of Anatomy**, v. 138, p. 343-350, 1984.

WILLOUGHBY, D. S.; ROSENE, J. M. Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 6, p. 923-929, 2003.

WU, Y. F.; CAO, Y.; ZHOU, Y. L.; TANG, J. B. Biomechanical comparisons of four-strand tendon repairs with double-stranded sutures: effects of different locks and suture geometry. **The Journal of Hand Surgery**, v. European, 2010.

YU, G.; JI-FU, J.; WEI, Y. New method: a new embedding method for tendon suturing. **Chinese Medical Journal**, v. 103, n. 11, p. 952-955, 1990.

ZACKSENHAUS, E.; JIANG, Z.; CHUNG, D.; MARTH, J. D.; PHILIPS, R. A.; GALLIE, B. pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. **Genes & Development**, v. 10, p. 3051-3064, 1996.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1984.

ZATITI, S. C. A.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H. Comparative experimental study of tensile strenght of 6 tendinous suture techniques. **Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia**, v. 3, n. 7, p.555-560, 1997.

ZUMIOTTI, A. Z. Sutura em cirurgia ortopédica. In: HERING, F. L.; GABOR, S.; ROSEMBER, D. **Bases e técnicas teóricas de fios e suturas**. São Paulo: Roca, 1993. cap.17, p.137-141.

ANEXO

ANEXO A – Tabela de número randômicos

I S S S T E R E O L O G Y C O U R S E

You are looking for a random number R fulfilling $1 \leq R \leq 57$.

1: Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out! (= 9)

2: In the block with that number read the unused digits in pairs until a pair fulfill the criterion. (= 26)

Cross out all read pairs. If the upper limit of the number you are looking for is ≥ 100 you deal with triplets in stead, etc.

Random Numbers

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--