ADRIANO POLICAN CIENA

ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRA-ESTRUTURAL DOS
MÚSCULOS ESTERNOMASTÓIDEO E CLEIDOMASTÓIDEO
DE RATOS WISTAR ADULTOS E IDOSOS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

ADRIANO POLICAN CIENA

ANÁLISE ESTRUTURAL E ULTRA-ESTRUTURAL DOS
MÚSCULOS ESTERNOMASTÓIDEO E CLEIDOMASTÓIDEO
DE RATOS WISTAR ADULTOS E IDOSOS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Ii-sei Watanabe

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ciena, Adriano Polican.

Análise estrutural e ultra-estrutural dos músculos esternomastóideo e cleidomastóideo de ratos Wistar adultos e idosos / Adriano Polican Ciena. -- São Paulo, 2011.

Orientador: li-sei Watanabe.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Envelhecimento do músculo esquelético.

Versão do título para o inglês: Structural and ultrastructural analysis of the sternomastoid and cleidomastoid muscles of the adults and aged Wistar rats.

Descritores: 1. Músculo esquelético 2. Envelhecimento 3. Ratos 4. Microscopia de Luz 5. Microscopia Eletrônica de Varredura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão I. Watanabe, li-sei II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Anatomia III. Título.

ICB/SBIB010/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Adriano Polican Ciena.

Título da Dissertação: Análise estrutural e ultra-estrutural dos músculos
esternomastóideo e cleidomastóideo de ratos wistar adultos
e idosos .

Orientador(a): li-sei Watanabe.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**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 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **159** nas fls. **79** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Ii-Sei-Watanabe, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Análise estrutural e ultra-estrutural dos músculos esternomastóideo e cleidomastóideo de ratos adultos jovens e idosos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Adriano Polican Ciena**, 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 NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **18.01.10**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de janeiro de 2010.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus queridos pais, João Carlos Alves Ciena e Rosi Polican Ciena, a quem devo tudo, sempre me apoiaram e souberam pacientemente compreender os caminhos da minha jornada.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Newton Sabino Canteras.

Ao Prof. Dr. Ii-sei Watanabe, orientador, mestre e espelho. Pela confiança depositada, transmitindo os conhecimentos no ensino da anatomia humana e na pesquisa científica.

À Profa. Dra Mamie Mizusaki Iyomasa, pela concessão de parte do material histoquímico utilizado nesta pesquisa.

Aos meus irmãos, Fabiana Polican Ciena e Juliano Polican Ciena, obrigado por toda a ajuda e incentivo, gostaria de dizer que amo vocês.

À minha namorada, Cristina de Sousa Bolina. Muito obrigado pelo carinho, paciência, incentivo e o conforto das suas palavras.

Ao meu cunhado, Fabio Renato Moro Malerba Simões, pela amizade e apoio durante todos esses anos.

Aos colegas Professores: Gladson Ricardo Flor Bertolini, Eduardo Alexandre Loth (UNIOESTE) e Ismaelino Nunes Mauro Magno (UNIPAR/UFPA), Marcos Barbosa Salles (UNIB), exemplos de profissionais. Agradeço cada momento que estiveram ao meu lado. Pela ajuda incondicional e tempo dispensado na minha formação, pelos valiosos conselhos e palavras de estímulo.

Ao querido Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, pelos ensinamentos e incentivo em todas as aulas de Anatomia Humana.

Aos Profs. Dr. Cesar Alexandre Fabrega Carvalho e Dr. Esem Pereira Cerqueira pelas orientações e ensinamentos durante as supervisões no

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE da disciplina de Anatomia Humana, para os cursos de Medicina e Nutrição.

Ao Prof. Dr Edson Aparecido Liberti, Chefe do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas, pela concessão do seu laboratório para que parte deste trabalho fosse realizado.

Às Profas. Dra. Maria Inês Nogueira, Dra Silvia de Campos Boldrini, Dra. Silvia Lacchini, Dra Maria Luíza Moraes Barreto de Chaves pela atenção dedicada.

Aos membros efetivos da banca do exame de qualificação, Profa. Dra. Helen Haruka Miyabara, Profa. Patrícia Castelucci e Prof. Dr. Marcelo Cavenaghi Pereira da Silva, pelas valiosas análises críticas e pertinentes sugestões na avaliação deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de anatomia do ICB pelos auxílios prestados.

Aos colegas de pós-graduação do Departamento de Anatomia, em especial Daniella Sabino Batagello “pdf” e Marcus Paulo Ribeiro Machado, muito obrigado por tudo.

Aos Srs. Adevair Urenha Alves “Tim”, Edson Dantas da Silva “Edinho”, Everton Luís Pavan Torres, José Adão Mendes, Giovaldo Serafim Correia “Gil”, obrigado pelos dias prazerosos que proporcionaram no prédio didático durante os estudos anatômicos.

Aos Srs. Sonia Regina Yokomizo de Almeida, Marta Maria da Silva Righetti e Sebastião Aparecido Boleta. Verdadeiros “anjos” que tive o privilégio de conhecer e conviver ao longo destes anos. Muito obrigado por tudo!

Ao setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento ICB-I, pelos períodos disponibilizados para examinar

as amostras musculares e ao Téc. Edson Rocha de Oliveira, obrigado pelas inúmeras horas de auxílio com os microscópios eletrônicos.

A Rosana Prisco, pela paciência e ajuda com os dados estatísticos.

A Sra. Maria Cristina dos Santos Faustino, obrigado pelos incentivos e momentos prazerosos no Museu de Anatomia.

Aos meus queridos amigos Paulo Henrique de Matos Alves e Regina de Sousa Bolina Matos, momentos maravilhosos tive ao lado de vocês. Obrigado pelo presente.

Aos colegas, Luciano Gonçalves, Flávio Tampelini, Ricardo Eustáquio da Silva e Thiago Habacuque Silva de Souza pela inestimável amizade. Foi um prazer estudar e aprender anatomia ao longo destes anos durante as monitorias do PAE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

E aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

CIENA, A. P. **Análise estrutural e ultra-estrutural dos músculos esternomastóideo e cleidomastóideo de ratos Wistar adultos e idosos.** 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os músculos esqueléticos da região cervical apresentam ampla evolução relatada na anatomia comparada. O músculo esternocleidomastóideo em humanos exerce várias funções como nos movimentos das articulações crânio-vertebrais, posturais e na inspiração profunda. Este estudo foi realizado nos músculos esternomastóideo (EM) e cleidomastóideo (CM) em ratos Wistar adultos e idosos. Os relatos na literatura revelam que o processo fisiológico de envelhecimento muscular, apresenta adaptações morfofuncionais, com a diminuição da massa muscular, denominada de sarcopenia. O objetivo do presente estudo foi analisar estrutural e ultra-estruturalmente os músculos EM e CM adultos e idosos empregando métodos de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados revelaram os feixes de fibras colágenas que constituem o endomísio, perimísio e epimísio presentes no tecido muscular. Nos capilares dos músculos adultos observou-se a presença de pseudópodos endoteliais projetando-se para o lúmen capilar; a referida estrutura não foi encontrada nos capilares dos músculos idosos examinados. A reação histoquímica de NADH-tr permitiu a identificação dos tipos de fibras: Oxidativa (O), Glicolítica-oxidativa (GO) e Glicolítica (G) nas regiões superficial e profunda dos músculos EM e CM de animais adultos e idosos. Todavia, constatou-se aumento da área de secção transversa das fibras O, GO e G. Paralelamente, os dados mostraram diminuição da densidade total das fibras, revelando a plasticidade e atrofia muscular em animais com envelhecimento.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Envelhecimento. Ratos. Microscopia de luz. Microscopia eletrônica de varredura. Microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

CIENA, A. P. **Structural and ultrastructural analysis of the sternomastoid and cleidomastoid muscles of the adults and aged Wistar rats.** 2011. 116 p. Masters thesis (Morphofuncional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The skeletal muscles of the neck region present large evolution as noted in comparative anatomy. The sternocleidomastoid muscle in humans have several functions such as movements in the craniovertebral joints, posture and efforts inspiration. This study performed in the sternomastoid (SM) and cleidomastóideo (CM) muscles in adults and aged Wistar rats. The data observed in the literature revealed that physiological process of aging muscle present morphofunctional adaptations, with a decreasing muscle mass, called sarcopenia. The aim of the present study was to analyse structural and ultrastructure of SM and CM of adults and aged animals employing light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy methods. The results revealed the bundles of collagen fibers which constituted the endomysium, perimysium and epimysium in the muscle tissue. In the capillaries of the adults muscles observed the presence of endothelial pseudopod projected to the capillary lumen; this structure do not found in the capillaries of the examined aged muscles. The histochemical reaction of NADH-tr, allowed to identify three types of fibers: Oxidative (O), Oxidative-Glycolytic (OG) and Glycolytic (G) in the surface and deep regions of the SM and CM muscles of adult and aged animals. However, may observed an increased areas of the cross-section the fibers O, OG and G. Parallely, the data showed decreased total density of the fibers, revealing the muscle atrophy and plasticity in aging animals.

Key words: Skeletal muscle. Aging. Rats. Light microscopy. Scanning electron Microscopy. Transmission electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM adulto. Revela o arranjo estrutural das fibras musculares em fascículos (setas) e fusos neuro-musculares. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μm 44
- Figura 2 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM adulto. Nota-se em linhas vermelhas o tecido conjuntivo que envolve as fibras e fascículos musculares (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 μm44
- Figura 3 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM adulto. Revela o aspecto geral das fibras musculares com diâmetros variados. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μm45
- Figura 4 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM adulto. Observa-se as fibras musculares envoltas pelo tecido conjuntivo do perimísio (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 μm 45
- Figura 5 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM idoso. Observa-se a presença de fusos neuro-musculares (setas) e espessa área de tecido conjuntivo (*) entre os fascículos musculares. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μm47
- Figura 6 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM idoso. Observa-se a disposição das fibras musculares envolvidas por tecido conjuntivo corado intensamente em vermelho (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 μm 47
- Figura 7 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM idoso. Observa-se alteração morfológica do fuso neuro-muscular (seta) e vasos sanguíneos (*) entre os fascículos musculares. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μm 48

Figura 8 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM idoso. Evidencia as fibras musculares e o tecido conjuntivo do endomísio e perimísio (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 µm..... 48

Figura 9 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM adulto, região superficial. Evidencia-se a diferenciação dos tipos de fibras musculares: Glicolítica (G), Glicolítica-oxidativa (GO) e Oxidativa (O). Reação-NADH-th. Barra 100 µm.....49

Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Revela a disposição transversal das fibras musculares e seus envoltórios: endomísio (seta), perimísio (P) e epimísio (E). Barra: 100 µm..... 51

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Observa-se os feixes musculares (*) e presença de tecido conjuntivo entre as fibras e feixes musculares (setas). Barra: 100 µm..... 51

Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto pós-fixada em tetróxido de ósmio revela as estriações transversais das fibras musculares (setas pretas) e pedículo neuro-vascular (seta branca). Barra: 100 µm..... 52

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto tratada com solução de NaOH, evidencia o endomísio (cabeça de setas) e o perimísio (setas). Barra: 100 µm..... 52

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto tratada com solução de NaOH, evidenciando o endomísio (setas) e feixes de fibras colágenas do perimísio (*). Barra: 10 µm.....53

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral do feixe de fibras musculares. Barra: 100 µm.....	53
Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Observa-se em disposição transversal os feixes musculares (seta) e tecido conjuntivo entre as fibras (*). Barra: 100 µm.....	55
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Observa-se a superfície de fratura das fibras musculares (setas). Barra:100 µm.....	55
Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto tratada com solução de NaOH, evidenciando o endomísio (setas) e o perimísio (*). Barra: 100 µm.....	56
Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto tratada com solução de NaOH, revelando as paredes delgadas do endomísio (setas). Barra: 10 µm.....	56
Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral do feixe muscular de diferentes diâmetros. Barra: 100 µm.....	57
Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Revela, transversalmente, a presença de tecido conjuntivo (setas) entre os feixes musculares (*). Barra: 100 µm.....	59
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Revela em disposição longitudinal das fibras musculares (setas), o tecido conjuntivo interposto (*). Barra: 100 µm.....	59

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso tratada com solução de NaOH. Revela o endomísio (setas) em forma de “favo de mel”, em aspectos tridimensionais. Barra: 100 µm.....	60
Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso tratada com solução de NaOH. Revela a espessa parede interna do endomísio (setas). Barra: 10 µm.....	60
Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral das fibras musculares. Barra: 100 µm.....	61
Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Mostra espessa camada de fibras colágenas (seta) entre os feixes de fibras musculares (*). Barra: 100µm.....	63
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Revela a disposição longitudinal das fibras musculares evidenciando as estriações transversais (*), membrana sarcoplasmática e feixes de fibras colágenas (setas). Barra: 10 µm.....	63
Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso pós-fixada em tetróxido de ósmio revelando o trajeto sinuoso dos capilares (setas) na superfície das fibras musculares. Barra: 10 µm.....	64
Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso tratada com solução de NaOH evidenciando o endomísio (setas) e espessa área de tecido conjuntivo (*). Barra: 100 µm.....	64
Figura 30 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso tratada com solução de NaOH evidenciando diâmetros variados de fibras musculares e espessamento das paredes do endomísio em aspectos tridimensionais (setas). Barra: 100 µm.....	65

Figura 31 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral das fibras musculares. Barra: 100 μ m..... 65

Figura 32- Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Observa-se duas células musculares (*) com mitocôndrias na periferia do sarcoplasma, entremeadas por um capilar sanguíneo (seta). Barra: 1 μ m.....68

Figura 33 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Evidencia-se mitocôndrias circulares (seta) na porção periférica do sarcoplasma da célula muscular e disposição transversal dos feixes de miofilamentos (*). Barra: 500 nm.....68

Figura 34 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Notam-se mitocôndrias alongadas e circulares próximo à membrana sarcoplasmática (cabeça de setas) e fibras colágenas (setas) no interstício dispostas transversalmente e longitudinalmente. Barra: 200 nm.....69

Figura 35 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Observa-se o sarcômero: banda A, I, linhas Z (seta), zona H, disposição longitudinal das cisternas do retículo sarcoplasmático (*). Barra: 200 nm.....69

Figura 36 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Evidencia-se a disposição longitudinal de feixes de miofilamentos e mitocôndrias, evidenciando suas cristas de dupla membrana (seta). Barra: 200 nm.....70

Figura 37 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Observa-se o capilar sanguíneo destacando as células endoteliais com inúmeras cavéolas e vesículas pinocíticas, a junção endotelial (cabeça de seta) e os pseudópodos endoteliais (setas) Barra: 200 nm.....70

Figura 38 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Nota-se no fuso neuro-muscular: o epineuro e seu respectivo núcleo, axônios mielínicos (setas),

amielínicos e células de Schwann. No axoplasma observa-se a presença de mitocôndrias e neurofilamentos. Barra: 2 µm.....71

Figura 39 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Nota-se na porção periférica do sarcoplasma, o botão terminal da placa motora revelando as fissuras pós-sinápticas (cabeças das setas), dobras juncionais (setas) e grupamento de mitocôndrias (M) Barra: 500 nm.....71

Figura 40. Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observam-se células musculares com seus núcleos periféricos alongados (setas) adjacentes à membrana sarcoplasmática entremeados por um capilar sanguíneo (*) e seu respectivo núcleo (N). Barra: 1 µm.....73

Figura 41 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se, no interstício, o capilar com seu núcleo (N) e a disposição transversal dos feixes de miofibrilas com o núcleo muscular na porção periférica da membrana sarcoplasmática (seta). Barra: 1 µm..... 73

Figura 42 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se a disposição paralela das fibras musculares e, no interstício, a presença de um capilar (C) com seu núcleo (N). Barra: 500 nm.....74

Figura 43 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se os feixes de miofibrilas (setas) e o mionúcleo (N) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 500 nm.....74

Figura 44 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se o grupamento de mitocôndrias (setas) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 500 nm.....75

Figura 45 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Nota-se em maior aumento, o grupamento de mitocôndrias (M) na região central próximo à membrana sarcoplasmática entre o núcleo da célula muscular (*) e o núcleo da célula satélite (seta). Barra: 200 nm.....75

Figura 46 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se parte das células musculares entremeadas por um capilar sanguíneo. Evidenciando claramente o núcleo (N) e as junções endoteliais (setas). Barra: 200 nm.....76

Figura 47 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Revela, em maior aumento, as vesículas pinocíticas (setas) e cavéolas (cabeça de setas) das lâminas citoplasmáticas da célula endotelial. Barra: 200 nm.....76

Figura 48 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Observa-se os sarcômeros em série, presença de grupamentos de mitocôndrias (setas) e, no interstício, a presença de uma hemácia no interior do capilar (*). Barra: 1 μ m.....78

Figura 49 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Presença de mitocôndrias com formatos ovóides e alongadas (setas) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 500 nm.....78

Figura 50 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Observa-se os feixes de miofibrilas e grupamento de mitocôndrias (seta) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 200 nm.....79

Figura 51 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Revela a lâmina basal da célula endotelial e a presença de cavéolas (seta), vesículas pinocíticas nas células endoteliais e parte celular do pericito (*) Barra: 200 nm.....79

Figura 52 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Observa-se o capilar sanguíneo com ausência de pseudópodos endoteliais (setas menores), presença de vesículas pinocíticas nas células endoteliais e mitocôndrias na parte citoplasmática do pericito (seta maior). Barra: 200 nm.....80

Figura 53 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Observa-se a disposição longitudinal dos feixes de miofibrilas com amplo espaçamento (seta). Barra: 1 μm	82
Figura 54 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Observa-se em maior aumento, a disposição paralela de feixes de miofibrilas, escassez de mitocôndrias (setas) na região subsarcolemal e a estrutura multivesicular (*). Barra: 200 nm.....	82
Figura 55 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Nota-se grupamento de mitocôndrias (seta) adjacente à membrana sarcoplasmática e feixes de miofibrilas (*). Barra: 200 nm.....	83
Figura 56 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Revela grupamento de mitocôndrias (*), interposto aos feixes de miofibrilas, evidenciando as cisternas do retículo sarcoplasmático (setas). Barra: 200 nm.....	83
Figura 57 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Observa-se o citoplasma da célula endotelial, vesículas pinocíticas (seta) na parede interna do capilar e ausência de pseudópodos endoteliais. Barra: 200 nm.....	84
Figura 58 - Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.....	86
Figura 59 - Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.....	88
Figura 60 - Média e desvio padrão da densidade ($\text{N}^\circ/\text{mm}^2$) dos tipos de fibras (DF) do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.....	90

Figura 61 - Média e desvio padrão da densidade (N°/mm^2) dos tipos de fibras (DF) do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.....85

Tabela 2 - Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.....87

Tabela 3 - Média e desvio padrão da porcentagem (%) dos tipos de fibras do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.....90

Tabela 4 - Média e desvio padrão da densidade ($\text{N}^\circ/\text{mm}^2$) dos tipos de fibras (DF) do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.....90

Tabela 5 - Média e desvio padrão da porcentagem (%) dos tipos de fibras, do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.....92

Tabela 6 - Média e desvio padrão da densidade ($\text{N}^\circ/\text{mm}^2$) dos tipos de fibras (DF) do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.....92

LISTA DE ABREVIATURAS

μm – Micrometro

μm^2 – Micrometro quadrado

AST – Área de secção transversa

ATPase – Adenosina Trifosfatase

CM – Cleidomastóideo

CO_2 – Gás carbônico

DF – Densidade dos tipos de fibras

EM – Esternomastóideo

G – Glicolítica

GO – Glicolítica-oxidativa

HCl – Ácido clorídrico

HE – Hematoxilina-eosina

Kg – Kilograma

Mg – Miligrama

MHC – Cadeia pesada de miosina

NABD-tr – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazolium Reductase

NaOH – Hidróxido de sódio

NBT – Nitro Blue Tetrazolium

Nm – Nanometro

O – Oxidativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 OBJETIVO.....	34
3 MATERIAL E MÉTODO.....	36
3.1 Grupo Experimental.....	37
3.2 Microscopia de Luz.....	37
3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	38
3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	39
3.5 Análise Morfométrica.....	40
3.6 Análise Estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Análise Qualitativa.....	43
4.1.1 <i>Microscopia de Luz</i>	43
4.1.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	50
4.1.3 <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	66
4.2 Análise Quantitativa.....	85
4.2.1 <i>Área de Secção Transversa dos Tipos de Fibras do Músculo M</i>	85
4.2.2 <i>Área de Secção Transversa dos Tipos de Fibras do Músculo CM</i>	87
4.2.3 <i>Densidade dos Tipos de Fibras do Músculo EM</i>	89
4.2.4 <i>Densidade dos Tipos de Fibras do Músculo CM</i>	91
5 DISCUSSÃO.....	93
6 CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXO – Tabela de Números Randômicos.....	116

O músculo estriado esquelético dos vertebrados tem origem nas células do mesoderma, à partir dos somitos do embrião e da lâmina mesodérmica precordial, com diferenciação terminal associada ao ciclo celular, sendo este um processo dinâmico que envolve diversas proteínas reguladoras (ZACKSENHAUS et al., 1996; MOORE; PERSAUD, 2008).

Os músculos esqueléticos da região cervical apresentam ampla evolução, relatada através da anatomia comparada (BEMIS; LAUDER, 1986). Evidências à homologia em favor da teoria da evolução sugerem ancestralidade comum a organismos distintos que apresentam estruturas musculares semelhantes, referidas através de dissecações realizadas em peixes até o homem moderno (DIOGO et al., 2008).

Em humanos, o músculo esternocleidomastóideo exerce amplas funções, como nos movimentos das articulações crânio-vertebrais (MISSAGHI, 2004), posturais e na inspiração profunda (PARTHASARATHY et al., 2007; PINTO, CARVALHO, 2008). É constituído por dois ventres: esternal (porção longa) e clavicular (porção curta), e inervação proveniente do nervo acessório, XI par craniano. Recebe esta nomenclatura em virtude de suas origens musculares e sua inserção no processo mastóideo do osso temporal (ULLAH et al., 2007).

Em mamíferos roedores (*Rattus norvegicus*), os músculos homólogos ao esternocleidomastóideo de humanos, isto é, esternomastóideo e cleidomastóideo estão separados por uma delgada membrana de tecido conjuntivo. Portanto, são distintos e localizados paralelamente, sendo o esternomastóideo (anterior) e cleidomastóideo (posterior) (DIOGO, 2009).

A fibra muscular, definida como unidade funcional, apresenta-se alongada e multinucleada, com diâmetros que variam de 10 a 100 micrometros em distintos músculos esqueléticos de mamíferos, com o citoplasma contendo feixes de miofibrilas. As fibras musculares estão organizadas em grupos paralelos e envolvidas por feixes de fibras de colágeno. A disposição destes feixes possibilita certo grau de alteração no comprimento das fibras musculares durante a contração e relaxamento muscular (ISHIKAWA; SAWADA; YAMADA, 1982).

A organização muscular apresenta-se em diversas disposições como: longitudinal, transversal ou oblíqua. Histologicamente, uma fibra muscular está envolvida por uma camada de tecido conjuntivo, denominada de endomísio. O conjunto de fibras organizadas em fascículo é envolvido pelo perimísio. Além disso,

as fibras musculares equivalentes encontram-se agrupadas, como um todo, formando o músculo. Este é envolvido pelo epimísio, constituído por uma camada espessa de tecido conjuntivo (MACCONNACHIE; ENESCO; LEBLOND, 1964; LIGHT; CHAMPION, 1984; NISHIMURA; HATTORI; TAKASHI, 1994).

Na organização espacial do colágeno do endomísio observam-se três tipos de estruturas de colágenos: o tipo I, consiste de uma densa rede de fibras colágenas onduladas na superfície da fibra muscular; o tipo II, composto de feixes de fibras colágenas transversalmente entre as fibras musculares e a miofibrilas, ligando-as entre si, constituindo um retículo sarcoplasmático frouxo; e o tipo III, adjacentes aos vasos sanguíneos (VASILEV; ANDREEV; KÜHNEL, 1995). O perimísio possui várias camadas de lâminas onduladas de fibras colágenas formadas por feixes compactos de fibras; o epimísio contém duas camadas, uma sendo interna, com numerosas fibras colágenas dispostas em um padrão ondulado paralelo à fibra muscular e outra externa, composta de várias lâminas onduladas constituídas por feixes de fibras colágenas correndo transversalmente ao eixo da fibra muscular (NISHIMURA; HATTORI; TAKASHI, 1994). Watanabe (1982) observou, em músculos masseter de camundongos, os feixes de fibras colágenas que apresentavam um arranjo em forma de rede sobre a superfície da membrana sarcoplasmática.

Além disso, Ohtani et al. (1988) revelaram o arranjo da rede de fibras colágenas da cápsula de vários tecidos e mostraram que, nos músculos cardíacos bovinos, os arranjos de fibras colágenas para acomodação de miócitos cardíacos apresentavam uma distribuição circunferencial ou espiral de fibras. Os autores notaram ainda que, na musculatura da língua de cães, o espaço para a acomodação da fibra muscular foi demarcado por uma bainha cilíndrica representada por uma rede fibrilar colágena do endomísio, formada por duas camadas: uma interna, de fibras colágenas arrançadas em espiral, e uma externa, com feixes de fibras colágenas longitudinais. Assim, concluíram que a rede fibrilar colágena apresenta características específicas em órgãos e tecidos, sugerindo que tais formações não só constituem um “arcabouço de sustentação”, como também, proporcionam um meio adequado para a atividade celular. Nishimura, Hattori e Takashi (1994), Watanabe (1998) e Motoyama (2004) revelaram através da microscopia eletrônica de varredura, o tecido conjuntivo intramuscular do músculo semitendíneo de mamíferos e animais de laboratório e observaram que, o endomísio possui ultra-

estruturalmente, a característica de “favo de mel” rodeado por uma lâmina cilíndrica de fibras colágenas, alojando uma fibra muscular individualmente.

Estruturalmente, o sarcolema é uma membrana contínua à porção terminal da fibra muscular. A membrana é voltada internamente ao sarcoplasma formando uma série de fendas e invaginações, e a face externa da lâmina basal do sarcolema possui as fibras colágenas do tendão muscular. Existem evidências de formação de miofilamentos na porção terminal do sarcoplasma em forma de ribossomos livres e filamentos delgados, sendo considerados como local de possível crescimento longitudinal da fibra muscular (MACKAY; HARROP; MUIR, 1969).

As características das estriações claras e escuras das miofibrilas dos músculos esqueléticos são devido às disposições destes miofilamentos. As bandas escuras são chamadas banda A, e as bandas claras chamadas de banda I. Em maior aumento, através do método de microscopia eletrônica de transmissão, podem ser observadas linhas escuras finas na região central das bandas I, estas chamadas de linhas Z. A disposição dos filamentos espessos e finos entre um par de linhas Z forma um padrão estrutural repetitivo representando a unidade estrutural do músculo esquelético, denominada de sarcômero (WATANABE, 1998; MOTOYAMA, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TAJSHARGHI, 2008).

As miofibrilas são formadas por miofilamentos com espessura, comprimento e composição química diferentes. Os filamentos espessos contêm miosina, e os delgados, actina. Na banda A, os filamentos de actina e miosina estão interpostos. Os filamentos de miosina chegam até o limite da banda A e, os de actina partem de cada linha Z, estendendo-se por 1 micrometro em cada direção para formar a banda I e também parte da banda A. A porção média da banda A constitui a banda H, que apresenta apenas filamentos espessos. A linha M corresponde a uma estrutura transversal de união no meio da banda H, constituída por uma proteína fixadora de miosina que é envolta por seis filamentos de actina (GENESER, 1999; MOTOYAMA, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TAJSHARGHI, 2008). Os sarcômeros das fibras musculares da mastigação foram verificados na posição de oclusão e na abertura bucal, apresentando arquitetura muscular variada (VAN EIJDEN; KORFAGE; BRUGMAN, 1997). Através da análise ultra-estrutural, Trotter, Eberhard e Samora (1983) notaram que, a lâmina interna das fibras musculares possui filamentos de actina com distanciamento central de 12 nanômetros, com orientação paralela à membrana plasmática. A lâmina interna

apresentou-se conectada, morfológicamente, à lâmina externa (lâmina densa) por uma grande quantidade de filamentos orientados com aproximadamente 2 a 8 nanômetros de diâmetro.

Watanabe e König (1977) em observações neuro-histológicas da língua de macaco prego (*Cebus apella*) relataram que, a camada muscular apresenta fibras musculares dispostas em diversas direções, ou seja, longitudinal, superior e inferior, transversal e fibras musculares oblíquas. Sato e Sato (1992) estudaram o desenvolvimento de músculos da língua humana, no período compreendido entre 24 a 28 semanas de gestação e relataram que, o desenvolvimento das miofibrilas ocorreu primeiramente nos feixes verticais e transversais e, posteriormente, nos longitudinais.

O retículo sarcoplasmático liso consiste de uma rede de vesículas achatadas, esféricas e tubulares que se intercomunicam apresentando uma parede composta por membranas que delimita cavidades, as cisternas, que constituem um sistema de túneis (CLARK et al., 2002). Para Geneser (1999), na fibra muscular esquelética o retículo sarcoplasmático liso forma um retículo denso de sarcotúbulos que circundam cada miofibrila. A maior parte destes sarcotúbulos segue em sentido longitudinal em relação às bandas e se anastomosam entre si. Dois destes tubos circundam a miofibrila de ambos os lados de um tubo mais delgado, o túbulo transversal, ou túbulo T, e este conjunto é denominado de tríade. Os túbulos T comunicam-se com o espaço extracelular, uma vez que são invaginações do sarcolema.

O potencial de ação (estímulo neuro-muscular) sobre o sarcolema das fibras musculares é imediatamente conduzido às miofibrilas através do sistema do túbulo T que, por sua vez, transmite o impulso para outro sistema, o retículo sarcoplasmático envolto pelos miofilamentos (SAWADA; ISHIKAWA; YAMADA, 1978). Geneser (1999) descreve que um potencial de ação propaga-se, através do túbulo T, com rapidez desde a superfície da fibra até o interior, onde favorece a liberação de íons de cálcio, à partir do retículo até o sarcoplasma circundante, produzindo a contração da fibra muscular.

Com relação à morfologia das mitocôndrias, estas são organelas alongadas ou circulares constituídas por duas membranas: a externa denominada membrana plasmática, sendo a interna pregueada, originando dobras em forma de túbulos que foram relatadas por Watanabe (1998) em músculos esqueléticos de ratos.

Os mecanismos de fornecimento de energia necessários para às contrações das fibras musculares são funcionalmente obtidos através da liberação de energia gradual das moléculas de ácidos graxos e glicose, produzindo calor e moléculas de ATP. A energia armazenada é utilizada pelas células musculares para a sua contração (CLARK et al., 2002).

Ishikawa, Sawada e Yamada (1982) observaram que as fibras musculares vermelhas são ricas em mitocôndrias, frequentemente dispostas em fileira entre as miofibrilas e em agregados abaixo do sarcolema. Sua distribuição mais comum ocorre na área da banda I. Nas fibras brancas, as mitocôndrias são, consideravelmente, reduzidas em quantidade e localizadas na região da banda I.

Ogata e Yamazaki (1985) verificaram, ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, o arranjo das mitocôndrias em fibras de músculos estriados vermelho, branco e intermediário. Observaram a disposição paralela de mitocôndrias esféricas, ovóides ou alongadas entre as miofibrilas e acúmulo de mitocôndrias esféricas na porção lateral do sarcoplasma em aspectos tridimensionais. Foram localizadas numerosas mitocôndrias que formavam colunas limitando os dois lados da linha Z, particularmente abraçando as miofibrilas. As referidas colunas foram classificadas em dois tipos: a coluna mitocondrial espessa, formada por múltiplas mitocôndrias, cada uma com espaço inter-miofibrilar correspondendo a um sarcômero; e a coluna mitocondrial fina, constituída por uma mitocôndria.

Ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, as mitocôndrias apresentaram diâmetros e formatos variados e são frequentemente encontradas em associação íntima com as membranas do retículo endoplasmático rugoso (TANAKA, 1981; LEA; HOLLENBERG, 1989; WATANABE; KORIYAMA; YAMADA, 1992; MOTOYAMA, 2004; D'AVOLA et al., 2006; LOPES et al., 2009; MOTOYAMA et al., 2009).

No tecido muscular as colunas mitocondriais são abundantes, e de grande diâmetro nas fibras vermelhas, média nas fibras intermediárias e menos numerosas, formando colunas finas nas fibras brancas (OGATA; YAMASAKI, 1987). O número de mitocôndrias foi maior e, menor o volume do retículo sarcoplasmático na extremidade da fibra muscular, conforme as classificações dos tipos de fibras (EISENBERG; MILTON, 1984).

Diferentes classificações são utilizadas 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 grupamento miofibrilar podem ser avaliados por técnicas histoquímicas como a adenosina trifosfatase (ATPase) e nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase (NADH-tr), ao permitir diferenciar os tipos de fibras musculares (STEIN; PADYKULA, 1962; WERNECK, 1981; ROSE; ROTHSTEIN, 1982; DUBOWITZ, 1985; PETTE; STARON, 1997).

Brooke e Kaiser (1970) descreveram três tipos principais de fibras musculares, denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB e relataram 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.

As correlações dos tipos de fibras musculares com suas funções fisiológicas resultaram em diferentes nomenclaturas por classificações. Ao classificar as fibras musculares em: vermelhas, brancas e intermediárias, com base na reação histoquímica por adenina dinucleotídeo tetrazolium reductase (NADH-tr), ou seja, com reatividade forte, fraca e intermediária, respectivamente (BARNÁRD et al., 1971).

Peter e Wolf (1972) sugeriram que as classificações das fibras deveriam ser denominadas 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 I, a FR a do tipo IIA e a FF a do tipo IIB.

Os avanços nas técnicas de histoquímica e imunohistoquímica permitiram identificar sete tipos de fibras musculares no ser humano, baseadas na integridade de coloração para ATPase miofibrilar ou conjugação com anticorpos específicos: tipo I, Ic, IIc, IIac, Ila, IIab e IIb (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 (cadeia pesada da miosina), o perfil das enzimas metabólicas, as características bioquímicas e fisiológicas e suas propriedades estruturais e contráteis de acordo com Peter,

Barnárd e 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: Fibras de contração lenta: Tipo I (slow-twitch fibers), dependentes do metabolismo oxidativo (SO – slow oxidative); Fibras de contração rápida: Tipo IIA (fast-twitch fibers), dependentes do metabolismo oxidativo e glicolítico (FOG – fast oxidative and glycolytic); Fibras de contração rápida: Tipo IIB (fast-twitch fibers), dependentes do metabolismo glicolítico (FG – fast-twitch glycolytic).

A composição do tipo de fibra muscular pode sofrer influência por diversos fatores como predisposição genética, gênero e idade (ENGLISH et al., 1999). Numerosos estudos demonstram que os músculos esqueléticos de humanos sofrem alterações relacionadas com a idade, no tipo de fibra e na composição estrutural da MHC (ANDERSEN, 2003). Com envelhecimento ocorre aumento das fibras do tipo I e concomitantemente, diminuição das fibras tipo II nos músculos dos membros inferiores e do tronco (MONEMI et al., 1999).

As estruturas que constituem o músculo esquelético, por muitos anos, vêm sendo alvos de pesquisas para o conhecimento do amplo processo fisiológico do envelhecimento. Durante o envelhecimento, ocorre perda progressiva da massa muscular esquelética e diminuição paralela da força e resistência muscular. Esta condição é denominada de sarcopenia que implica em importantes investimentos com os cuidados na saúde e possível comprometimento sócio-cultural, uma vez que, contribui para fragilidade, perda funcional, dependências, deficiências, gastos elevados com o cuidado da saúde e morte prematura (LANG et al., 2009).

A força muscular diminui, principalmente, em indivíduos sedentários que se pontencializa quando associada à sarcopenia. Uma grande proporção desta atenuação ocorre pela diminuição da área de secção transversa e das fibras de contração rápida (tipo II) consequentemente aumentando a incidência e propensão a quedas. Há poucas informações sobre a síntese protéica muscular e sua degradação com o envelhecimento presente em sarcopênicos. Sendo estes determinantes para o equilíbrio e manutenção da massa muscular (LAMBERT e EVANS, 2002).

Os mecanismos celulares e moleculares que causam a sarcopenia são múltiplos, sendo atribuída ao estresse oxidativo, inflamação, alterações endócrinas, inatividade e desnutrição (MENG e YU, 2010). Estes fatores continuam a ser

pesquisados para futuras elucidações e associações entre outras patologias (THOMPSON, 2009).

Recentemente foi sugerido que o estresse oxidativo, inflamações crônicas e disfunção mitocondrial apresentam uma participação importante na atrofia muscular relacionada ao envelhecimento. A interação destes fatores interfere em várias vias de sinalização intracelular, comprometendo o equilíbrio entre a síntese protéica e degradação, acarretando em apoptose celular (MENG e YU, 2010).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre níveis oxidantes e anti-oxidantes. Durante o envelhecimento, tem demonstrada a predisposição do músculo esquelético a níveis maiores de estresse oxidativo, perante o repouso e durante a atrofia pelo desuso. Sugere-se que, sua participação e mediação seja induzida pelo desuso e atrofia muscular observada na patogenia da sarcopenia (MENG e YU, 2010).

Quando verificados fatores isolados observam-se alterações endócrinas presentes na sarcopenia, como a diminuição da secreção do hormônio de crescimento (GH) associada à diminuição da massa muscular com alterações na quantidade e diferenciação das células satélites (SHIBATA et al., 2010).

Uma das possíveis causas da diminuição progressiva da massa muscular associada com o declínio na eficiência regenerativa do músculo esquelético em indivíduos idosos é a diminuição da quantidade e diferenciação das células satélites (VERDIJK et al., 2007), possivelmente, em decorrência da morte celular por apoptose. Também tem sido sugerido que a ativação da proliferação e/ou diferenciação das células satélites podem sofrer alterações na sarcopenia (MALATESTA et al., 2010)

A senescência, a nível celular, é o crescimento irreversível e individual das células mitóticas, apresentando consequentes alterações em seu fenótipo. O comprometimento da função celular predispõe o tecido à progressão de patologias e/ou evolução gradual da senescência celular. No entanto, no passado, pesquisas no âmbito de elucidar os múltiplos mecanismos do envelhecimento comumente empregaram e abordaram separadamente, estudos do desenvolvimento de patologias. Recentemente, descobertas sobre os fenótipos relacionados à senescência e capacidade de detectar estas células em seres humanos tem contribuído com avanços de novas descobertas referentes à fisiologia do

envelhecimento, fator este que contribuirá com estudos do desenvolvimento e progressão de diversas patologias (BURTON, 2009).

Com o envelhecimento sabe-se que há redução da área seccional transversal de 30% com diminuição da potência muscular (PORTER; VANDERVOORT; LEXELL, 1995) variando conforme classificação, predomínio dos tipos de fibras musculares e gênero (LAMBERT e EVANS, 2002).

Lopes et al. (2009) recentemente relataram alterações ultra-estruturais no músculo da língua de ratos idosos. Além disso, há relatos da literatura de que as fibras musculares atrofiam com o envelhecimento, aumentando sua suscetibilidade a diversas patologias oportunistas, conforme o estudo de Mcardle, Vasilaki e Jackson (2002). Norton, Mejia e McCarter (2001) revelaram que o músculo masseter de ratos idosos apresentaram diminuição da força muscular, quando submetidos ao exame de fadiga.

Deste modo, alterações morfofuncionais nas fibras musculares esqueléticas, decorrentes do processo fisiológico do envelhecimento, estão intimamente associadas à redução da massa muscular, sobretudo ao comprometer a eficiência morfofuncional dos músculos esternomastóideo e cleidomastóideo.

Portanto, por não se conhecer as características morfológicas dos músculos esternomastóideo e cleidomastóideo de ratos adultos e possíveis alterações destes músculos em animais idosos, este estudo tem por finalidade descrever as características estruturais e ultra-estruturais dos músculos esternomastóideo e cleidomastóideo durante o envelhecimento, que podem estar associadas além da atrofia muscular a possível potencialização na presença de patologias, acarretando em comprometimento funcional nestes músculos como nos padrões multidirecionais dos movimentos das articulações crânio-vertebrais, déficit de equilíbrio, alterações na postura e no padrão respiratório relatado por Missaghi (2004).

Através das análises histológicas e morfométricas dos músculos esternomastóideo e cleidomastóideo de ratos Wistar adultos e idosos propomos:

- 1)- Analisar as características estruturais, empregando os métodos de microscopia de luz, com as colorações de Hematoxilina-eosina, Picro-sirius e reação histoquímica - NADH-tr;
- 2)- Analisar as características ultra-estruturais, empregando os métodos de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;
- 3)- Realizar análise morfométrica da área de secção transversa e densidade das fibras musculares.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Grupo Experimental

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, sendo 20 animais adultos com idade de 4 meses e 20 animais idosos com a idade de 24 meses, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais permaneceram alojados em gaiolas de contenção de polipropileno, agrupado em números de três, com água e ração *ad libitum*, mantidos em períodos claro/escuro de 12 horas, à temperatura média de 22 ± 2 °C. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - USP.

3.2 Microscopia de Luz

Para a microscopia de luz foram utilizados 20 animais: 10 adultos e 10 idosos, sendo 5 animais de cada faixa etária destinados aos diferentes métodos não histoquímicos e para o método de reação histoquímica - NADH-tr, respectivamente. Para a obtenção dos músculos esternomastóideo (EM) e cleidomastóideo (CM), os animais foram submetidos à anestesia com Hypnol 3% na proporção de 30mg/kg. Após a dissecação dos músculos, o ventre muscular foi fixado em nitrogênio líquido (-196 °C). Este procedimento consistiu inicialmente no posicionamento das peças musculares em superfície de cortiça e em seguida, à inclusão dos mesmos em cola biológica (KILLIK – EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) com envolvimento em talco neutro (Tragacanth – Sigma®, St Louis, Missouri, EUA) para se evitar possíveis artefatos de congelamento. As peças assim obtidas foram armazenadas em freezer - 80 °C (Thermo Forma: ULT Freezer) até o período do processamento deste material. Posteriormente, as peças foram fixadas no criostato (Leica CM 1850) com a câmara mantida à - 25 °C por 30 minutos para adaptação do tecido e submetido a cortes de 10 µm de espessura, obtidos segundo os critérios estereológicos estabelecidos por Howard e Reed (2005), os quais foram submetidos à reação histoquímica. Os cortes aleatórios foram coletados em lâminas histológicas e coradas pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (HE) (BEHMER et al., 1975) para evidenciar os núcleos e as

fibras musculares e Picro-sírius (JUNQUEIRA; BIGNOLS; BRENTANI, 1979; MONTES; JUNQUEIRA, 1991) para a identificação do tecido conjuntivo.

A caracterização dos diferentes tipos de fibras musculares, segundo parâmetros metabólicos e funcionais, foi realizada utilizando-se a reação histoquímica - 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 apresentarem 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 sequência de acetona (60%, 90% e 60%), álcool (70% ao absoluto) e diafanizadas em xilol, sendo em seguida montadas com Bálsamo do Canadá sintético (Synth® - Agro, São Paulo, SP, Brasil).

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura foram utilizados 10 animais: 5 adultos e 5 idosos, anestesiados com Hypnol à 3% (30 mg/kg), e perfundidos com a solução fixadora de Karnovsky modificada contendo glutaraldeído à 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio à 0,1M e pH= 7,4 injetando-se aproximadamente 40 ml de solução pelo ventrículo esquerdo do coração. Os músculos EM e CM foram dissecados e imersos na mesma solução durante 24 horas à 4 °C. Posteriormente, as peças foram lavadas em solução tampão fosfato de sódio à 0,1M e pH= 7,4. Em seguida, foi realizada a fratura das peças mediante ao congelamento em nitrogênio líquido, empregando o método descrito por Watanabe (1998), e imersão em solução aquosa de ácido tânico à 1% por uma hora à temperatura ambiente, de acordo com o trabalho relatado por Murakami (1973). Parte das amostras foram lavadas em solução tampão fosfato de

sódio e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio à 1%, durante 1 hora à 4 °C e lavadas em água destilada. Parte das amostras fixadas foram tratadas em solução aquosa de ácido clorídico (HCl-colagenase) 8N aquecidas à 60 °C por 1 hora e, posteriormente em colagenase (10mg/10ml) de solução tampão fosfato de sódio para remoção das fibras colágenas de acordo com os métodos relatados por Evan et al. (1976) e Watanabe, Ogawa e Yamada (1989), evidenciando as fibras musculares. Posteriormente, seguiu-se com a lavagem em água destilada por 12 horas e pós-fixação em solução aquosa de tetróxido de ósmio à 1% durante 2 horas à 4 °C, seguida de lavagem das peças em água destilada durante 5 horas e imersão em solução aquosa de ácido tânico à 1%, durante 1 hora à temperatura ambiente, conforme técnica descrita por Murakami (1973). Algumas peças foram fraturadas por congelamento em nitrogênio líquido e tratadas com a solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) à 10% para remoção dos componentes celulares de acordo com o método descrito por Ohtani (1987) e Watanabe et al. (1998). Posteriormente, seguiu com a lavagem das amostras e pós-fixação em solução aquosa de tetróxido de ósmio à 1% à 4 °C durante 2 horas e tratamento com a solução aquosa de ácido tânico à 1% durante 1 hora a temperatura ambiente (MURAKAMI, 1973). As amostras foram desidratadas em série crescente de alcoóis (70% ao absoluto), e a secagem das amostras em aparelho ponto crítico Balzers CPD-030, utilizando gás carbônico (CO₂) líquido. Estas amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas, cobertas com os íons de ouro em aparelho Balzers Union SCD-040, e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Jeol, JSM-6100.

3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados 10 animais: 5 adultos e 5 idosos, anestesiados com Hypnol à 3% (30 mg/kg), perfundidos com a solução fixadora de Karnovsky modificada contendo glutaraldeído à 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio à 0,1M e pH= 7,3, injetando-se aproximadamente 40 ml de solução pelo ventrículo esquerdo do coração. Os músculos EM e CM foram dissecados e fixados na mesma solução durante 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a lavagem com a solução de tampão fosfato de sódio e pós-fixados com a solução de tetróxido de ósmio à 1% durante 2 horas à 4 °C. Novamente, as peças foram lavadas em água

destilada e imersas em solução aquosa de acetato de uranila à 5% durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram submetidas à desidratação em série crescente de álcoois, a partir do 70% até o álcool absoluto com banhos de 15 minutos cada, e 2 banhos de óxido de propileno por 15 minutos para a infiltração da resina (resina Spurr 1:1 óxido de propileno por 4 horas) em misturador rotatório. Após esta etapa, a resina foi retirada e colocada resina pura durante 6 horas. Na etapa final, a resina pura foi substituída por uma nova resina; colocada na estufa à 37 °C com o frasco aberto por 1 hora, sendo realizada a inclusão do material em moldes de borracha e polimerização na estufa à 60°C durante 5 dias. Obtidos os blocos de resina, procedeu-se a trimagem para a obtenção dos cortes semi-finos (0,5 a 1 micrometro) e corados com a solução de azul de toluidina para a verificação da área em microscópio de luz. Posteriormente, foram obtidos cortes ultrafinos de 90 nanômetros, coletados em telas de cobre de 200 "mesh" (Sigma) e contrastados com a solução de acetato de uranila à 4% por 3 minutos (WATSON, 1958; WATANABE; YAMADA, 1983) e com a solução aquosa de citrato de chumbo à 0,4% por 3 minutos, lavando em seguida com água destilada (REYNOLDS, 1963; WATANABE; YAMADA, 1983). As telas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 regulado para 80 kV.

3.5 Análise Morfométrica

Para a densidade de fibras e a área de secção transversa dos tipos de fibras O, GO e G dos músculos EM e CM adulto e idoso, utilizaram-se as secções coradas pelo método histoquímico da NADH-tr. Os cortes foram inicialmente divididos em duas regiões: superficial e profunda. Desta forma, foram escolhidos seis campos em cada seção, selecionados com base na tabela de números randômicos (vide Anexo), sendo dois para cada uma das regiões. A aquisição das imagens foi realizada através de uma lupa estereoscópica¹, com uma câmera fotográfica digital acoplada². O processamento das imagens foi realizado em equipamento de imagem computadorizado³. A área de secção transversa foi obtida em μm^2 , circundando-se os cortes com o cursor do mouse.

¹ Carl Zeiss Microimaging, modelo Stemi® SV6 – LAFACC – ICB/USP

² Power shot A640, Canon, China – LAFACC – ICB/USP

³ Axiovision Rel. 4.6, Göttingen, Alemanha – LAFACC – ICB/USP

Para a quantificação dos tipos de fibras musculares, foi utilizado o sistema de imagem computadorizada⁴ com objetiva de 20X de aumento, com 100 fibras de cada tipo. Para esta quantificação foi utilizado um sistema teste (vide Anexo) formado por 4 quadrados constituídos de linhas de exclusão (contínuas) e linha de inclusão (pontilhadas) de 0,04746 mm² (HOWARD; REED, 2005).

3.6 Análise Estatística

Os valores da AST e densidade dos tipos de fibras dos músculos EM e CM de animais adultos e idosos foram analisados através da estatística descritiva utilizando medidas de dispersão e medidas de tendência central. Empregou-se ANOVA com dois fatores: Grupo (Adulto e Idoso) e Região: (Superficial e Profunda), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

⁴ Carl Zeiss Microimaging, modelo Axioskop 40 e câmera AxioCam ligados ao software Axiovision Rel. 4.6, Göttingen, Alemanha – LAFACC – ICB/USP.

4.1 Análise Qualitativa

Os resultados microscópicos dos músculos EM e CM serão apresentados na seguinte ordem: microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

4.1.1 Microscopia de Luz

A estrutura dos músculos EM e CM de animais adultos e idosos foi avaliada através de técnicas rotineiras de histologia (HE e Picro-sírius), bem como histoquímica para a NADH-tr.

- **Animais Adultos**

- **Músculo Esternomastóideo**

Os cortes histológicos transversais do músculo EM de ratos adultos revelaram o arranjo das fibras musculares organizadas em fascículos, destacando a presença de fusos neuro-musculares (Figura 1) e a disposição das fibras do tecido conjuntivo envolvendo os fascículos musculares (Figura 2).

- **Músculo Cleidomastóideo**

Notou-se a disposição transversal das fibras do músculo CM de ratos adultos, evidenciando o aspecto geral deste músculo, destacando as variações nos diâmetros das fibras musculares (Figura 3). Em maior aumento, observa-se o tecido conjuntivo que envolve cada fibra muscular (Figura 4).

Figura 1 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM adulto. Revela o arranjo estrutural das fibras musculares em fascículos (setas) e fusos neuro-musculares. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μm .

Figura 2 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM adulto. Nota-se em linhas vermelhas o tecido conjunto que envolve as fibras e fascículos musculares (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 μm .

Figura 3 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM adulto. Revela o aspecto geral das fibras musculares com diâmetros variados. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μ m.

Figura 4 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM adulto. Observa-se as fibras musculares envoltas pelo tecido conjuntivo do perímísio (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 μ m.

Animais Idosos

- **Músculo Esternomastóideo**

Os cortes histológicos transversais do músculo EM de ratos idosos revelaram a presença de vários fusos neuro-musculares com diâmetros variados entre os fascículos musculares, organizados entre espessas áreas de tecido conjuntivo (Figura 5). Na figura 6 foi possível evidenciar o tecido conjuntivo que envolve as fibras musculares.

- **Músculo Cleidomastóideo**

Os cortes transversais do músculo CM de ratos idosos evidenciaram alterações morfológicas no fuso neuro-muscular e vasos sanguíneos na disposição longitudinal e transversal entre os fascículos musculares (Figura 7). Na figura 8 foi possível evidenciar a organização das fibras musculares transversalmente, destacando área espessa de tecido conjuntivo.

Figura 5 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM idoso. Observa-se a presença de fusos neuro-musculares (setas) e espessa área de tecido conjuntivo (*) entre os fascículos musculares. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μ m.

Figura 6 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM idoso. Observa-se a disposição das fibras musculares envolvidas por tecido conjuntivo corado intensamente em vermelho (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 μ m.

Figura 7 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM idoso. Observa-se alteração morfológica do fuso neuro-muscular (seta) e vasos sanguíneos (*) entre os fascículos musculares. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μ m.

Figura 8 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo CM idoso. Evidencia as fibras musculares e o tecido conjuntivo do endomísio e perimísio (setas). Coloração: Picro-sírius. Barra: 200 μ m.

Com o método histoquímico para a reação de NADH-tr foi possível evidenciar a intensidade que a reação reflete a capacidade oxidativa no metabolismo da célula muscular, permitindo a distinção das fibras nos tipos I, IIA e IIB ou Oxidativa (O), Glicolítica-oxidativa (GO) e Glicolítica (G), respectivamente. Como as fibras do tipo I têm intensa atividade oxidativa, estas aparecem escurecidas; entretanto, as fibras do tipo IIB, que dependem mais da glicólise anaeróbia, revelam-se 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. Em ambos os músculos EM e CM de animais adultos e idosos observou-se duas regiões equidistante: superficial e profunda com presença e proporção distinta dos três tipos de fibras entre as regiões. Nas regiões superficiais destacou-se maior incidência de fibras G e nas regiões profundas, maior incidência de fibras O.

A figura 9 representativa, ilustra as diferentes tonalidades nas colorações das fibras musculares G, GO e O, decorrentes da reatividade à NADH-tr.

Figura 9 - Microscopia de luz. Corte histológico transversal do músculo EM adulto, região superficial. Evidencia-se a diferenciação dos tipos de fibras musculares: Glicolítica (G), Glicolítica-oxidativa (GO) e Oxidativa (O). Reação-NADH-th. Barra 100 µm.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Animais Adultos

Músculo Esternomastóideo

As amostras examinadas ao microscópio eletrônico de varredura possibilitaram verificar e distinguir o endomísio. Observa-se o perimísio envolvendo um conjunto de fibras formando os feixes musculares e o epimísio envolvendo a estrutura muscular perifericamente (Figura 10).

Em maior aumento, observa-se a amostra muscular fraturada transversalmente revelando as fibras musculares e o tecido colágeno entre os feixes e fibras musculares (Figura 11). A figura 12 revela fibras musculares fraturadas longitudinalmente, destacando as estriações transversais, características típicas presentes nas fibras musculares esqueléticas. Destaca-se a distribuição do pedículo neuro-vascular na superfície das fibras musculares e a disposição dos vasos sanguíneos paralelos às fibras musculares.

Nas amostras fraturadas em nitrogênio líquido e tratadas com a solução aquosa de NaOH, as células musculares foram removidas, revelando o arcabouço ultra-estrutural constituído por tecido conjuntivo, em destaque o endomísio e o perimísio (Figura 13).

Em maior aumento, observa-se a disposição das fibras colágenas formando bainhas que constituem o endomísio e a organização das lamelas concêntricas que constituem o perimísio (Figura 14).

As amostras tratadas com HCl-colagenase revelaram, em disposição longitudinal, as fibras musculares após remoção total do tecido conjuntivo (Figura 15).

Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Revela a disposição transversal das fibras musculares e seus envoltórios: endomísio (seta), perimísio (P) e epimísio (E). Barra: 100 μ m.

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Observa-se os feixes musculares (*) e presença de tecido conjuntivo entre as fibras e feixes musculares (setas). Barra: 100 μ m.

Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto pós-fixada em tetróxido de ósmio revela as estriações transversais das fibras musculares (setas pretas) e pedículo neuro-vascular (seta branca). Barra: 100 μ m.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto tratada com solução de NaOH, evidencia o endomísio (cabeça de setas) e o perimísio (setas). Barra: 100 μ m.

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto tratada com solução de NaOH, evidenciando o endomísio (setas) e feixes de fibras colágenas do perimísio (*). Barra: 10 μ m.

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM adulto tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral do feixe de fibras musculares. Barra: 100 μ m.

- **Músculo Cleidomastóideo**

Mediante a técnica de congelamento em nitrogênio líquido seguido de fratura, possibilitou verificar a disposição transversal dos feixes de fibras musculares, em vários níveis de profundidade do ventre muscular e a presença de tecido conjuntivo entre os feixes musculares (Figura 16). Em maior aumento, observou-se a disposição longitudinal das fibras musculares após fratura (Figura 17).

Nas amostras fraturadas em nitrogênio líquido e tratadas com a solução aquosa de NaOH à 10%, as células foram removidas, evidenciando o arcabouço ultra-estrutural, constituído por tecido conjuntivo, destacando-se o endomísio e a camada densa de fibras colágenas adjacentes em disposição longitudinal (Figura 18). Em maior aumento, nota-se o envoltório da fibra muscular denominado de endomísio, constituído por bainhas cilíndricas de tecido conjuntivo formando suas paredes delgadas (Figura 19).

As amostras tratadas com a solução de HCl-colagenase apresentaram a disposição longitudinal à extremidade distal do feixe muscular (Figura 20).

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Observa-se em disposição transversal os feixes musculares (seta) e tecido conjuntivo entre as fibras (*). Barra: 100 μ m.

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto fraturada em nitrogênio líquido. Observa-se a superfície de fratura das fibras musculares (setas). Barra: 100 μ m.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto tratada com solução de NaOH, evidenciando o endomísio (setas) e o perimísio (*). Barra: 100 μ m.

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto tratada com solução de NaOH, revelando as paredes delgadas do endomísio (setas). Barra: 10 μ m.

Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM adulto tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral do feixe muscular de diferentes diâmetros. Barra: 100 μm .

Animais Idosos

- **Músculo Esternomastóideo**

As amostras obtidas mediante a técnica de congelamento em nitrogênio líquido seguido de fratura possibilitou observar a distribuição das fibras colágenas em forma de rede entre os feixes musculares dispostos na transversal (Figura 21) e longitudinal (Figura 22).

Nas amostras fraturadas em nitrogênio líquido e tratadas com a solução aquosa de NaOH à 10%, as células musculares foram removidas, evidenciando a disposição do tecido conjuntivo em aspecto semelhante ao “favo de mel” (Figura 23). Em maior aumento, observa-se claramente a rede de fibras colágenas que constituem o endomísio, destacando sua parede com nítida camada espessa (Figura 24).

As amostras tratadas com a solução de HCl-colagenase, revelaram o aspecto geral das fibras musculares, apresentando-se paralelas e longitudinalmente ao seu eixo (Figura 25).

Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Revela, transversalmente, a presença de tecido conjuntivo (setas) entre os feixes musculares (*). Barra: 100 μ m.

Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Revela em disposição longitudinal das fibras musculares (setas), o tecido conjuntivo interposto (*). Barra: 100 μ m.

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso tratada com solução de NaOH. Revela o endomísio (setas) em forma de “favo de mel”, em aspectos tridimensionais. Barra: 100 μ m.

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso tratada com solução de NaOH. Revela a espessa parede interna do endomísio (setas). Barra: 10 μ m.

Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do EM idoso tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral das fibras musculares. Barra: 100 μ m.

- **Músculo Cleidomastóideo**

As amostras musculares obtidas mediante a técnica de congelamento em nitrogênio líquido seguido de fratura oblíqua possibilitou observar o conjunto de feixes formando uma camada espessa de fibras colágenas adjacentes às fibras musculares (Figura 26). Em maior aumento, após fratura longitudinal, observaram-se fibras musculares organizadas paralelamente, destacando os fragmentos das lâminas concêntricas que formam as paredes do endomísio, revelando as estriações transversais (Figura 27). A figura 28 revelou o trajeto sinuoso dos capilares na superfície das fibras musculares.

Nas peças fraturadas em nitrogênio líquido e tratadas com a solução aquosa de hidróxido de sódio houve a remoção das células musculares evidenciando o tecido conjuntivo “in situ” (Figura 29). Em maior aumento, foi possível identificar diâmetros e espessuras variadas das paredes que constituem o endomísio (Figura 30).

Quando as peças foram tratadas a solução de HCl-colagenase, revelaram nitidamente as fibras musculares mostrando a extremidade e sua superfície (Figura 31).

Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Mostra espessa camada de fibras colágenas (seta) entre os feixes de fibras musculares (*). Barra: 100 μm .

Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso fraturada em nitrogênio líquido. Revela a disposição longitudinal das fibras musculares evidenciando as estriações transversais (*), membrana sarcoplasmática e feixes de fibras colágenas (setas). Barra: 10 μm .

Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso pós-fixada em tetróxido de ósmio revelando o trajeto sinuoso dos capilares (setas) na superfície das fibras musculares. Barra: 10 μ m.

Figura 29- Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso tratada com solução de NaOH evidenciando o endomísio (setas) e espessa área de tecido conjuntivo (*). Barra: 100 μ m.

Figura 30 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso tratada com solução de NaOH evidenciando diâmetros variados de fibras musculares e espessamento das paredes do endomísio em aspectos tridimensionais (setas). Barra: 100 μm .

Figura-31 - Microscopia eletrônica de varredura. Amostra muscular do CM idoso tratada em solução de HCl-colagenase revelando o aspecto geral das fibras musculares. Barra: 100 μm .

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Animais Adultos

- **Músculo Esternomastóideo**

As observações da camada muscular ao microscópio eletrônico de transmissão possibilitaram a identificação de vários feixes de miofibrilas. As fibras apresentaram diâmetros variados entremeados por um capilar sanguíneo (Figura 32). Na porção periférica do sarcoplasma da célula muscular observou-se a presença de mitocôndrias circulares (Figura 33).

Foi possível visualizar mitocôndrias com formatos variados próximo a lâmina sarcoplasmática, revelando suas cristas com dupla membrana entre os feixes de miofibrilas. Os feixes musculares estão dispostos transversalmente, envoltos por tecido conjuntivo denominado de endomísio. Na região do interstício observa-se a disposição transversal e longitudinal das fibras colágenas (Figura 34).

A disposição longitudinal da fibra muscular possibilitou visualizar a unidade estrutural do músculo estriado esquelético, o sarcômero, que se estende de uma linha Z a outra linha Z, localizadas como uma área densa na banda I. Nota-se também a banda A intercalada pela linha H. Geralmente os feixes de miofibrilas são entremeados por mitocôndrias (Figura 35). Na porção periférica do sarcoplasma observa-se um acúmulo de mitocôndrias com diferentes diâmetros revelando suas cristas com dupla membrana. (Figura 36).

Entre as fibras musculares observou-se a presença de capilar sanguíneo, mostrando as delimitações das células endoteliais através das junções intercelulares. Nas extremidades destas junções, notou-se a presença de projeções citoplasmáticas para o lúmen capilar denominadas de pseudópodos endoteliais. A lâmina citoplasmática da célula endotelial mostra a presença de cavéolas e vesículas pinocíticas (Figura 37).

No fuso neuro-muscular foram observadas as disposições das lâminas que constituem o epineuro com seu respectivo núcleo, delimitando as fibras nervosas mielínicas e amielínicas. No envoltório, denominado de endoneuro, das fibras nervosas, observam-se células de Schwann e no interior do axoplasma notou-se a presença de pequenas mitocôndrias e neurofilamentos (Figura 38).

Próximo a região do sarcoplasma observou-se a disposição longitudinal dos feixes de miofibrilas e perifericamente, a presença de parte do núcleo celular. Foi

possível a visualização de feixes de miofilamentos e agrupamento de mitocôndrias na porção sarcoplasmática. Notou-se ainda, a região da junção neuro-muscular destacando o botão terminal da placa motora evidenciando regiões com fissuras pós-sinápticas (fendas sinápticas primárias), dobras juncionais (fenda sináptica secundária) e grânulos de glicogênios (Figura 39).

Figura 32 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Observa-se duas células musculares (*) com mitocôndrias na periferia do sarcoplasma, entremeadas por um capilar sanguíneo (seta). Barra: 1 µm.

Figura 33 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Evidencia-se mitocôndrias circulares (seta) na porção periférica do sarcoplasma da célula muscular e disposição transversal dos feixes de miofilamentos (*). Barra: 500 nm.

Figura 34 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Notam-se mitocôndrias alongadas e circulares próximo à membrana sarcoplasmática (cabeça de setas) e fibras colágenas (setas) no interstício dispostas transversalmente e longitudinalmente. Barra: 200 nm.

Figura 35 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Observa-se o sarcômero: banda A, I, linhas Z (seta), zona H, disposição longitudinal das cisternas do retículo sarcoplasmático (*). Barra: 200 nm.

Figura 36 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Evidencia-se a disposição longitudinal de feixes de miofilamentos e mitocôndrias, evidenciando suas cristas de dupla membrana (seta). Barra: 200 nm.

Figura 37 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Observa-se o capilar sanguíneo destacando as células endoteliais com inúmeras cavéolas e vesículas pinocíticas, a junção endotelial (cabeça de seta) e os pseudópodos endoteliais (setas) Barra: 200 nm.

Figura 38- Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Nota-se no fuso neuro-muscular: o epineuro e seu respectivo núcleo, axônios mielínicos (setas), amielínicos e células de Schwann. No axoplasma observa-se a presença de mitocôndrias e neurofilamentos. Barra: 2 μ m.

Figura 39 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM adulto. Nota-se na porção periférica do sarcoplasma, o botão terminal da placa motora revelando as fissuras pós-sinápticas (cabeças das setas), dobras juncionais (setas) e grupamento de mitocôndrias (M) Barra: 500 nm.

- **Músculo Cleidomastóideo**

As observações ultra-estruturais examinadas com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão possibilitaram a identificação de várias células musculares com seus núcleos alongados, localizados na porção periférica do sarcoplasma, entremeados por um capilar sanguíneo e seu respectivo núcleo (Figura 40).

Foi examinada a disposição transversal (Figura 41) e longitudinal (Figura 42) dos feixes de miofibrilas com o mionúcleo adjacente ao sarcoplasma e no interstício, a presença de um capilar com seu núcleo. Na figura 43, pôde-se identificar o mionúcleo entre os feixes de miofibrilas dispostas transversalmente, próximo à lâmina sarcoplasmática.

Na disposição longitudinal das fibras musculares é possível identificar grupamentos de mitocôndrias entre os feixes de miofibrilas formando colunas espessas (Figura 44). Em maior aumento, observa-se o grupamento de mitocôndria entre o núcleo muscular e a célula satélite (Figura 45).

No capilar sanguíneo foi possível identificar as células endoteliais, projeções citoplasmáticas para o lúmen vascular e a proporção desigual do núcleo endotelial com o capilar (Figura 46). A lâmina citoplasmática da célula endotelial com predomínio de vesículas pinocíticas foi notada com detalhes (Figura 47).

Figura 40 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observam-se células musculares com seus núcleos periféricos alongados (setas) adjacentes à membrana sarcoplasmática entremeados por um capilar sanguíneo (*) e seu respectivo núcleo (N). Barra: 1 µm.

Figura 41 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se, no interstício, o capilar com seu núcleo (N) e a disposição transversal dos feixes de miofibrilas com o núcleo muscular na porção periférica da membrana sarcoplasmática (seta). Barra: 1 µm.

Figura 42 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se a disposição paralela das fibras musculares e, no interstício, a presença de um capilar (C) com seu núcleo (N). Barra: 500 nm.

Figura 43 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se os feixes de miofibrilas (setas) e o mionúcleo (N) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 500 nm.

Figura 44 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se o agrupamento de mitocôndrias (setas) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 500 nm.

Figura 45 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Nota-se em maior aumento, o agrupamento de mitocôndrias (M) na região central próximo à membrana sarcoplasmática entre o núcleo da célula muscular (*) e o núcleo da célula satélite (seta). Barra: 200 nm.

Figura 46 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Observa-se parte das células musculares entremeadas por um capilar sanguíneo. Evidenciando claramente o núcleo (N) e as junções endoteliais (setas). Barra: 200 nm.

Figura 47 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM adulto. Revela, em maior aumento, as vesículas pinocíticas (setas) e cavéolas (cabeça de setas) das lâminas citoplasmáticas da célula endotelial. Barra: 200 nm.

Animais Idosos

- **Músculo Esternomastóideo**

O músculo EM examinado ao microscópio eletrônico de transmissão revelou a organização dos sarcômeros em séries, grupamentos de mitocôndrias formando colunas espessas adjacentes à membrana sarcoplasmática e um capilar sanguíneo com uma hemácia no seu interior (Figura 48).

A figura 49 revelou características de atrofia muscular presente neste músculo, caracterizado pela inconsistência topográfica dos feixes de miofibrilas, diâmetros e formatos variados das mitocôndrias na porção periférica da célula muscular.

A distribuição dos feixes de miofibrilas, transversalmente, revelou-se adjacente ao sarcoplasma na presença de grupamento de mitocôndrias (Figura 50).

Observou-se, no capilar sanguíneo, a lâmina basal da célula endotelial com presença de vesículas pinocíticas, ausência de formação de pseudópodos endoteliais (Figura 51) e parte celular do pericito adjacente ao capilar (Figura 52).

Figura 48 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Observa-se os sarcômeros em série, presença de grupamentos de mitocôndrias (setas) e, no interstício, a presença de uma hemácia no interior do capilar (*). Barra: 1 μ m.

Figura 49 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Presença de mitocôndrias com formatos ovóides e alongadas (setas) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 500 nm.

Figura 50 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Observa-se os feixes de miofibrilas e grupamento de mitocôndrias (seta) próximo à membrana sarcoplasmática. Barra: 200 nm.

Figura 51 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Revela a lâmina basal da célula endotelial e a presença de cavéolas (seta), vesículas pinocíticas nas células endoteliais e parte celular do pericito (*) Barra: 200 nm.

Figura 52 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo EM idoso. Observa-se o capilar sanguíneo com ausência de pseudópodos endoteliais (setas menores), presença de vesículas pinocíticas nas células endoteliais e mitocôndrias na parte citoplasmática do pericito (seta maior). Barra: 200 nm.

- **Músculo Cleidomastóideo**

A ultra-estrutura do músculo CM revelou a disposição paralela das fibras musculares, com amplo espaçamento entre as fibras (53).

Entre os feixes de miofibrilas e a lâmina sarcoplasmática foi possível identificar um espaço no citoplasma celular com escassez e diminuição do diâmetro das mitocôndrias (Figura 54).

As figuras 55 e 56 revelaram grupamentos de mitocôndrias na porção periférica do sarcoplasma com tamanhos e formatos diferentes. Interpostas aos feixes de miofibrilas destacam-se as cisternas do retículo sarcoplasmático.

No capilar sanguíneo notou-se alteração morfológica das células endoteliais, com presença de vesículas pinocíticas e ausência de pseudópodos endoteliais (Figura 57).

Figura 53 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Observa-se a disposição longitudinal dos feixes de miofibrilas com amplo espaçamento (setas). Barra: 1 μ m.

Figura 54 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Observa-se em maior aumento, a disposição paralela de feixes de miofibrilas, escassez de mitocôndrias (setas) na região subsarcolemal e a estrutura multivesicular (*). Barra: 200 nm.

Figura 55 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Nota-se grupamento de mitocôndrias (seta) adjacente à membrana sarcoplasmática e feixes de miofibrilas (*). Barra: 200 nm.

Figura 56 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Revela grupamento de mitocôndrias (*), interposto aos feixes de miofibrilas, evidenciando as cisternas do retículo sarcoplasmático (setas). Barra: 200 nm.

Figura 57 - Microscopia eletrônica de transmissão. Músculo CM idoso. Observa-se o citoplasma da célula endotelial, vesículas pinocíticas (seta) na parede interna do capilar e ausência de pseudópodos endoteliais. Barra: 200 nm.

4.2 Análise Quantitativa

4.2.1 Área de Secção Transversa dos Tipos de Fibras do Músculo EM

Os resultados a seguir foram expressos em tabela e figura demonstrativa do gráfico com os valores referentes à AST em μm^2 , dos tipos de fibras: G, GO e O da região superficial e profunda dos músculos EM adulto e idoso (Tabela 1 e Figura 58).

Observou-se diferença significativa ($p < 0,001$) nos valores das AST dos três tipos de fibras do músculo EM quando comparados entre animais adultos e idosos e entre as regiões superficial e profunda. Apresentando aumento nas AST em ambos os tipos de fibras musculares dos animais idosos nas regiões analisadas. Na região superficial, as fibras O, G e GO apresentaram aumento da AST de 83%, 130% e 128% respectivamente. Na região profunda, as fibras O, G e GO apresentaram aumento da AST de 74%, 117% e 142% respectivamente.

Tabela 1 – Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.

AST	ADULTO		IDOSO	
	Superficial	Profunda	Superficial	Profunda
O	1052,46±97,14	1031,95±72,18	1926,66±106,20	1793,01±49,91
G	3103,39±261,70	2753,24±320,23	7148,74±672,09	5966,73±411,78
GO	1682,15±194,16	1487,69±84,17	3830,72±215,70	3597,43±198,93

Figura 58 – Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.
O, G e GO: Idoso $\neq$ Adulto e Superficial $\neq$ Profundo, $p < 0,01$.

4.2.2 Área de Secção Transversa dos Tipos de Fibras do Músculo CM

Os resultados a seguir foram expressos em tabela e figura demonstrativa do gráfico com os valores referentes à AST, em μm^2 dos tipos de fibras: G, GO e O da região superficial e profunda dos músculos CM de ratos adultos e idosos (Tabela 2 e Figura 59). Observou-se diferença significativa ($p < 0,001$) nos valores das AST dos três tipos de fibras do músculo CM quando comparados entre os animais adultos e idosos. Ao comparar as regiões superficial e profunda observou-se diferença significativa com $p = 0,029$ na AST das fibra musculares G, no entanto, a AST das fibras O e GO não apresentaram diferença significativa com $p = 0,130$ e $p = 0,440$ respectivamente. Os resultados demonstram aumento nas AST das fibras G, O e GO do músculo CM de animais idosos nas regiões superficial e profunda. Na região superficial, as fibras O, G e GO apresentaram aumento da AST de 74%, 51% e 66% respectivamente. Na região profunda, as fibras O, G e GO apresentaram aumento da AST de 79%, 44% e 52% respectivamente.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.

AST	ADULTO		IDOSO	
	Superficial	Profunda	Superficial	Profunda
O	1209,16±118,29	1124,28±48,34	2097,89±110,29	2013,34±166,50
G	4563,01±466,11	4257,37±734,63	6882,17±360,48	6145,30±237,49
I	2389,63±156,45	2445,44±275,43	3960,85±349,96	3723,28±201,72

Figura 59 – Média e desvio padrão da área de secção transversa (AST), em μm^2 dos tipos de fibras do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.
 O e GO: Idoso $\neq$ Adulto nas regiões Superficial e Profunda, $p<0,01$; Entre regiões Superficial e Profunda no Adulto e Idoso, $p=0,130$ e $p=0,440$, respectivamente.
 G: Idoso $\neq$ Adulto nas regiões Superficial e Profunda, $p<0,01$; Superficial $\neq$ Profunda nos Adultos e Idosos, $p=0,029$

4.2.3 Densidade dos Tipos de Fibras do Músculo EM

Os resultados a seguir foram expressos em tabela e figura demonstrativa do gráfico com os valores referentes à porcentagem dos tipos de fibras (Tabela 3), densidade de fibras em mm² dos tipos: G, GO e O da região superficial e profunda do músculo EM adulto e idoso (Tabela 4 e Figura 60). Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores da densidade de fibras G ao comparar as regiões superficial e profunda nos animais adultos e idosos e entre animais adultos e idosos na região superficial (Tabela 4 e Figura 60). As fibras G do músculo EM representam 76,2% e 77,2% da região superficial dos animais adultos e idosos respectivamente (Tabela 3). Notou-se nos animais idosos diminuição de 48% e 33% da densidade de fibras G nas regiões superficial e profunda respectivamente.

Observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) nos valores da densidade de fibras O do músculo EM ao comparar as regiões superficial e profunda nos animais adultos e idosos (Tabela 4 e Figura 60). As Fibras O representam 66,9% e 81,1% da região profunda do músculo EM nos animais adultos e idosos respectivamente (Tabela 3). Os animais idosos apresentaram aumento de 165% na densidade de fibras O na região superficial e diminuição de 3% na camada profunda.

Em relação à densidade de fibras GO, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar as regiões superficial e profunda dos animais adultos e idosos e entre os respectivos animais nas regiões superficial e profunda (Tabela 4 e Figura 60). Representam no músculo EM adulto 22% e 31,1% dos tipos de fibras, presentes nas regiões superficial e profunda respectivamente e nos idosos 13,4% na região superficial e 17,4% na região profunda (Tabela 3). Os animais idosos apresentaram diminuição da densidade de fibras GO de 69% na região superficial e 54% na região profunda.

Tabela 3 - Média e desvio padrão da porcentagem (%) dos tipos de fibras do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.

	ADULTO		IDOSO	
	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo
O	1,8±1,1	66,9±6,5	9,4±9,0	81,1±2,8
G	76,2±2,8	2,0±2,9	77,2±5,0	1,5±1,0
GO	22,0±1,7	31,1±4,1	13,4±5,3	17,4±1,8
Total	100%	100%	100%	100%

Tabela 4 - Média e desvio padrão da densidade (Nº/mm²) dos tipos de fibras (DF) do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.

DF	ADULTO		IDOSO	
	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo
O	8,26±5,24	291,10±56,53	21,91±21,59	281,66±18,50
G	349,59±27,95	7,58±10,89	181,03±18,85	5,06±3,47
GO	100,97±11,04	133,16±9,02	31,52±13,49	60,17±4,97
Total	458,81±31,60	431,84±43,40	234,46±17,58	346,89±11,46

Figura 60 - Média e desvio padrão da densidade (Nº/mm²) dos tipos de fibras (DF) do músculo EM adulto e idoso na região superficial e profunda.

O: Superficial ≠ Profunda nos adultos e idosos, $p < 0,01$

G: Superficial ≠ Profunda, Adulto ≠ Idoso na região profunda, $p < 0,05$.

GO: Superficial ≠ Profunda no adulto e idoso; Adulto ≠ Idoso na região superficial e profunda, $p < 0,001$.

4.2.4 Densidade dos Tipos de Fibras do Músculo CM

Os resultados a seguir foram expressos em tabela e figura demonstrativa do gráfico com os valores referentes à porcentagem dos tipos de fibras (Tabela 5), densidade de fibras em mm^2 dos tipos: G, GO e O na região superficial e profunda dos músculos CM de ratos adultos e idosos (Tabela 6 e Figura 61). Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na densidade de fibras G ao comparar as regiões superficial e profunda nos animais adultos e idosos, e na região superficial em comparação entre animais adultos e idosos. No entanto, ao comparar na região profunda entre animais adultos e idosos não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 6 e Figura 61). Em decorrência da ausência de fibras G nesta região, ao revelar maior incidência na região superficial. As Fibras G representam 69,7% e 74,1% da região superficial do músculo CM dos animais adultos e idosos respectivamente (Tabela 5). Os animais idosos apresentaram diminuição de 28% da densidade de fibras G na região superficial.

Em relação à densidade de fibras O observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar os animais adultos e idosos nas regiões superficial e profunda e as respectivas regiões nos animais adultos e idosos (Tabela 6 e Figura 61). As fibras O representam 82,3% e 79,4% da região profunda do músculo CM nos animais adultos e idosos respectivamente (Tabela 5). Nos animais idosos apresentaram diminuição de 56% e 45% da densidade de fibras O na região superficial e profunda respectivamente.

Verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na densidade de fibras GO ao comparar as regiões superficial e profunda dos animais adultos e idosos, e os respectivos animais nas regiões superficial e profunda (Tabela 6 e Figura 61), com diminuição de 69% da densidade de fibras GO na região superficial e 54% na região profunda. As fibras GO representam 17,5% na região superficial 17,7% na região profunda do músculo CM dos animais adultos e 17,7% na região superficial 20,4% na região profunda dos animais idosos (Tabela 5).

Tabela 5 - Média e desvio padrão da porcentagem (%) dos tipos de fibras, do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.

	ADULTO		IDOSO	
	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo
O	12,8±2,6	82,3±1,7	8,3±2,4	79,4±0,5
G	69,7±2,5	0,0±0,0	74,1±1,9	0,2±0,1
GO	17,5±1,7	17,7±1,7	17,7±1,9	20,4±0,6
Total	100%	100%	100%	100%

Tabela 6 - Média e desvio padrão da densidade (Nº/mm²) dos tipos de fibras (DF) do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.

DF	ADULTO		IDOSO	
	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo
O	41,30±11,59	447,35±21,79	18,04±5,64	246,43±2,28
G	222,66±12,31	0±0	161,14±9,73	0,67±0,38
GO	55,79±5,76	96,08±6,66	38,26±3,02	63,21±2,38
Total	319,75±24,33	543,42±15,49	217,44±9,74	310,31±4,02

Figura 61 - Média e desvio padrão da densidade (Nº/mm²) dos tipos de fibras (DF) do músculo CM adulto e idoso na região superficial e profunda.

O e GO: Adulto≠Idoso na região superficial e profunda; Superficial≠Profunda no adulto e idoso, p<0,05.

G: Adulto≠Idoso na região superficial; Superficial≠Profunda no Adulto e Idoso, p<0,05.

Os resultados do presente trabalho revelaram as características estruturais e ultra-estruturais dos músculos esternomastóideo (EM) e cleidomastóideo (CM) de ratos adultos mediante as observações com os métodos de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Evidenciou-se claramente o formato hexagonal da fibra muscular com múltiplos núcleos dispostos periféricamente e entre os fascículos musculares a presença de vasos sanguíneos e fusos neuro-musculares. As amostras examinadas ao microscópio eletrônico de varredura, após a aplicação do método de criofratura, possibilitaram evidenciar no seu eixo transversal, diâmetros variados das fibras musculares, com presença de tecido conjuntivo em forma de rede entre os feixes musculares, em aspectos tridimensionais. Na disposição longitudinal, as fibras estavam organizadas paralelamente, possibilitando a identificação das estriações transversais que correspondem a múltiplas unidades estruturais, os sarcômeros, aspectos estes que estão de acordo com os relatos de Tajsharghi (2008).

As amostras tratadas com HCl-colagenase possibilitaram visualizar as características estruturais de ambos os músculos EM e CM, após a remoção de estruturas da matriz extra-celular. Além destas características típicas dos músculos esqueléticos, a unidade funcional, que consiste predominantemente por elementos contrácteis, apresentou íntima associação com os componentes da matriz extra-celular, semelhante às estruturas identificadas por Cohn e Campbell (2000). Além disso, conforme foi descrito por Järvinen et al. (2002) a fibra muscular, individual e em conjunto com outras fibras, formam feixes que se apresentam organizados por envoltórios constituídos por tecido conjuntivo, dispostos em três distintos níveis ao longo do tecido muscular: epimísio envolve externamente o músculo; perimísio apresenta ligação de feixes musculares formando fascículos e o endomísio envolve a fibra muscular individualmente. Em nossos resultados, estas estruturas foram observadas nitidamente pelo método de Picro-sírius, ao evidenciar os três níveis dos envoltórios. Essas características corroboram com dados de Junqueira et al. (1979) e Feitosa, Vidal e Pimentel (2002) que demonstraram o predomínio de fibras colágenas tipo I no tecido muscular. Neste sentido Kurose et al. (2006), frisam o predomínio de fibras colágenas tipo I no tecido tendíneo.

Nas amostras, dos músculos EM e CM tratadas com solução de NaOH, as organelas celulares foram removidas evidenciando o arcabouço estrutural representado pelo tecido conjuntivo, em localização “in situ”. Nos músculos EM e

CM adulto, as paredes do endomísio apresentaram-se constituídas por delgadas membranas de tecido conjuntivo. No entanto, nos músculos idosos observou-se espessamento das paredes dos envoltórios musculares, principalmente do endomísio e perimísio. Segundo Kjaer (2004), durante o processo fisiológico do envelhecimento, os fibroblastos proliferam-se promovendo o espessamento dos feixes de fibras colágenas, acarretando em rigidez muscular e conseqüentemente, no comprometimento da função muscular. Para Gao et al. (2008) o espessamento das lâminas concêntricas dos envoltórios musculares ocorre por alterações das características físicas e biológicas das fibras colágenas, sendo que estas alterações observadas no epímísio do EM e CM idoso, acarretam possivelmente na rigidez e prejuízo funcional no mecanismo de transmissão de força muscular. Os diferentes aspectos do tecido conjuntivo no tecido muscular foram relatados por Ohtani (1987), Ohtani et al. (1988), Luques (2009) e na junção miotendínea por Ciena et al. (2010).

Por outro lado, o envelhecimento do sistema músculo-esquelético apresenta perda progressiva da massa muscular e, concomitantemente, diminuição da força, comprimento e resistência muscular. Esta condição denominada de sarcopenia revela importantes implicações desfavoráveis aos cuidados com a saúde e aspectos sócio-culturais para os seres humanos. Além disso, a sarcopenia contribui para a fragilidade da estrutura muscular e acarreta em elevados custos nos tratamentos específicos relatados por Janssen et al. (2004) e morte prematura em alguns casos relatados por Malatesta et al. (2010). Thompson (2009) enfatiza que há diminuição da massa muscular presente nos idosos sarcopênicos é devido a múltiplos fatores que continuam a ser elucidados.

As observações ao microscópio eletrônico de transmissão dos músculos EM e CM dos animais adultos e idosos, possibilitaram verificar na disposição longitudinal das fibras musculares a unidade estrutural do músculo estriado esquelético, o sarcômero, disposto através da organização das faixas escuras, que são denominadas de Banda A (anisotrópicas), e as faixas claras, Banda I (isotrópicas). Na região central da Banda A observou-se uma fina faixa mais clara, a zona H, formada apenas por filamentos espessos. Na região central da zona H, observa-se a linha M, formada por um arranjo hexagonal de proteínas que unem filamentos espessos adjacentes. A banda I é constituída pelos filamentos delgados (actina), que se estendem até o início da zona H, sendo dividida na região central por uma linha escura fina, linha Z. Os principais componentes da Banda A são os filamentos

espessos (miosina), localizados na região central do sarcômero. Estas características foram descritas anteriormente por Clark et. al (2002) e por Motoyama et al. (2009).

Em adição, pode-se enfatizar os relatos de Goldspink (2004), que o músculo esquelético é um tecido altamente especializado, o qual apresenta remodelamento constante a diversos fatores.

Em modelos experimentais de hipoatividade muscular relatado por Shah et al. (2001), através da diminuição da ação da gravidade e em músculos idosos ocorre plasticidade muscular, ao revelar diminuição da área de secção transversa (IYOMASA et al., 2009) e, subsequentemente, no volume total do músculo, comprometendo a eficácia contráctil, caracterizando a atrofia muscular. Ainda Goldspink (1999) e Volpi et al. (2008) frisam que as alterações no comprimento da fibra muscular são decorrentes da diminuição dos sarcômeros em séries.

Os resultados do presente estudo demonstraram alterações ultra-estruturais nas características da célula muscular, constatando atrofia muscular no EM idoso. Neste caso observou-se inconsistência topográfica dos feixes de miofibrilas, diâmetros reduzidos e formatos variados das mitocôndrias nas regiões subsarcolemal e inter miofibrilar da célula muscular. No músculo CM idoso, entre outras alterações, observou-se morfologia inconsistente da membrana sarcoplasmática, escassez e morfologia irregular das mitocôndrias, com a presença de uma estrutura multivesicular, provavelmente associada a processos degenerativos de organelas citoplasmáticas.

No músculo EM adulto observou-se a presença de grupamentos de mitocôndrias esféricas na porção subsarcolemal e intermiofibrilar, de acordo com Bazan et al. (2008) ao relatarem semelhanças na disposição e formato das mitocôndrias, no músculo pterigóideo medial. Na estrutura interna da fibra muscular, revelou-se a disposição em pares de mitocôndrias esféricas, formando colunas finas alinhadas próximo da junção da Banda A-I. No entanto, os músculos idosos apresentaram redução e alteração no formato das mitocôndrias e ausência destas, próximo da junção da Banda A-I, adjacientemente à linha Z. Estes dados corroboram com Boncompagni et al. (2009), que descreveram a topografia regional das mitocôndrias e estruturas adjacentes em músculos de camundongos durante o desenvolvimento, no período entre 2 semanas a 4 meses, destacando a distribuição

aos pares de mitocôndrias próximo a junção da Banda A-I e a relação com as estruturas do retículo sarcoplasmático.

Esteva et al. (2008) ao analisar a densidade das mitocôndrias nas regiões subsarcolemal, sarcoplasmática (intermiofibrilar) e pericapilar, do tecido muscular de ratos anêmicos, observaram redução na quantidade de mitocôndrias em ambas as regiões. Os autores enfatizaram que em músculos distintos com características glicolíticas e oxidáticas como no caso dos músculos, extensor longo dos dedos e sóleo respectivamente, apresentaram estas alterações mitocondriais.

Além disso, as mitocôndrias exercem funções vitais como na respiração celular, no metabolismo de substratos e ao contribuir na homeostasia do íon cálcio nas células musculares conforme os relatos de Huang et al. (2010). Durante o envelhecimento há diminuição do número de mitocôndrias nas células musculares, destacando eventos como disfunção mitocondrial e apoptose celular, relacionando estes fatores à diminuição da massa muscular presentes em pacientes sarcopênicos. É interessante notar que Thomas (2010) menciona os prováveis mecanismos responsáveis pela sarcopenia e sua possível potencialização entre as interações destes fatores, destacando: pré-maturidade, desnutrição ao nascimento, sedentarismo, imobilidade, níveis reduzidos de hormônios tróficos, doenças neuromusculares e traumáticas.

Os resultados demonstraram que entre as células musculares, há presença de numerosos capilares sanguíneos, circundados por parte citoplasmática do pericito. Kennedy et al. (2010) ressaltaram a hipótese da participação do pericito em eventos diretamente relacionados com o mecanismo da angiogênese. Nos músculos esqueléticos de animais adultos, Egginton et al. (2001) destacaram o padrão morfológico da angiogênese diferenciando em resposta a estímulos mecânicos como estiramentos ou contrações musculares e à hipervolemia crônica.

Quando os capilares foram analisados ultra-estruturalmente, observou-se que as células endoteliais possuem lâminas citoplasmáticas com inúmeras cavéolas, vesículas pinocíticas e junções endoteliais dos tipos desmossomas entre as lâminas citoplasmáticas. Nos capilares dos músculos idosos, verificou-se alterações nos padrões morfológicos do formato da célula endotelial. Próximo à junção das células endoteliais dos músculos adultos, observou-se a presença de projeções citoplasmáticas para o lúmen capilar. Entretanto, nos capilares dos músculos idosos essas estruturas não foram observadas.

De acordo com Lee e Schmid-Schönbein (1995) tais projeções citoplasmáticas, denominadas de pseudópodos endoteliais, são estruturas com formato de “dedos” e, frequentemente, estão localizados próximo às junções endoteliais, com disposição para o lúmen capilar. Hueck et al. (2008) relataram a complexidade das células endoteliais apresentando modificações no seu formato a determinados estímulos, como por exemplo, na formação de projeções citoplasmáticas. No entanto, Edwards et al. (2010) enfatizaram que os pseudópodos endoteliais podem comprometer significativamente a resistência hemodinâmica favorecendo a obstrução capilar, atribuindo importante contribuição na pressão arterial.

Os nossos resultados do músculo CM idoso evidenciaram o agrupamento de mitocôndrias entre o núcleo muscular e o núcleo volumoso da célula satélite essencialmente na periferia da célula muscular. De acordo com Ishido e Kasuga (2011), no músculo esquelético adulto, as células satélites são células-troncos quiescentes que estão localizadas entre a membrana plasmática e membrana basal da fibra muscular.

À determinadas injúrias ao tecido muscular, as células satélites são ativadas e desempenham importantes funções na reparação tecidual. Durante o envelhecimento, Shibata et al. (2010) e Malatesta et al. (2010) relatam que o declínio na regeneração celular ocorre por apresentar alteração na quantidade e diferenciação das células satélites.

Mediante a reação histoquímica – NADH-tr, utilizado inicialmente para localização mitocondrial de enzimas oxidativas por Novikoff, Shin e Drucker (1961), os resultados do presente estudo demonstraram a diferenciação dos tipos de fibras pela tonalidade da coloração. Nos músculos EM e CM adulto e idoso as fibras G apresentaram-se claras e diâmetro maior, as fibras GO, diâmetro e tonalidade intermediárias e as fibras O com diâmetro menor e coloração intensa em relação às demais fibras. Tais características foram referidas por Bazan et al. (2008), ao analisar o músculo pterigóideo medial após modelo experimental de hipoatividade muscular em cobaias (*Cavia porcellus*) e descrita por Iyomasa et al. (2009), ao analisarem os músculos supra-hióideos de gerbil (*Meriones unguiculatus*), em modelo experimental de hipoatividade muscular após extração dos dentes molares superiores.

Segundo Grefte et al. (2007), fibras musculares com metabolismo oxidativo alto (Tipo I) são de contração lenta e resistente a fadiga; as fibras glicolíticas (Tipo IIA) são de contração rápida e moderada resistência a fadiga e as fibras glicolíticas-oxidativas (Tipo IIB) são de contração rápida e não resistentes a fadiga. A proporção dos tipos de fibras nos músculos esqueléticos pode sofrer adaptações e alterações ao longo da vida (JÄRVINEN et al., 2005).

Os músculos EM e CM foram divididos em duas regiões distintas: superficial e profunda por apresentarem heterogeneidade na distribuição dos tipos de fibras. Na região superficial de ambos os músculos adulto e idoso apresentaram maior incidência de fibras G, intermediária de fibras GO e O em menor quantidade. No entanto, na região profunda de ambos os músculos EM e CM ocorreu o inverso, ao apresentar maior incidência de fibras O, intermediário de fibras GO, menor quantidade de fibras G e ausência desta na região profunda do músculo CM. Resultados semelhantes foram relatados por Sano et al. (2007) ao descrever heterogeneidade de músculos da mastigação em roedores, na proporção dos tipos de fibras por regiões e ao apresentar na região superficial maior incidência de fibras G e O na região profunda.

Com o envelhecimento observou-se nos músculos EM e CM plasticidade muscular em decorrência do aumento da AST das fibras G, GO e G nas regiões superficial e profunda e diminuição da densidade total de fibras. Paralelamente, o músculo CM idoso apresentou diminuição da densidade dos três tipos de fibras nas regiões superficial e profunda. Ademais, observou no músculo EM resultados semelhantes ao referir-se à densidade dos tipos de fibras, com exceção na região superficial ao notar aumento expressivo de fibras O. Como relatado por Monemi et al. (1999), ao observar nos músculos dos membros inferiores e do tronco de humanos idosos o aumento de fibras tipo I e concomitantemente, a diminuição das fibras do tipo II. De acordo com Cebasek et al. (2007), os tipos de fibras sofrem transições de características de metabolismo, oxidativas para glicolíticas e de glicolíticas para oxidativas há diversos estímulos como observado no presente estudo em decorrência do envelhecimento e sedentarismo, com prováveis alterações nas velocidades de contração miofibrilar e resistência à fadiga.

Segundo Baldwin e Haddad (2001), a composição dos tipos de fibras nos músculos esqueléticos sofre influência de fatores como: a hereditariedade,

envelhecimento, hormonal e em modelos experimental de hipoatividade (BAZAN et al., 2008).

Os resultados com o envelhecimento do músculo EM apresentaram alteração na tipificação das fibras musculares, na região superficial e profunda ao demonstrar aumento na proporção das fibras O (tipo I), e diminuição das fibras GO (tipo IIb) e no músculo CM, aumento das fibras G (tipo IIa) e diminuição das fibras O (tipo I) na região superficial e na região profunda, diminuição das fibras O e aumento das fibras GO. Em hipótese, tais alterações no músculo EM, seja em decorrência das características funcionais da fase adulta ao apresentarem contrações vigorosas e maiores amplitudes de movimento das articulações crânio-vertebrais, e com o envelhecimento há adaptação funcional, no controle postural da coluna cervical e ao auxiliar enfaticamente na inspiração profunda. No entanto, no músculo CM, tais alterações sejam em virtude da diminuição da atividade celular e compensatórias em virtude dos músculos EM e CM apresentarem funções semelhantes, mas com disposição topográfica e angulares diferentes.

Segundo Korfage et al. (2006), ao analisarem as alterações na tipificação das fibras dos músculos masseter e digástrico em coelhos durante o desenvolvimento seja em, decorrência primeiramente das alterações de funções destes músculos e aumento na proporção das fibras tipo I, supostamente pela influência hormonal no estágio final do desenvolvimento da fase adulta destes músculos.

Verdijk et al. (2010), relataram ao analisar através de biópsia muscular do vasto lateral de idosos, forte correlação entre a quantidade de célula satélite e AST da fibra muscular. Segundo Malatesta et al. (2010), a densidade de células satélites diminui significativamente nos músculos de ratos idosos em comparação com os músculos adultos, com comprometimento na capacidade regenerativa do tecido muscular na sarcopenia. Acredita-se que a diminuição de célula satélite no tecido muscular desempenhe contribuição favorável á diminuição específica de fibras tipo II e, conseqüentemente, na massa e comprimento muscular, em virtude deste tipo de fibra produzir maior tensão específica e produção de força durante as contrações musculares. Ou seja, a diminuição de fibras tipo II com o envelhecimento contribui para o desenvolvimento de fraqueza muscular, qualitativo pela diminuição da AST e quantitativo pelo aumento relativo de fibras tipo I.

Finalizando, salientamos que com estes dados não pretendemos elucidar todas as características envolvidas no processo de envelhecimento de músculos

esqueléticos. Outros projetos devem ser elaborados no futuro para a continuidade dos estudos nesta linha de pesquisa.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

1. Histologicamente as células dos músculos EM e CM apresentaram alterações nas características estruturais e ultra-estruturais com o envelhecimento.
2. As amostras tratadas em solução de NaOH demonstraram aumento no espessamento (qualitativamente) das paredes do endomísio e perimísio dos músculos EM e CM idoso.
3. Notou-se grupamentos de mitocôndrias em formato de colunas com diâmetros variados, localizadas na porção periférica do sarcoplasma dos músculos EM e CM adulto. Nos músculos idosos, as mitocôndrias revelaram formas irregulares e diâmetros menores.
4. Os pseudópodos endoteliais não foram observados nos capilares dos músculos EM e CM idoso.
5. As AST das fibras musculares do EM e CM idoso foram maiores em relação aos adultos caracterizando a plasticidade muscular.
6. Paralelamente ao aumento da AST dos tipos de fibras dos músculos EM e CM idoso observou-se diminuição da densidade total dos tipos de fibras, caracterizando a atrofia muscular.
7. Os músculos EM e CM adulto e idoso apresentam maior incidência de fibras G na região superficial e O na região profunda.
8. Observou-se alteração na tipificação dos tipos de fibras do músculo EM e CM com o envelhecimento.

REFERÊNCIAS*

ANDERSEN, J. L. Muscle fiber type adaptation in the elderly human muscle. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 13, n. 1, p. 40-47, 2003.

BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. Effect of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 1, p. 345-357, 2001.

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.

BAZAN, E.; ISSA, J. P.; WATANABE, I.; MANDARIM-de-LACERDA, C. A.; DEL BEL, E. A.; IYOMASA, M. M. Ultrastructural and biochemical changes of the medial pterygoid muscle induced by unilateral exodontias. **Micron**, v. 39, n. 5, p. 536-543, 2008.

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

BEMIS, W. E.; LAUDER, G. V. Morphology and function of the feeding apparatus of the lungfish, *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). **Journal of Morphology**, v.187, n. 1, p. 81-108, 1986.

BONCOMPAGNI, S.; ROSSI, A. E.; MICARONI, M.; BEZNOUSSENKO, G. V.; POLISHUK, R. S.; DIRKSEN, R. T. Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 1058-1067, 2009.

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.

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.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURTON, D. G. Cellular senescence, ageing and disease. **Age**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2009.

CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; ALMEIDA, S. R. Y.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Ultrastructure of the myotendinous junction of the pterigoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.

CLARK, K. A.; MCELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. A.; GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. 637-706, 2002.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 1456-1471, 2000.

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.

D'AVOLA, T. E.; KOICHI, O.; ALVES SILVA, M. R. M.; MOTOYAMA, A. A.; INÁCIO, E.; KÖNIG JR, B.; WATANABE, I. Three-dimensional characteristics of submandibular salivary gland of ageing rats: An HRSEM study. **Annals of Anatomy**, v. 188, p. 431-438, 2006.

DIOGO, R. The head and neck muscles of the philippine colugo (Dermoptera: Cynocephalus volans), with a comparison to tree-shrews, primates, and other mammals. **Journal of Morphology**, v. 270, p. 14-51, 2009.

DIOGO, R.; ABDALA, A.; LONERGAN, N.; WOOD, B.A. From fish to modern humans- comparative anatomy, homologies and evolution of the head and neck musculature. **Journal of Anatomy**, v. 213, p. 391-424, 2008.

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

EDWARDS, K. M.; SHEU, B.; HONG, S.; PENN, A. H.; SCHIMID-SCHÖNBEIN, G. W.; MILLS, P. J. Leukocyte membrane bleb and pseudopod formation in hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 22, p. 1-3, 2010.

EGGINTON, S.; ZHOU, A. L.; BROWN, M. D.; HUDLICKA, O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. **Cardiovascular Research**, v. 49, p. 634-646, 2001.

EISENBERG, B. R.; MILTON, R. L. Muscle fiber termination at the tendon in the frog's sartorius: a stereological study. **The American Journal of Anatomy**, v. 171, n. 3, p. 273-284, 1984.

ENGLISH, A. W.; EASON, J.; SCHWARTZ, G.; SHIRLEY, A.; CARRASCO, D. I. Sexual dimorphism in the rabbit masseter muscle: myosin heavy chain composition of neuromuscular compartments. **Cells Tissues Organs**, v. 164, n. 4, p. 179-191, 1999.

ESTEVA, S.; PANISELLO, P.; CASAS, M.; TORRELLA, J. R.; PAGÉS, T.; VISCOR, G. Morphofunctional responses to anaemia in rat skeletal muscle. **Journal of Anatomy**, v. 212, n. 6, p. 836-844, 2008.

EVAN, A. P.; DAIL, W. G.; DAMMROSED, D.; PALMER, C. Scanning electron microscopy of cell surfaces following removal of extracellular material. **The Anatomical Record**, v. 185, p. 433-446, 1976.

FEITOSA, V. L. C.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Optical anisotropy of a pig tendon under compression. **Journal of Anatomy**, v. 200, p. 105-111, 2002.

GAO, Y.; KOSTROMINOVA, T. Y.; FAULKNER, J. A.; WINEMAN, A. S. Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. **Journal of Biomechanics**, v. 41, n. 2, p. 465-469, 2008.

GENESER, F. **Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GOLDSPINK, G. Change in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **Journal of Anatomy**, v. 194, p. 323-334, 1999.

GOLDSPINK, G. Age-related loss of skeletal muscle function; impairment of gene expression. **Journal of Musculoskeletal & Neural Interactions**, v. 4, n. 2, p. 143-147, 2004.

GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; TORENSMA, R.; VON DEN ROFF, J. W. Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem Cells and Development**, v. 16, p. 857-868, 2007.

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.

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

HUANG, J. H.; JOSEPH, A. M.; LJUBICIC, V.; IQBAL, S.; HOOD, D. A. Effect of Age on the Processing and Import of Matrix-Destined Mitochondrial Proteins in Skeletal Muscle. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 65, n. 2, p. 138-146, 2010.

HUECK, I. S.; ROSSITER, K.; ARTMANN, G. M.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Fluid Shear Attenuates Endothelial Pseudopodia Formation into the Capillary Lumen. **Microcirculation**, v. 15, n. 6, p. 531-542, 2008.

ISHIDO, M.; KASUGA, N. In situ real-time imaging of the satellite cells in rat intact and injured soleus muscles using quantum dots. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 135, n. 1, p. 21-26, 2011.

ISHIKAWA, H.; SAWADA, H.; YAMADA, E. Surface and internal morphology of skeletal muscle. **Handbook of Physiology-skeletal muscle**, p. 1-20, 1982.

IYOMASA, M. M.; ISSA, J. P. M.; SIÉSSERE, S.; REGALO, S. C. H.; WATANABE, I. Effect of unilateral extraction of molar teeth on suprahoid muscles: macroscopic and ultrastructural aspects. **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1111-1118, 2008.

IYOMASA, M. M.; GUERRA, C. S.; DIAS, F. J.; PITOL, D. L.; WATANABE, I.; ISSA, J. P. M. Histological and histochemical effects after occlusion alteration in suprahoid muscles. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 239-246, 2009.

JANSSEN, I.; BAUMGASTNER, R. N.; ROSS, R.; ROSENBERG, I. H.; ROUBENOFF, R. Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, n. 4, p. 413-421, 2004.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, T. L.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

JÄRVINEN, T. A.; JÓZSA, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN T. L.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 23, p. 245-254, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

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

KENNEDY, A.; NG, C. T.; BINIECKA, M.; SABER, T.; TAYLOR, C.; O'SULLIVAN, J.; VEALE, D. J.; FEARON, U. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 3, p. 711-721, 2010.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loadin. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 649-698, 2004.

KORFAGE, J. A. M.; van WESSEL, T.; LANGENBACH, G. E. J.; AY, F.; van EIJDEM, T. M. G. J. Postnatal transitions in myosin heavy chain isoforms of the rabbit superficial masseter e digastrics muscle. **Journal of Anatomy**, v. 208, n. 6, p. 743-751, 2006.

KUROSE, T.; ASAI, Y.; MORI, E.; DAITOKU, D.; KAWAMATA, S. Distribution and change of collagen types I and III and elastin in developing leg muscle in rat. **Hiroshima Journal of Medical Science**, v. 55, n. 3, p. 85-91, 2006.

LAMBERT, C. P.; EVANS, W. J. Effects of aging and resistance exercise on determinants of muscle strength. **Journal of the American Aging Association**, v. 25, p. 73-78, 2002.

LANG, T.; STREEPER, T.; CAWTHON, P.; BALDWIN, K.; TAAFFE, D. R.; HARRIS, T. B. Sarcopenia: etiology, clinical onsequences, intervention, and assessment. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 4, p. 543-559, 2009.

LEA, P. J.; HOLLENBERG, M. J. Mitochondrial structure revealed by scanning electron microscopy (SEM). **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 295, p. 63-70, 1989.

LEE, J.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Biomechanics of skeletal muscle capillaries: hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 23, p. 226-246, 1995.

LIGHT, N.; CHAMPION A. E. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. **The Biochemical Journal**, v. 219, n. 3, p. 1017-1026, 1984.

LOPES, M. G.; WATANABE, I.; PICOLI, L. C.; SILVA, N. S.; SILVA, M. C. P. Ultrastructural aspects of female aging Wistar rat tongue: a HRSEM and TEM study. **Gerontology**, v. 72, p. 464-470, 2009.

MACCONNACHIE, H. F.; ENESCO, M.; LEBLOND, C. P. The of increase in the number of skeletal muscle nuclei in the postnatal rat. **The American Journal of Anatomy**, v. 114, p. 245-253, 1964.

MACKAY, B.; HARROP, T. J.; MUIR, A. R. The fine structure of the muscle tendon junction in the rat. **Acta Anatomica**, v. 73, n. 4, p. 588-602, 1969.

MALATESTA, M.; PERDONI, F.; MULLER, S.; PELLICCIARI, C.; ZANCANARO, C. Pre-mRNA processing is partially impaired in satellite cell nuclei from aged muscles. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 1-9, 2010.

MCARDLE, A.; VASILAKI, A.; JACKSON, M. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 1, p. 79-93, 2002.

MENG, S. J.; YU, L. J. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. **International of Molecular Science**, v. 11, n. 4, p. 1509-1526, 2010.

MISSAGHI, B. Sternocleidomastoid syndrome: a study case. **The Journal of the Canadian Chiropractic Association**, v. 48, n.3, p. 201-205, 2004.

MONEMI, M.; ERIKSSON, P. O.; ERIKSSON, A.; THORNELL, L. E. Adverse changes in fibre type composition of the human masseter versus biceps brachii muscle during aging. **Journal Neurological Sciences**, v. 154, n. 1, p. 35-48, 1999.

MONEMI, M.; KADI, F.; LIU, J. X.; THORNELL, L. E.; ERIKSSON, P. O. Adverse changes in fibre type and myosin heavy chain compositions of human jaw muscle vs. limb muscle during ageing. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 167, n. 4, p. 339-345, 1999.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 1-11, 1991.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MOTOYAMA, A. A. **Estudo qualitativo histoenzimológico e ultraestrutural dos componentes citoplasmáticos, capilares e inervação motora das fibras musculares intrínsecas do terço anterior da língua de ratos albinus wistar**. 2004. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MOTOYAMA, A. A.; WATANABE, I.; IYOMASA, M. M.; SILVA, M. C. P.; SOSTHINES, M. C. K.; OGAWA, K.; LOPES, M. G. O.; KFOURY, J. R. Ultrastructure of motor nerve terminals in the anterior third of wistar rat tongue. **Journal Microscopy Research and Technique**, v. 72, p. 464-470, 2009.

MURAKAMI, T. A metal impregnation method of biological specimens for SEM. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 35, n. 4, p. 323-326, 1973.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKASHI, K. Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. A demonstration using the cell-maceration/scanning electron microscope method. **Acta Anatomica**, v. 151, n. 4, p. 250-257, 1994.

NORTON, M. W.; MEJIA, W.; MCCARTER, R. J. Age, fatigue and excitation-contraction coupling in masseter muscles of rats. **The Journal of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 56, n. 2, p. B58-B65, 2001

NOVIKOFF, A. B.; SHIN, W. Y.; DRUCKER, J. Mitochondrial localization of oxidative enzymes: staining results with two tetrazolium salts. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, p. 47-61, 1961.

OGATA, T.; YAMASAKI, Y. High-resolution scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the different twitch muscle fibers of the frog. **Cell and Tissue Research**, v. 250, n. 3, p. 489-497, 1987.

OGATA, T.; YAMASAKI, Y. Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers. **Cell and Tissue Research**, v. 241, n. 2, p. 251-256, 1985.

OHTANI, O. Three-dimensional organization of the connective tissue fibers of the human pancreas: a scanning electron microscopic study of NaOH treated-tissues. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 50, n. 5, p. 557-566, 1987.

OHTANI, O.; USHIKI, T.; TAGUCHI, T.; KIKUTA, A. Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks: a demonstration by cell-maceration/scanning electron microscope method. **Archives of Histology and Cytology**, v. 51, n. 3, p. 249-261, 1988.

PARTHASARATHY, S.; JUBRAN, A.; LAGHI, F.; TOBIN, M. J. Sternomastoid, rib cage, and expiratory muscle activity during weaning failure. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 1, p. 140-147, 2007.

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. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 115, p. 359-372, 2001.

PINTO, S.; CARVALHO, M. Motor responses of the sternocleidomastoid muscle in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Muscle & Nerve**, v. 38, p. 1312-1317, 2008.

PORTER, M. M.; VANDERVOORT, A. A.; LEXELI, J. Aging of human muscle: structure, function and adaptability. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 5, n.3, p. 129-142, 1995.

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. 17, p. 208-212, 1963.

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.

SANO, R.; TANAKA, E.; KORFAGE, J. A.; LANGENBACH, G. E.; KAWAI, N.; Van EIJDEN, T. M.; TANNE, K. Heterogeneity of fiber characteristics in the masseter and digastrics muscles. **Journal of Anatomy**, v. 211, n. 4, p. 464-470, 2007.

SATO, M.; SATO, T. Fine structure of developed human tongue muscle. **Okajima Folia Anatomica Japonica**, v. 69, n. 2-3, p. 115-130, 1992.

SAWADA, H.; ISHIKAWA, H.; YAMADA, E. High resolution scanning electron microscopy of frog satorius muscle. **Tissue & Cell**, v. 10, n. 1, p. 179-190, 1978.

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

SHAH, S. B.; PETERS, D.; JORDAN, K. A.; FRIDÉN, J.; CAPETANAKI, Y.; LIEBER, R. L. Sarcomere number regulation maintained after immobilization in desmin-null mouse skeletal muscle. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 10, p. 1703-1710, 2001.

SHIBATA, S.; UENO, C.; ITO, T.; YAMANOUCHI, K.; MATSUWAKI, T.; NISHIHARA, M. Skeletal muscle growth defect in human growth hormone transgenic rat is accompanied by phenotypic changes in progenitor cells. **Age**, v. 32, p. 239-253, 2010.

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 em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1999.

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

SMERDU, V.; MIZRACHI, I. K.; CAMPIONE, M.; LEINWAND, L.; SCHIAFFINO, S. Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type lib fibers of human

skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 267, p. C1723-C1728, 1995.

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.

TAJSHARGHI, H. Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1259-1275, 2008.

TANAKA, K. Demonstration of intracellular structures by high resolution scanning electron microscopy. **Scanning Electron Microscopy**, pt. 2, p. 1-8, 1981.

THOMAS, D. R. Sarcopenia. **Clinics in Geriatric in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 331-346, 2010.

THOMPSON, L. V. Age-related muscle dysfunction. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 1-2, p. 106-111, 2009.

TROTTER, J. A.; EBERHARD, S.; SAMORA, A. Structural domains of the muscle-tendon junction. 1. The internal lamina and the. **The Anatomical Record**, v. 207, n. 4, p. 573-591, 1983.

ULLAH, M.; MANSOR, O.; ISMAIL, Z. I. M.; KAPITONOVA, M. Y.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Localization of the spinal nucleus of accessory nerve in rat: a horseradish peroxidase study. **Journal of Anatomy**, v. 210, p. 428-438, 2007.

VAN EIJDEN, T. M.; KORFAGE, J. A.; BRUGMAN, P. Architecture of the human jaw-closing and jaw-opening muscles. **The Anatomical Record**, v. 248, n. 3, p. 464-474, 1997.

VASILEV, V.; ANDREEV, D.; KÜHNEL, W. Scanning electron microscopy of the endomysial collagen in the rat paravertebral musculature. **Annals of Anatomy**, v. 177, n. 1, p. 85-87, 1995.

VERDIJK, L. B.; KOOPMAN, R.; SCHAART, G.; MEIJER, K.; SAVELBERG, H. H.; VAN LOON, L. J. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. **American Journal of Physiology**, v. 292, n. 1, p. E151–E157, 2007.

VOLPI, F. S.; CASAROLLI, L. M.; PUDELL, C.; MENON, T.; CIENA, A. P.; ALVES, E. P. B.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos da remobilização em duas semanas com natação sobre o músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização. **Revista Brasileira de Medicina do esporte**, v. 14, p. 168-170, 2008

WATANABE, I. **Scanning electron microscopy atlas of cells and tissues of the oral cavity**. São Paulo, FAPESP e CNPQ, 1998.

WATANABE, I. Ultra-estrutura da terminação nervosa motora do músculo masseter de camundongos. **Odontólogo Moderno**, v. 9, p. 22-24, 1982.

WATANABE, I.; Jr. KÖNIG, B. Neurohistological observations on the tongue of the tufted capuchin, *Cebus apella* Linnaeus, 1758. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 2, p. 121-127, 1977.

WATANABE, I.; KORIYAMA, Y.; YAMADA, E. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. **Acta Anatomica**, v. 143, p. 59-66, 1992.

WATANABE, I.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 46, p. 173-182, 1983.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophysical Biochemical Cytology**, v. 4, n. 6, p. 727-730, 1958.

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

ZACKSENHAUS, E.; JIANG, Z.; CHUNG, G.; MARTH, J. D.; PHILIPS, R. A.; GALLIE, B. L. pRB controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. **Genes & Development**, v. 10, n. 23, p. 3051-3059, 1996.

WATANABE, I.; KORIYAMA, Y.; YAMADA, E. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. **Acta Anatomica**, v. 143, p. 59-66, 1992.

ANEXO – Tabela de Números Randômicos

ISS STEREOLOGY COURSE

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 $\Rightarrow 100$ you deal with triplets in stead, etc.

Random Numbers

7137	7380	3233	3331	8647	3913	6100	5785	8809	2057	4375	5014	83028	7335	72502	48174	42551	96122	22375	96488	46596	51900	09257	5674	18679	09094	30900	42489	53079	72789	72542	30359	38220	13972	86115	17196	24560
7138	3234	3332	3330	8648	3914	6101	5786	8810	2058	4376	5015	83029	7336	72503	48175	42552	96123	22376	96489	46597	51901	09258	5675	18700	09095	30901	42490	53080	72790	72543	30360	38221	13973	86116	17197	24561
7139	3235	3333	3331	8649	3915	6102	5787	8811	2059	4377	5016	83030	7337	72504	48176	42553	96124	22377	96490	46598	51902	09259	5676	18701	09096	30902	42491	53081	72791	72544	30361	38222	13974	86117	17198	24562
7140	3236	3334	3332	8650	3916	6103	5788	8812	2060	4378	5017	83031	7338	72505	48177	42554	96125	22378	96491	46599	51903	09260	5677	18702	09097	30903	42492	53082	72792	72545	30362	38223	13975	86118	17199	24563
7141	3237	3335	3333	8651	3917	6104	5789	8813	2061	4379	5018	83032	7339	72506	48178	42555	96126	22379	96492	46600	51904	09261	5678	18703	09098	30904	42493	53083	72793	72546	30363	38224	13976	86119	17200	24564
7142	3238	3336	3334	8652	3918	6105	5790	8814	2062	4380	5019	83033	7340	72507	48179	42556	96127	22380	96493	46601	51905	09262	5679	18704	09099	30905	42494	53084	72794	72547	30364	38225	13977	86120	17201	24565
7143	3239	3337	3335	8653	3919	6106	5791	8815	2063	4381	5020	83034	7341	72508	48180	42557	96128	22381	96494	46602	51906	09263	5680	18705	09100	30906	42495	53085	72795	72548	30365	38226	13978	86121	17202	24566
7144	3240	3338	3336	8654	3920	6107	5792	8816	2064	4382	5021	83035	7342	72509	48181	42558	96129	22382	96495	46603	51907	09264	5681	18706	09101	30907	42496	53086	72796	72549	30366	38227	13979	86122	17203	24567
7145	3241	3339	3337	8655	3921	6108	5793	8817	2065	4383	5022	83036	7343	72510	48182	42559	96130	22383	96496	46604	51908	09265	5682	18707	09102	30908	42497	53087	72797	72550	30367	38228	13980	86123	17204	24568
7146	3242	3340	3338	8656	3922	6109	5794	8818	2066	4384	5023	83037	7344	72511	48183	42560	96131	22384	96497	46605	51909	09266	5683	18708	09103	30909	42498	53088	72798	72551	30368	38229	13981	86124	17205	24569
7147	3243	3341	3339	8657	3923	6110	5795	8819	2067	4385	5024	83038	7345	72512	48184	42561	96132	22385	96498	46606	51910	09267	5684	18709	09104	30910	42499	53089	72799	72552	30369	38230	13982	86125	17206	24570
7148	3244	3342	3340	8658	3924	6111	5796	8820	2068	4386	5025	83039	7346	72513	48185	42562	96133	22386	96499	46607	51911	09268	5685	18710	09105	30911	42500	53090	72800	72553	30370	38231	13983	86126	17207	24571
7149	3245	3343	3341	8659	3925	6112	5797	8821	2069	4387	5026	83040	7347	72514	48186	42563	96134	22387	96500	46608	51912	09269	5686	18711	09106	30912	42501	53091	72801	72554	30371	38232	13984	86127	17208	24572
7150	3246	3344	3342	8660	3926	6113	5798	8822	2070	4388	5027	83041	7348	72515	48187	42564	96135	22388	96501	46609	51913	09270	5687	18712	09107	30913	42502	53092	72802	72555	30372	38233	13985	86128	17209	24573
7151	3247	3345	3343	8661	3927	6114	5799	8823	2071	4389	5028	83042	7349	72516	48188	42565	96136	22389	96502	46610	51914	09271	5688	18713	09108	30914	42503	53093	72803	72556	30373	38234	13986	86129	17210	24574
7152	3248	3346	3344	8662	3928	6115	5800	8824	2072	4390	5029	83043	7350	72517	48189	42566	96137	22390	96503	46611	51915	09272	5689	18714	09109	30915	42504	53094	72804	72557	30374	38235	13987	86130	17211	24575
7153	3249	3347	3345	8663	3929	6116	5801	8825	2073	4391	5030	83044	7351	72518	48190	42567	96138	22391	96504	46612	51916	09273	5690	18715	09110	30916	42505	53095	72805	72558	30375	38236	13988	86131	17212	24576
7154	3250	3348	3346	8664	3930	6117	5802	8826	2074	4392	5031	83045	7352	72519	48191	42568	96139	22392	96505	46613	51917	09274	5691	18716	09111	30917	42506	53096	72806	72559	30376	38237	13989	86132	17213	24577
7155	3251	3349	3347	8665	3931	6118	5803	8827	2075	4393	5032	83046	7353	72520	48192	42569	96140	22393	96506	46614	51918	09275	5692	18717	09112	30918	42507	53097	72807	72560	30377	38238	13990	86133	17214	24578
7156	3252	3350	3348	8666	3932	6119	5804	8828	2076	4394	5033	83047	7354	72521	48193	42570	96141	22394	96507	46615	51919	09276	5693	18718	09113	30919	42508	53098	72808	72561	30378	38239	13991	86134	17215	24579
7157	3253	3351	3349	8667	3933	6120	5805	8829	2077	4395	5034	83048	7355	72522	48194	42571	96142	22395	96508	46616	51920	09277	5694	18719	09114	30920	42509	53099	72809	72562	30379	38240	13992	86135	17216	24580
7158	3254	3352	3350	8668	3934	6121	5806	8830	2078	4396	5035	83049	7356	72523	48195	42572	96143	22396	96509	46617	51921	09278	5695	18720	09115	30921	42510	53100	72810	72563	30380	38241	13993	86136	17217	24581
7159	3255	3353	3351	8669	3935	6122	5807	8831	2079	4397	5036	83050	7357	72524	48196	42573	96144	22397	96510	46618	51922	09279	5696	18721	09116	30922	42511	53101	72811	72564	30381	38242	13994	86137	17218	24582
7160	3256	3354	3352	8670	3936	6123	5808	8832	2080	4398	5037	83051	7358	72525	48197	42574	96145	22398	96511	46619	51923	09280	5697	18722	09117	30923	42512	53102	72812	72565	30382	38243	13995	86138	17219	24583
7161	3257	3355	3353	8671	3937	6124	5809	8833	2081	4399	5038	83052	7359	72526	48198	42575	96146	22399	96512	46620	51924	09281	5698	18723	09118	30924	42513	53103	72813	72566	30383	38244	13996	86139	17220	24584
7162	3258	3356	3354	8672	3938	6125	5810	8834	2082	4400	5039	83053	7360	72527	48199	42576	96147	22400	96513	46621	51925	09282	5699	18724	09119	30925	42514	53104	72814	72567	30384	38245	13997	86140	17221	24585
7163	3259	3357	3355	8673	3939	6126	5811	8835	2083	4401	5040	83054	7361	72528	48200	42577	96148	22401	96514	46622	51926	09283	5700	18725	09120	30926	42515	53105	72815	72568	30385	38246	13998	86141	17222	24586
7164	3260	3358	3356	8674	3940	6127	5812	8836	2084	4402	5041	83055	7362	72529	48201	42578	96149	22402	96515	46623	51927	09284	5701	18726	09121	30927	42516	53106	72816	72569	30386	38247	13999	86142	17223	24587
7165	3261	3359	3357	8675	3941	6128	5813	8837	2085	4403	5042	83056	7363	72530	48202	42579	96150	22403	96516	46624	51928	09285	5702	18727	09122	30928	42517	53107	72817	72570	30387	38248	14000	86143	17224	24588
7166	3262	3360	3358	8676	3942	6129	5814	8838	2086	4404	5043	83057	7364	72531	48203	42580	96151	22404	96517	46625	51929	09286	5703	18728	09123	30929	42518	53108	72818	72571	30388	38249	14001	86144	17225	24589
7167	3263	3361	3359	8677	3943	6130	5815	8839	2087	4405	5044	83058	7365	72532	48204	42581	96152	22405	96518	46626	51930	09287	5704	18729	09124	30930	42519	53109	72819	72572	30389	38250	14002	86145	17226	24590
7168	3264	3362	3360	8678	3944	6131	5816	8840	2088	4406	5045	83059	7366	72533	48205	42582	96153																			