WILLIAM PAGANINI MAYER

**CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS, ULTRA-ESTRUTURAIS E
MORFOQUANTITATIVAS DOS MÚSCULOS TIBIAL ANTERIOR E SÓLEO DE
RATOS JOVENS SUBMETIDOS À IMOBILIZAÇÃO DA ARTICULAÇÃO
TALOCRURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia 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. Edson Aparecido Liberti

SÃO PAULO

2008

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

Mayer, William Paganini.

Características estruturais, ultra-estruturais e morfoquantitativas das fibras dos músculos tibial anterior e sóleo de ratos jovens submetidos à imobilização da articulação talocrural / William Paganini Mayer. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Edson Aparecido Liberti.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Adaptações morfológicas do tecido muscular.

Versão do título para o inglês: Structural, Ultrastructural and morphoquantitative features of tibials anterior and soleus muscle fibers of young rats subjected to talocruralis joint immobilization.

Descritores: 1. Fibras musculares 2. Imobilização 3. Órtese funcional 4. Articulação talocrural 5. Ultra-estrutura 6. I. Liberti, Edson Aparecido II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncional III. Título.

ICB/SBIB168/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): William Paganini Mayer.

Título da Dissertação: Características estruturais, ultra-estruturais e morfoquantitativas das fibras dos músculos tibial anterior e sóleo de ratos jovens submetidos à imobilização da articulação talocrural.

Orientador(a): Edson Aparecido Liberti.

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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **026** nas fls. **43** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Edson Aparecido Liberti** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Características estruturais, ultra-estruturais e morfométricas das fibras dos músculos tibial anterior e sóleo de ratos jovens submetidos a imobilização da articulação do tornozelo**" do qual participou(aram) o(s) alunos **William Paganini Mayer**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

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

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

*Aos meus pais, Vilmar Pascoal Mayer
e Maria Valdineti Paganini Mayer, por me
ensinarem através de exemplos e atos, o
que é amor, honestidade, respeito e
responsabilidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao criador de toda existência, por me agraciar com uma maravilhosa família, saúde, amigos e por me conceder a capacidade de realizar este trabalho.

Aos meu pais, Vilmar Pascoal Mayer e Maria Valdineti Paganini Mayer, alicerce do meu caráter, pelo amor incondicional e toda vida dedicada à minha formação.

Ao meu irmão, Vitor Paganini Mayer, amigo do peito e de fé, por me entender, incentivar e sempre mostrar prontidão em ajudar.

À minha querida Scheyla Carminati, pela paciência, compreensão, companheirismo, dedicação e apoio prestado em todos os momentos de dificuldades e alegrias encontrados nesta caminhada.

Ao Professor Dr. Edson Aparecido Liberti, amigo e educador, pela acolhida em seu laboratório, bondade, orientação precisa, pelo respeito, pelas verdadeiras lições de anatomia junto às disciplinas de técnicas anatômicas e anatomia odontológica e topográfica; pela feliz convivência na qual transpareceu seu honroso caráter e dignidade, qualidades essas que resultaram em verdadeiras aulas que perdurarão eternamente em minha história.

Ao Professor Dr. Rogério Albuquerque Azeredo, principal incentivador desta etapa que se cumpre, pela ajuda incondicional e tempo dispensado na minha formação, pelos valiosos conselhos e palavras de estímulo, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais de um grande amigo e mestre.

Ao Mestre Dr. Fernando Musso, professor que devido a sua vontade de ensinar, educar, de se doar, influenciou diretamente neste caminho trilhado, obrigado pela paciência e orientação nas primeiras dissecções anatômicas, por me conduzir a esta carreira e compartilhar de sua sabedoria.

Ao Professor Dr. Hildegardo Rodrigues, por acreditar, incentivar, pelos preciosos ensinamentos na minha formação como anatomista.

Ao Professor Dr. Dulcino Tose, pela estimada atenção e importantes lições de anatomia.

Aos demais professores de anatomia da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de misericórdia de Vitória, Dr. Cláudio Piras, Dr. Romildo Rabbi e Dr. José Alberto Barreira Sarmento, pela contribuição em minha formação.

À coordenadora do curso de fisioterapia da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de misericórdia de Vitória, Dr^a. Luciana Carrupt Machado Sogame, por toda luta e incentivo que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Dr^a. Sílvia de Campos Boldrini, pela prontidão em ajudar, colaboração, carinho, pelos valiosos ensinamentos junto ao curso de anatomia da farmácia e estímulos nos momentos de dificuldades.

Ao Professor Dr. Esem Pereira Cerqueira, pela amizade conquistada, perseverança nos seus ideais, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação e compartilhamento dos seus conhecimentos junto ao curso de anatomia geral e do aparelho locomotor do curso de medicina.

À grande amiga, Professora Dr^a. Flavia de Oliveira, por conduzir meus primeiros passos dentro do laboratório de pesquisa, pela prontidão em ajudar, parceria e prestimosa colaboração no exame de qualificação.

Ao Professor Dr. Antônio Herbert Lancha Junior, pela participação no exame de qualificação, idéias e sugestões pertinentes ao trabalho.

Ao Professor Dr. Matsuyoshi Mori, pela parceria, prontidão e indispensável auxílio na confecção das órteses utilizadas neste estudo.

Ao Professor Dr. Richard Halti Cabral, pelos efetivos ensinamentos na disciplina de análise funcional das estruturas do sistema circulatório.

Ao Professor Dr. Luis Ronaldo Picosse, pela agradável convivência junto aos cursos de anatomia odontológica.

Ao Professor Dr. Claudio Ferraz de Carvalho pelos ensinamentos transmitidos na disciplina de análise quantitativa em anatomia macroscópica, mesoscópica e microscópica.

Ao Professor Dr. Pedro Primo Bombonato, pela transmissão de conhecimento nos cursos de anatomia conceitual aplicada à pesquisa e tratamento museológico dos modelos anatômicos no ensino e na pesquisa.

Ao Professor Dr. Rainer Guilherme Haetinger pelas preciosas informações na disciplina de princípios de tomografia computadorizada e ressonância magnética aplicados à anatomia.

Ao grande amigo e parceiro Josemberg da Silva Baptista, pelo apoio, constante colaboração e inestimável amizade em todos estes anos de convivência.

Ao amigo Carlos Eduardo Seyfert e família, pela acolhida em seu lar, parcerias realizadas e agradáveis momentos de convivência.

Ao Flávio Silva Tampelini, amigo de grande caráter, por ter aberto às portas de sua casa, pelas proveitosas conversas e estímulos durante esta caminhada.

Ao Dr. Dorival Terra Martini, pela amizade conquistada, aconselhamentos e colaboração ao longo deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Bragança de Vasconcellos Fontes, pela parceria e amizade adquirida.

Ao amigo Luciano Gonçalves, pelas enriquecedoras discussões e prazerosos momentos de convívio.

À família Krohling Kunsch, Waldemar e Margarida, por todo apoio prestado na minha chegada a São Paulo.

Aos colegas e freqüentadores do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e Cirurgia (LAFACC) do departamento de anatomia da Universidade de São Paulo, Ágatha de Oliveira, Allan Bonani, Aline Gonçalves, Bruna Caixeta, Cibele Maciel, Diana de Oliveira, Isabela Luques, Leonardo Liberti, Letícia Nogueira, Lynda Arango, Lucilene Luiz, Luis Henrique Rodriguez, Marcelo Calderon, Marcelo Cavalli, Márcio Cristóforo, Maritza de Coura, Mateus Elias Pacheco, Milton Saavedra, Paulo Galvanini, Paulo Henrique de Matos, Regina Bolina de Matos, Ricardo Bandeira, Rogério Cruz de Oliveira, Sabrina Caixeta, Simone Piccoli, Thiago Habacuque, Ticiane Capote, Valquíria Mariotti, Vânia Furlani e Willian Bautz.

Aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Alexandre de Mello, Eduardo Beber, Fátima de Souza e Freitas, Gisele Reisdorfer, Guilherme Cotomacci, Leila Guissoni, Luciane Capelo, Márcia Mizuno, Renata de Vasconcelos, Wilma Allemandi.

À Rosana Duarte Prisco, do Setor de Estatística do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela prontidão na resolução dos problemas, extrema competência e profissionalismo.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Adevair Urenha Alves, Alessandro Rodrigo Martins, Carlos Roberto Caldas Pedro, Edson Dantas da Silva, Everton Luís Pavan Torres, Fábio Luiz, José Adão Mendes, Milton Pereira da Silva, Patrícia de Campos Rodrigues, Renivaldo de Souza, Sebastião Aparecido Boleta, em especial à Marta Maria da Silva Righetti e Sônia Regina Yokomizo de Almeida pela competência e auxílio na preparação do material de microscopia de luz e eletrônica deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

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

Meus sinceros agradecimentos, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei,
eu nada sei...”*

Almir Sater

RESUMO

MAYER, W. P. **Características Estruturais, Ultra-estruturais e Morfoquantitativas das Fibras dos Músculos Tibial Anterior e Sóleo de Ratos Jovens Submetidos à Imobilização da Articulação Talocrural.** 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As imobilizações por órtese são usadas rotineiramente nos procedimentos especializados em traumatologia. Tal intervenção pode ser recorrida nos tratamentos conservadores de algumas fraturas, lesões ligamentares, tendinites, dentre outras afecções do sistema musculoesquelético. O propósito do presente estudo foi avaliar a tipificação das fibras musculares e determinar parâmetros morfoquantitativos sobre os efeitos da imobilização da articulação talocrural (**ATC**). Foi confeccionada uma órtese imobilizadora metálica e fixada na **ATC** esquerda de ratos wistar com 90 dias de vida. A imobilização ocorreu por períodos de 2 e 4 semanas, mantendo a **ATC** com 100° de flexão. Após o período experimental, os músculos (mm.) tibial anterior e sóleo dos animais controles (**C**), dos membros imobilizados (**Im**) e contralaterais à imobilização (**CL**), foram corados pelos métodos de HE e Picro-sírius. Para a tipificação das fibras musculares, submeteu-se os cortes as reações histoquímicas da ATPase miosínica pH 9.4; 4.6 e 4.3 e NADH-tr; para a análise das ultra-estruturas procedeu-se a microscopia eletrônica de transmissão. Foram realizadas análises morfoquantitativas através de parâmetros como área de secção transversa (**AST**), área do perfil das fibras (**APF**), densidade das fibras musculares (**DFM**) e porcentagem das fibras nas secções transversais. Os resultados evidenciaram alterações na morfologia das fibras musculares, pois algumas fibras dos mm. **Im** exibiram células com núcleos centralizados, além disso, as fibras do tipo IIB tomaram formas elusivas. O perimísio destes mm. espessou-se, sendo esse envoltório constituído por fibras colágenas do tipo I e, principalmente, tipo III. Os fusos neuromusculares apresentaram fibras mais densamente arranjadas por uma cápsula de tecido conjuntivo espessada. Houve alterações no alinhamento das linhas Z e modificação de outras ultra-estruturas como as mitocôndrias. Sob o aspecto quantitativo, a **AST** dos mm. **Im** por 4 semanas foi menor. As fibras do tipo IIB sofreram redução da **APF** e aumento da **DFM** nos mm. **Im**. Ao mesmo tempo em que, ampliou-se a porcentagem das fibras do tipo IIA nos animais **Im**. Portanto, concluiu-se que a imobilização promoveu alterações na morfologia das fibras, fusos e esqueleto fibroso, assim como, proporcionou uma interconversão de fibras musculares do tipo IIB em IIA.

Palavras-chave: Fibras musculares. Imobilização. Órtese funcional. Articulação Talocrural. Ultra-estrutura.

ABSTRACT

MAYER, W. P. **Structural, Ultrastructural and Morphoquantitative Features of Tibialis Anterior and Soleus Muscle Fibers of Young Rats Subjected to Talocruralis Joint Immobilization.** 2008. 117 f. Master Thesis (Morphological Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Immobilizations by orthosis are routinely used in orthopedics procedures. This intervention is commonly used in some cases of bone fracture, ligament injury, tendonitis, among others disorders of musculoskeletal system. The aim of this study was to evaluate the fiber-type characteristics and determine morphoquantitative parameters on the effects of talocruralis joint (**ATC**) immobilization. A metallic orthosis model was made, and fixed on the left **ATC** of male wistar rats with 90 days old. This device immobilized the **ATC** in an angle of 100° for periods of 2 and 4 weeks. After the trial period, the tibialis anterior and soleus muscles (**mm.**) of control animals (**C**), the immobilized members (**Im**) and the right hind limbs non-immobilized (**CL**) were stained by the methods of HE and Picrosirius. For muscle fiber-type characterization, the muscles sections were submitted to histochemical reaction of myosin ATPase at pH 9.4, 4.6, 4.3 and NADH-tr. The ultrastructural analyses were obtained by transmission electron microscopy. Morphoquantitative analyses were performed through parameters such as muscle cross-section area (**CSA**), fiber area profile (**FAP**), muscle fibers density (**MFD**) and the percentage of muscle fibers in cross-sections area. The results showed changes in the muscle fibers morphology. Some of **Im mm.** exhibited centralized nuclei cells and type IIB fibers took indefinite forms. The perimysium of **Im mm.** thicker up, and its wrap consisted of type I and, especially type III collagen fibers. The muscle spindles had become more densely arranged by a thickened capsule of connective tissue. Also, the longitudinal disorganization of lines Z was seen such other ultrastructural change occurs as mitochondrial modification. The quantitative measurements made in the present study demonstrated lower **CSA** values per 4 weeks of **Im**. In the **Im mm.**, type IIB fibers suffered reduction of **FAP** and increased of **MFD**. However, the percentage of fibers type IIA increased with **Im**. Therefore, based in our results, we concluded that immobilization promoted changes in muscle fiber morphology, muscle spindles, fibrous skeleton and provide an interconversion of muscle fibers type IIB into IIA.

Key words: Muscle fibers. Immobilization. Functional orthosis. Talocruralis joint. Ultrastructure.

LISTA DE ABREVIATURAS

APF – Área do perfil da fibra
AST – Área de secção transversa
ATPase – Adenosina Trifosfatase
C1 – Grupo controle de 2 semanas
C2 – Grupo controle de 4 semanas
 CaCl_2 – Cloreto de Cálcio
 CoCl_2 – Cloreto de Cobalto
DFM – Densidade das fibras musculares
DTF – Densidade total das fibras
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
FF – *Fast fatigable*
FG – *Fast glycolytic*
FI – *Fast intermediate*
FOG – *Fast oxidative glycolytic*
FR – *Fast resistant*
g – Gramas
G1 – Grupo experimental de 2 semanas
G2 – Grupo experimental de 4 semanas
G1c – Membro contralateral de 2 semanas
G1i – Membro imobilizado por 2 semanas
G2i – Membro imobilizado por 4 semanas
G2c – Membro contralateral de 4 semanas
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
 mm^2 – Milímetro quadrado
 μm^2 – Micrômetro quadrado
NaOH – Hidróxido de sódio
NaCl – Cloreto de sódio
NADH-tr – *Nicotinamide di-nucleotide-reduced form*
NBT – *Nitro blue tetrazolium*
S – *Slow*
SO – *Slow oxidative*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais relacionadas à classificação dos tipos de fibras musculares.....	25
Tabela 2. Distribuição dos animais nos grupos e músculos utilizados de acordo com o período de imobilização.....	35
Tabela 3. Marcação das reações histoquímicas.....	40
Tabela 4. Média e desvio padrão do peso dos animais em gramas.....	64
Tabela 5. Média e desvio padrão da Área de Secção Transversa (AST) em mm ² do músculo Sóleo.....	65
Tabela 6. Média e desvio padrão da Área de Secção Transversa (AST), em mm ² , do músculo Tibial Anterior.....	67
Tabela 7. Média e desvio padrão, em µm ² , da Área do Perfil das Fibras (APF) do músculo Sóleo nas diferentes condições de grupos e períodos experimentais.....	68
Tabela 8. Média e desvio padrão, em µm ² , da Área do Perfil das Fibras (APF) do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições de grupos e períodos experimentais.....	72
Tabela 9. Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM), nº de fibras por µm ² , do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais de 2 e 4 semanas.....	77
Tabela 10. Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM), nº de fibras por µm ² , da Região Superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	81
Tabela 11. Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM), nº de fibras por µm ² , da Região Profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	86
Tabela 12. Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM) e porcentagem das fibras do tipo I e IIB do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.....	90
Tabela 13. Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM) e Porcentagem das fibras na Região Superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	92
Tabela 14. Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM) e Porcentagem das fibras na Região Profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	94

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fases do processo de confecção das órteses.....	34
Figura 2. Mensuração do ângulo de imobilização.....	36
Figura 3. Programa de aquisição de imagens. Imagem capturada a partir da lupa estereoscópica.....	42
Figura 4. Programa de aquisição de imagens. Imagem capturada no microscópio binocular.....	44
Figura 5. Tipificação das fibras do Músculo Tibial Anterior pela reação de NADH-tr.....	45
Figura 6. Sistema teste sobre a reação de ATPase pH 4,6.....	46
Figura 7. Fotomicrografias de cortes transversais de músculos sóleos do grupo controle (A e B), imobilizados por 2 semanas (C e D) e imobilizados por 4 semanas (E e F) corados pela técnica de H-E.....	49
Figura 8. Fotomicrografias de cortes transversais de músculos tibiais anteriores do grupo controle (A, B, C e F) e imobilizados por 4 semanas (D, E, G e H).....	51
Figura 9. Fotomicrografias de cortes transversais de músculos tibiais anteriores do grupo controle (A e B), imobilizados por 2 (C e D) e 4 semanas (E e F) submetidos a coloração de Picro-Sírius.....	53
Figura 10. Fotomicrografias de cortes transversais do músculo tibial anterior e sóleo submetidos a reação da NADH-tr.....	55
Figura 11. Fotomicrografias do músculo sóleo submetido à reação histoquímica da ATPase.....	57
Figura 12. Fotomicrografias da reação histoquímica da ATPase na região profunda do músculo tibial anterior nos grupos controle (A, C e E) e imobilizados por 2 semanas (B, D e F).....	59
Figura 13. Fotomicrografias da região superficial do músculo tibial anterior nos grupos controle (A e B) e imobilizados por 4 semanas (C e D) submetidos à técnicas histoquímicas.....	60
Figura 14. Eletromicrografia de músculos sóleos do grupo controle (A, C, E) e imobilizados por 4 semanas (B, D, F).....	62
Figura 15. Eletromicrografia de músculos tibial anterior do grupo controle (A) e imobilizados por 2 (B) e 4 semanas (C, D).....	63

Figura 16. Gráfico da média e desvio padrão do peso dos animais no final do período experimental de 2 e 4 semanas.....	65
Figura 17. Gráfico da média e desvio padrão da AST (mm ²) do músculo Sóleo no período experimental de 2 e 4 semanas.....	66
Figura 18. Gráfico da média e desvio padrão da AST (mm ²) do músculo Tibial Anterior no período experimental de 2 e 4 semanas.....	68
Figura 19. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) do músculo Sóleo no período experimental de 2 semanas.....	69
Figura 20. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) do músculo Sóleo no período experimental de 4 semanas.....	70
Figura 21. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) tipo I no músculo Sóleo.....	71
Figura 22. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) tipo IIB no músculo Sóleo.....	72
Figura 23. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) do músculo Tibial Anterior no período experimental de 2 semanas.....	73
Figura 24. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) do músculo Tibial Anterior no período experimental de 4 semanas.....	74
Figura 25. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) tipo I no músculo Tibial Anterior.....	75
Figura 26. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) tipo IIA no músculo Tibial Anterior.....	76
Figura 27. Gráfico da média e desvio padrão da APF (µm ²) tipo IIB no músculo Tibial Anterior.....	76
Figura 28. Gráfico da média e desvio padrão da DTF (nº de fibras/mm ²) do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.....	78
Figura 29. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo I (nº de fibras/mm ²) do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.....	79
Figura 30. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo IIB (nº de fibras/mm ²) do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.....	80
Figura 31. Gráfico da média e desvio padrão da DTF (nº de fibras/mm ²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	82

Figura 32. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo I (nº de fibras/mm ²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	83
Figura 33. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo IIA (nº de fibras/mm ²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	84
Figura 34. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo IIB (nº de fibras/mm ²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	85
Figura 35. Gráfico da média e desvio padrão da DTF (nº de fibras/mm ²) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	87
Figura 36. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo I (nº de fibras/mm ²) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	88
Figura 37. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo IIA (nº de fibras/mm ²) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	88
Figura 38. Gráfico da média e desvio padrão da DFM tipo IIB (nº de fibras/mm ²) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	89
Figura 39. Gráfico da média e desvio padrão da porcentagem das fibras do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.....	91
Figura 40. Gráfico da média e desvio padrão da porcentagem das fibras na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	93
Figura 41. Gráfico da média e desvio padrão da porcentagem das fibras na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.	20
1.1 Tipos de fibras musculares.	22
1.2 Modelos de desuso muscular.	25
2 OBJETIVOS.	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.	32
3.1 Animais.	33
3.2 Confeção da órtese metálica imobilizadora.	33
3.3 Formação dos grupos.	35
3.4 Processo de imobilização.	36
3.5 Obtenção dos músculos tibial anterior e sóleo.	36
3.6 Procedimentos histológicos.	37
3.7 Procedimentos histoquímicos.	37
3.7.1 NADH-tr (tetrazolim redutase).	38
3.7.2 Adenosina Trifosfatase – ATPase.	38
3.8 Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão (MET).	40
3.9 Morfometria.	42
3.9.1 Área das secções transversas dos músculos.	42
3.9.2 Área do perfil das fibras musculares do tipo I, IIA e IIB.	43
3.10 Estereologia.	44
3.10.1 Densidade das fibras musculares nas áreas de secção transversa..	44
3.11 Tratamento estatístico.	46
4 RESULTADOS.	47
4.1 Análise qualitativa.	48
4.1.1 Histologia.	48
4.1.2 Histoquímica.	54

4.1.2.1 Reação da NADH-tr.	54
4.1.2.2 Reação da ATPase miosínica.	56
4.1.3 Ultra-estrutura.	61
4.1.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão.	61
4.2 Análise Quantitativa.	64
4.2.1 Peso dos animais.	64
4.2.2 Área de Secção Transversa (AST).	65
4.2.2.1 AST do Músculo Sóleo.	65
4.2.2.2 AST do Músculo Tibial Anterior.	67
4.2.3 Área do Perfil das Fibras Musculares (APF).	68
4.2.3.1 APF do Músculo Sóleo.	68
4.2.3.2 APF do Músculo Tibial Anterior.	72
4.2.4 Densidade das fibras musculares (DFM).	77
4.2.4.1 DFM do músculo Sóleo.	77
4.2.4.2 DFM na região superficial do músculo Tibial Anterior.	81
4.2.4.3 DFM na região profunda do músculo Tibial Anterior.	86
4.2.5 Porcentagem das fibras musculares nas secções transversas.	90
4.2.5.1 Porcentagem dos tipos de fibras no músculo Sóleo.	90
4.2.5.2 Porcentagem dos tipos de fibras na região superficial do músculo Tibial Anterior.	91
4.2.5.3 Porcentagem dos tipos de fibras na região profunda do músculo Tibial Anterior.	93
5 DISCUSSÃO.	96
5.1 Modelo experimental.	98
5.2 Considerações sobre os resultados qualitativos e quantitativos.	102
6 CONCLUSÃO.	109
REFERÊNCIAS.	112

As imobilizações por órtese ou aparelho gessado são usadas rotineiramente nos procedimentos especializados em traumatologia. Tal intervenção pode ser recorrida nos tratamentos conservadores de algumas fraturas, lesões ligamentares, tendinites, tenossinovites dentre outras afecções do sistema musculoesquelético.

Segundo informações epidemiológicas do banco de dados do sistema único de saúde SIA/SUS (2008), o número de procedimentos traumato-ortopédicos realizados em todo Brasil no ano de 2006 ultrapassou a quantidade de sete milhões de casos, somando um total de 7.274.111 intervenções.

Os efeitos da imobilização refletem diretamente nas características estruturais do músculo estriado esquelético, por isto, esta técnica não invasiva de tratamento vem recebendo grande prestígio em seus estudos. As expansões destes trabalhos também receberam contribuições de grandes potências mundiais que, apresentam um programa espacial avançado. Pois, tais países buscam compreender os mecanismos da atrofia muscular e como conter esta atrofia em condições de um voo espacial, ou mesmo quando o indivíduo é exposto a uma situação de microgravidade (MUSACCHIA; STEFEN; FELL, 1988).

Como os músculos esqueléticos são altamente adaptados para desempenharem diversas funções como a locomoção, o desenvolvimento de tensão, manutenção da postura e até transdução de energia química em energia mecânica, o entendimento das respostas musculares frente a inúmeras situações, como as imobilizações, se faz necessário através de análises da morfologia muscular que vão desde a embriologia, até os níveis ultra-estrutural e bioquímico (KELLY e RUBINSTEIN 1993).

Com a embriologia, estrutura e ultra-estrutura das fibras musculares bem definidas (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1971; PITSILLIDES, 2006), as variações no

diâmetro das fibras de um músculo estriado esquelético e de suas características dependem de vários fatores, como o músculo considerado, a idade, o sexo, o estado de nutrição, o treinamento físico e a imobilidade (ANSVED, 1995; ITAI, 2004; DE OLIVEIRA, 2007). Estas condições quais as fibras se ajustam para realizarem diversos trabalhos resultam no desenvolvimento de diferentes tipos de fibras musculares com características de expressão genética, propriedades fisiológicas, bioquímicas e morfológicas distintas (KELLY e RUBINSTEIN, 1993).

1.1 Tipos de fibras musculares

Os músculos são compostos por um conjunto heterogêneo de fibras musculares que lhes permitem uma ampla variedade de atividades. Ranvier (1874) apud Mathiesen (2004) descreveu pela primeira vez as fibras vermelhas e brancas e que estas eram morfológicamente diferentes, sendo que os dois tipos de fibras poderiam estar misturados em um único músculo. O autor propôs que, as fibras brancas teriam contração rápida e maior diâmetro, enquanto que, as vermelhas se contraíam lentamente e apresentavam menor diâmetro. Com base em critérios metabólicos algumas fibras deste conjunto foram posteriormente classificadas em oxidativas ou glicolíticas e, considerando-se os critérios fisiológicos, foram ainda admitidas como sendo de contração lenta ou rápida (MATHIESEN, 2004).

Assim, Barnard et al. (1971) afirmaram que, embora as fibras musculares apresentem e exerçam as mesmas funções, estas podem utilizar de vias metabólicas distintas e apresentar diferentes características energéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, o que levou os pesquisadores a proporem diferentes classificações para as mesmas fibras.

Em análise histoquímica Barany (1967) mostrou a correlação entre as isoformas da miosina e a velocidade de contração muscular, análise esta que, conduziu uma divisão das fibras musculares em tipo I (lenta) e tipo II (rápida).

Outro critério utilizado para classificação das fibras musculares baseou-se na estrutura e composição bioquímica das fibras musculares. Fibras do tipo I são ricas em sarcoplasma contendo mioglobina e têm cor vermelho-escura. As fibras do tipo II podem ainda ser divididas nos tipos IIA, IIB e IIC de acordo com suas características estruturais e bioquímicas. As fibras do tipo IIB são as mais rápidas e dependem principalmente, da glicólise como fonte de energia. Fibras do tipo IIC estão presentes em fetos, sendo consideradas fibras indiferenciadas, muito sujeitas a interconversão, são caracterizadas por exibirem maior metabolismo oxidativo do que as fibras do tipo IIA e IIB. Esta classificação das fibras musculares é importante para caracterização das doenças musculares ou miopatias (BROOKE e KAISER, 1970; BROOKE et al., 1971).

Peter et al. (1972) estabeleceram uma classificação das fibras musculares baseada em seu aspecto fisiológico e na atividade metabólica, sendo as SO (*Slow Oxidative*) fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo; as FOG (*Fast Oxidative Glycolytic*) fibras de contração rápida com metabolismo oxidativo e glicolítico, enquanto as fibras de contração rápida com metabolismo glicolítico receberam a classificação de FG (*Fast Glycolytic*).

Ao estudar a velocidade de contração e resistência a fadiga, Burke (1981) elaborou a seguinte classificação: S (*Slow*) fibras de contração lenta. FR (*Fast Resistant*) fibras de contração rápida e resistentes a fadiga. FI (*Fast Intermediate*) fibras de contração rápida e resistência a fadiga intermediária e as verdadeiras fibras

de contração rápida, classificadas como FF (*Fast Fatigable*) fibras de contração rápida com pouca resistência a fadiga.

Em um estudo mais recente Helge et al. (1999) classificaram as fibras em tipo I por possuírem alta capacidade oxidativa, com baixa velocidade de contração e excelente capacidade de utilizar lipídios como combustível. As fibras do tipo IIB como glicolíticas, de contração rápida e com a utilização muito intensa de glicogênio em sua cadeia respiratória. Por fim, as fibras do tipo IIA, consideradas intermediárias, com capacidade oxidativa que pode ser muitas vezes maior do que as fibras do tipo I, além de possuírem capacidade glicolítica que excede em grande porcentagem àquela encontrada no tipo IIB.

Em alguns estudos providos com técnicas de histoquímica e imunohistoquímica como o de Scott et al. (2001), revelam a presença de sete tipos diferentes de fibras musculares no homem, baseada na intensidade de coloração para a ATPase e também na conjugação de anticorpos específicos. Onde foram marcados os tipos de fibras I, IC, IIA, IIB, IIAB, IIC e IIAC.

Em suma, na tabela 1 foram expressas as características gerais em relação à tipificação das fibras musculares.

Tabela 1 – Características gerais relacionadas à classificação dos tipos de fibras musculares.

Características das Fibras	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Velocidade de Contração	Lenta	Rápida a moderada	Rápida
Resistência à fadiga	Alta	Baixa a intermediária	Baixa
Atividade física	Aeróbia	Anaeróbia de longa duração	Anaeróbia de curta duração
Produção de força	Pouca	Intermediária	Alta
Densidade de mitocôndrias	Alta	Moderada a alta	Baixa
Densidade de capilares	Alta	Moderada	Baixa
Capacidade oxidativa	Alta	Alta	Baixa
Capacidade glicolítica	Baixa	Alta	Alta

1.2 Modelos de desuso muscular

Quando da ocorrência de lesões musculares, fraturas ósseas, doenças degenerativas ou articulares, se faz necessário o uso de imobilizadores como aparelho gessado ou órteses ortopédicas (APPELL, 1995). Como o músculo estriado esquelético é um dos tecidos mais adaptáveis do organismo, tal imobilismo pode determinar alterações não somente em sua estrutura e ultra-estrutura, como também no tecido conjuntivo associado. Essas observações conduziram à realização de trabalhos envolvendo diferentes modelos experimentais, com o intuito de avaliar os efeitos da hipoatividade muscular. Desta forma, pesquisas utilizando a imobilização do membro, tenotomia, denervação, secção da medula espinal e privação da descarga de peso nos membros, são alguns dos exemplos utilizados nos experimentos atuais (ANSVED, 1995; SALEM et al., 2001; PICQUET e FALEMPIN, 2003; McDONAGH et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2005).

A fim de ilustrar o fato, pode-se acrescentar a estes últimos os seguintes trabalhos em ordem cronológica que, a partir da década de 1970, foram conduzidos para fornecer dados sobre a ultra-estrutura muscular, os tipos de fibras encontradas nos músculos e suas possíveis alterações, quando expostas a diferentes condições.

Tabary et al. (1972) imobilizaram o membro pélvico de gatos em posição encurtada e alongada durante 4 semanas. Verificaram que os músculos sóleos mantidos em alongamento apresentaram aumento de 20% no número de sarcômeros em série, quando, comparado a músculos livres. Já os músculos imobilizados na posição de encurtamento mostraram uma diminuição de 40% nesses sarcômeros em série, relativamente aos músculos controles.

Em 1973, Booth e Kelso imobilizaram o quadril, o joelho e o tornozelo de ambos os membros pélvicos de ratos por 4 semanas e observaram um decréscimo na porcentagem de fibras oxidativas do músculo sóleo. Verificaram também, um aumento na porcentagem das fibras glicolíticas no mesmo músculo.

Katheleen et al. (1988), fixaram cirurgicamente a articulação têmporo-mandibular de macacos por 5 semanas e não observaram interconversão de fibras nos músculos masseter e temporal.

Relativamente ao tecido conjuntivo, um músculo normal apresenta uma delgada camada de endomísio envolvendo cada fibra muscular; septos mais espessos de perimísio separam grupos de fibras musculares em fascículos, enquanto, o epimísio se une a fáscia muscular para, então, revestir todo o músculo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

A íntima associação entre fibras musculares e o tecido conjuntivo é de suma importância para manter a integridade e função própria do tecido como um todo. No

decorrer de processos patológicos, são as alterações no endomísio e no perimísio que aumentam a deposição de colágeno intramuscular, enquanto, na maioria das vezes, o epimísio permanece inalterado (JÓZSA et al., 1990).

Em um estudo onde foram imobilizados por 1, 2 e 3 semanas os músculos dos membros pélvicos de ratos em posições de tensão e de relaxamento, Józsa et al. (1990) avaliaram o tecido conjuntivo. Descreveram um aumento igual de colágeno tanto no endomísio como no perimísio, dos músculos alongados e encurtados, após uma semana de imobilização. Com 2 semanas de imobilização, verificaram um maior espessamento do endomísio que foi maior ainda, quando o músculo era mantido na posição de encurtamento. Após 3 semanas, no que diz respeito à quantidade de colágeno, os músculos sóleos colocados em posição alongada ultrapassaram os músculos que estavam em encurtamento.

Após imobilizar o músculo tibial anterior de coelhos em posição alongada por 1, 2, 3, 4, e 6 semanas, Pattulo et al. (1992) afirmaram que, em 2 semanas, o número de fibras oxidativas duplicou e que, com 6 semanas, o número dessas fibras era 5 vezes maior.

Em trabalho onde suspenderam ratos pela cauda durante períodos de 1 dia, 2 e 4 semanas para posterior análise do colágeno no músculo sóleo, Miller et al. (2001) afirmaram que as proporções das fibras colágenas do tipo I decrescem, concomitantemente ao aumento das fibras colágenas do tipo III na imobilização por 2 e 4 semanas.

Järvinen et al. (2002) fixaram por 3 semanas a articulação talocrural de ratos em 60° de flexão plantar. Como consequência, detectaram uma pequena quantidade de colágeno tipo I e um aumento considerável no colágeno tipo III no endomísio dos músculos gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior destes animais.

Analisando, através de microscopia eletrônica de varredura, as fibras colágenas no endomísio de um músculo imobilizado em posição encurtada Okita et al. (2004) mostraram que, após 1 e 2 semanas de imobilização, a maioria das fibras colágenas corria paralelamente às fibras musculares. Já nos músculos imobilizados por 4, 8 e 12 semanas, verificaram que a maioria dessas fibras exibia um arranjo circunferencial às fibras musculares.

Itai (2004), após suspender ratos pela cauda por 5 semanas, verificou que existe diminuição no diâmetro da fibra muscular e alterações nas posições dos núcleos das células musculares.

Tanaka, Kariya e Hoshino (2004) utilizando ratos jovens e idosos fixaram cirurgicamente a articulação talocrural e suspenderam os animais pela cauda por 2 semanas. Feita a análise do músculo sóleo apontaram uma queda significativa das fibras musculares do tipo I e um aumento das fibras tipo II, tanto nos animais jovens, quanto nos idosos. Notaram ainda, que não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar os grupos idosos e jovens, no que diz respeito à interconversão dos tipos de fibras.

Pelo até aqui exposto verifica-se a preocupação dos pesquisadores em descrever as alterações musculares em situações onde os músculos são submetidos a alongamento, encurtamento ou simplesmente a hipoatividade, sendo a posição da imobilização um fator determinante nos efeitos deletérios no sistema muscular. Como na prática clínica os trabalhos sobre ortopedia e reabilitação preconizam que as articulações sejam imobilizadas em posições neutras, portanto expondo a musculatura do membro a um imobilismo em posição funcional, sem sofrer alongamento ou encurtamento. Avalia-se na presente pesquisa o perfil morfométrico dos tipos de fibras dos músculos tibial anterior e sóleo submetidos à

imobilização da articulação talocrural por diferentes intervalos de tempo em posição neutra, utilizando-se de uma órtese confeccionada que possibilita a descarga de peso no membro imobilizado, caracterizando-se uma imobilização funcional.

Nos músculos tibial anterior e sóleo de ratos jovens, submetidos à imobilização da articulação talocrural em posição neutra, avaliou-se:

- 1- Qualitativamente, os tipos de fibras musculares, os fusos musculares, o tecido conjuntivo associado e a características das ultra-estruturas;
- 2- Quantitativamente, a morfometria e proporção dos tipos de fibras musculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 26 *Rattus norvegicus* machos da linhagem Wistar, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Estes animais chegaram ao biotério do departamento de Anatomia do ICB com idade de 60 dias foram alojados em gaiolas plásticas de 60x35cm com grade superior de proteção em alumínio. Receberam ração para roedores e água sem restrições, foram submetidos a ciclo foto periódico claro e escuro controlado de 12 horas, sob temperatura constante de 21 °C. Após completar 90 dias de vida foram pesados e identificados para o início do experimento.

3.2 Confeção da órtese metálica imobilizadora

Um rato com 12 semanas de idade foi utilizado para essa preparação. Para tanto, o mesmo foi anestesiado com anestésico dissociativo¹ por via intramuscular e teve o seu membro pélvico esquerdo tricotomizado. O membro foi, então, fixado em posição funcional, obtendo-se inicialmente um molde em silicona² que foi preenchido com resina acrílica ortodôntica³, resultando numa réplica fiel do membro do animal (Figura 1A).

Em seguida foi esculpida uma órtese ortopédica, também em resina acrílica³, em torno da articulação talocrural que foi incluída em silicona², a fim de se obter um molde da mesma (Figuras 1B-D). O molde assim obtido foi preenchido com metal de Wood⁴ (uma liga com ponto de fusão em torno de 60 °C, contendo 50% de bismuto,

¹ Zoletil®, Vibrac, 1ml/Kg, França.

² Optosil®, Heraeus Kulzer, Alemanha.

³ Orto-class®, Classico, Brasil.

⁴ Woods®, Goodfellow, EUA.

25%de chumbo, 12.5% estanho e 12.5% cádmio), formando-se a órtese metálica imobilizadora (Figuras 1E, F).

Figura 1 – Fases do processo de confecção das órteses. A- Molde do membro em resina. B e C- Escultura da órtese imobilizadora. D- Molde da órtese em silicone. E e F- Preenchimento do molde com metal de Wood. (Escala 3 cm).

3.3 Formação dos grupos

Para as diferentes avaliações estruturais e ultra-estruturais dos músculos sóleo e tibial anterior, foram formados grupos experimentais, de acordo com o tempo de imobilização. Desta forma, utilizando-se animais com 90 dias de idade e imobilizando-se o membro pélvico esquerdo, constituiu-se os grupos experimentais imobilizados **G1i** – com 2 semanas de imobilização e **G2i** - com 4 semanas de imobilização; os membros pélvicos direitos desses animais, portanto sem imobilização, formaram os grupos experimentais contralaterais **G1c** e **G2c**. Animais sem nenhum tipo de restrição ao movimento tiveram os membros pélvicos esquerdos utilizados como controle e sofreram eutanásia nos períodos correspondentes aos dos grupos G1 e G2 constituindo-se, assim, os grupos **C1** e **C2**.

O número de animais, bem como o de músculos utilizados em cada grupo estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos animais nos grupos e músculos utilizados de acordo com o período de imobilização.

Grupos	Membro utilizado	Número de músculos
G1 – 5 Animais imobilizados por 2 semanas	G1i – Membro imobilizado	5 sóleos 5 tibiais anteriores
	G1c – Membro contralateral	5 sóleos 5 tibiais anteriores
G2 – 5 Animais imobilizados por 4 semanas	G2i – Membro imobilizado	5 sóleos 5 tibiais anteriores
	G2c – Membro contralateral	5 sóleos 5 tibiais anteriores
C1 – 5 Animais controles de G1	-----	5 sóleos 5 tibiais anteriores
C2 – 5 Animais controles de G2	-----	5 sóleos 5 tibiais anteriores

3.4 Processo de imobilização

Os animais foram previamente anestesiados⁵ via intramuscular. Por seguinte a órtese confeccionada, foi fixada nos membros pélvicos esquerdos dos animais dos grupos **G1** e **G2**, através de fios ortodônticos que envolviam a órtese em sua extremidade proximal e distal, mantendo a articulação talocrural com uma angulação de aproximadamente 100° (Figura 2). Previamente, a órtese recebeu um acolchoamento interno para se evitar lesões na pele do animal.

Figura 2 – Mensuração do ângulo de imobilização. A partir da articulação talocrural foi traçada uma linha acompanhando a diáfise da tíbia e outra na direção da cabeça do metatarso.

3.5 Obtenção dos músculos tibial anterior e sóleo

Os animais de todos os grupos (**G1**, **G2**, **C1** e **C2**) foram submetidos à eutanásia com dose excessiva do anestésico⁵. Em seguida foram dissecados os membros pélvicos coletando-se os músculos tibial anterior e sóleo sendo cada músculo seccionado transversalmente nos terços proximal, distal de maneira eqüitativa. A parte média resultante destes cortes foi preparada por criofixação em nitrogênio líquido. Este procedimento consistiu inicialmente, no posicionamento dos espécimes em uma superfície de cortiça e em seguida, na inclusão dos mesmos em

⁵ Zoletil®, Vibrac, 1ml/Kg, França.

cola biológica⁶ e envolvimento em talco neutro⁷ para se evitar possíveis artefatos de congelamento. As peças assim obtidas foram armazenadas em um *freezer* -80 °C⁸ até o período de processamento do material.

A seguir, para o processamento do material, as peças foram colocadas em um criostato⁹ com câmara mantida a -25 °C por 30 minutos para a adaptação do tecido e submetido a cortes de 10 µm de espessura, que foram colocados em lâminas histológicas.

3.6 Procedimentos histológicos

A fim de se evidenciar as fibras e os núcleos musculares, os cortes foram corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (BEHMER et al., 1975), para as fibras colágenas, pelo método do Picro-Sírius (JUNQUEIRA et al., 1979) e analisados sob luz polarizada.

3.7 Procedimentos histoquímicos

A tipificação das fibras musculares foi realizada de acordo com as técnicas da NADH-tr e ATPase (esta, com pré-incubação em pH de 4.3, 4.6 e 9.4) preconizadas por Brooke e Kaiser (1970) e Barnárd et al. (1971).

⁶ Tissue freezing medium®, Jung, EUA.

⁷ Synth T1001.06.AH, Brasil.

⁸ Thermo Forma®, Laboratório Multiusuário do Departamento de Anatomia do ICB/USP.

⁹ Leica CM 1850, Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e Cirurgia ICB/USP.

3.7.1 NADH-tr (tetrazolim redutase)

As lâminas foram pré-incubadas durante 40 minutos a 37°C em uma solução contendo Tampão Tris (0,2M; pH 7,4), 5mg de NBT (*Nitro Blue Tetrazolim*) e 12,5 mg de NADH-tr (*Nicotinamide adenine di-nucleotide - reduced form*) e, em seguida, imersas em uma seqüência de acetona (60°, 90° e 60°), álcool (70°, 85°, 90°, absoluto^{1 e 2}), diafanizadas em xilol e montadas em gelatina-glicina.

A enzima NADH-tr é encontrada nas regiões intermiofibrilares, nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático. Tal enzima reflete a utilização de metabólitos do Ciclo de Krebs da cadeia respiratória e é responsável por transferir elétrons (hidrogênio) de um substrato para um receptor com o auxílio de uma co-enzima que a seguir é reduzida. O receptor é então oxidado por uma *diaforase* e o elétron de transferência captado por um *formazan* (NBT) que se reduz, torna-se insolúvel, precipita-se e origina a cor azulada (DUBOWITZ; BROOKE, 1973). De acordo com a atividade mitocondrial, as fibras glicolíticas (também chamadas de fibras brancas, de contração rápida ou do tipo IIB) são coradas fracamente enquanto que as oxidativas (fibras vermelhas, de contração lenta ou tipo I) são fortemente coradas. Com a coloração intermediária as fibras glicolíticas e oxidativas (fibras intermediárias, tipo IIA e IIC), são evidenciadas (DE OLIVEIRA, 2007).

3.7.2 Adenosina Trifosfatase - ATPase

Os cortes obtidos para a reação de ATPase com pH 9,4 foram pré-incubados por 10 minutos em temperatura ambiente em uma solução com pH 9,4 contendo 50ml de Tampão Glicina/NaCl (0,1 M), 10 ml de CaCl₂ (0,75M e 22ml de NaOH (0,1M).

Após a pré-incubação, os cortes foram lavados em água destilada, secos e incubados durante 40 minutos a 37 °C em uma solução contendo 10 ml de CaCl_2 (0,75M; pH 9,4) 10 mg de *Adenosine 5' Triphosphate*¹⁰ (ATP) e 31 mg de *Dithiotheitol*¹¹.

A seguir, as lâminas foram lavadas com água destilada, secas e novamente incubadas, durante 5 minutos, com CaCl_2 2%. Após nova lavagem e posterior secagem, os cortes foram cobertos com solução de Sulfeto de Amônia¹² diluída (1:10), por 30 segundos, lavados, desidratados em séries crescente de alcoóis, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan¹³.

Para as reações da ATPase com variação de a pH 4,6 e 4,3 foi realizada uma pré-incubação em uma solução de 100ml de Acetato de Sódio (0,1M) contendo 0,31 g de EDTA com os respectivos pHs. As etapas subseqüentes relativas à incubação serão as mesmas descritas para incubação da reação ATPase 9,4.

As ATPases são encontradas nas miofibrilas, mais especificamente na Banda A da miosina e são enzimas responsáveis por separar o fosfato terminal do ATP, que se combina com o cálcio da solução, formando fosfato de cálcio que é insolúvel e se precipita no local da reação. O fosfato de cálcio é então tratado com CaCl_2 , que após a reação com sulfeto de amônia torna-se visível com a cor marrom, a qual reflete a presença da enzima no local (DUBOWITZ; BROOK, 1973). As fibras do tipo I, por possuírem menor reação, ficam mais claras do que as do tipo II quando a reação é realizada com pH 9,4. Quando pré-incubadas com pH 4,6, as fibras do tipo I apresentam maior reação, ficando mais escuras que as demais. As fibras do tipo IIB são as mais claras e as fibras do IIA apresentam marcação intermediária. Se pré-

¹⁰ Sigma A7699, Alemanha.

¹¹ Sigma D0632, Alemanha.

¹² Merck K31774642 346, Alemanha.

¹³ Merck B 540325, Alemanha.

incubadas em pH 4,3, as fibras do tipo I têm maior reação e as do tipo II C um grau intermediário e as do tipo IIB quase nenhuma atividade (OLIVEIRA, 2007).

A tabela 3 representa a intensidade das reações para as técnicas histoquímicas da ATPase miofibrilar e NADH-tr.

Tabela 3 – Marcação das reações histoquímicas.

	Tipo de Fibras		
	I	IIA	IIB
ATPase pH 9,4
ATPase pH 4,6
ATPase pH 4,3
NADH-tr

3.8 Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a microscopia eletrônica de transmissão foram perfundidos 3 animais do grupo G1 e G2. Após o período experimental os animais foram anestesiados⁵ e toracotomizados, removendo-se a parede esternal para a exposição do coração. O átrio direito foi seccionado para que se procedesse à infusão de solução salina 9% na quantidade de 1000 ml no ventrículo esquerdo. Terminada a infusão de solução salina, a aorta abdominal foi dissecada e canulada para a infusão da solução fixadora de Karnovsky modificada (1% paraformaldeído e 3% glutaraldeído em 0,07

M de tampão cacodilato¹⁴, pH 7,4). Em seguida foram dissecados os músculos tibial anterior e sóleo dos membros imobilizados e contralaterais, retirou-se fragmentos com aproximadamente 2mm³, dos terços médios dos músculos. Estes espécimes foram fixados, por 2 horas em temperatura ambiente, na solução modificada de Karnovsky e em seguida, lavados algumas vezes em 0,1 M de tampão cacodilato¹⁴ pH 7,3 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no tampão cacodilato durante 2 horas na temperatura ambiente.

Após lavagem em tampão cacodilato, os espécimes receberam tratamento com acetato de uranila, ficando imersos nesta solução por 12h. Procedeu-se então, a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (60 a 100%) e três passagens, de 15 minutos em óxido de propileno puro¹⁵. Os espécimes foram então infiltrados por resina Epóxi¹⁶ + óxido de propileno (1:1) durante 4 horas e incluídos em resina pura, permanecendo em estufa (60 °C), durante cinco dias.

Os blocos assim obtidos foram trimados para a realização dos cortes semifinos (1 µm de espessura) que foram corados pelo método de azul de toluidina para a verificação da integridade do material. Posteriormente, realizou-se cortes ultrafinos, que foram colhidos em telas apropriadas (200 mesh) e contra-corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REINOLDS, 1963).

¹⁴ Electron Microscopy Sciences 12310, EUA.

¹⁵ Electron Microscopy Sciences 17980, EUA.

¹⁶ Sigma, Alemanha.

3.9 Morfometria

3.9.1 Área das secções transversas dos músculos

Para se determinar a média das secções transversas, utilizou-se 5 cortes escolhidos aleatoriamente dentre os 25 cortes de cada músculo estudado. A aquisição das imagens dos cortes foi feita através de uma lupa estereoscópica¹⁷, com uma câmera fotográfica digital¹⁸ acoplada. O processamento das imagens realizou-se em equipamento de imagem computadorizada¹⁹. A área de secção transversa, em mm^2 , foi obtida circundando-se os cortes aleatoriamente selecionados, com o cursor do *mouse* (Figura 3).

Figura 3 – Programa de aquisição de imagens. Imagem capturada a partir da lupa estereoscópica. Medida da área de secção transversa do músculo sóleo.

¹⁷ Stemi® SV6, Carl Zeiss, Alemanha.

¹⁸ Power shot® A640, Canon, China.

¹⁹ Axionvision Rel® 4.6, Carl Zeiss, Alemanha.

3.9.2 Área do perfil das fibras musculares do tipo I, IIA e IIB

Foram escolhidas 10 fibras do tipo I e 10 fibras do tipo II em cada um dos músculos experimentados, para determinar a área do perfil das fibras do músculo sóleo. Assim, avaliou-se um total de 100 fibras musculares nos grupos C1 e C2, pois esses tais grupos continham músculos de 1 membro do animal. Todavia, 200 fibras nos grupos G1 e G2 foram avaliadas, portanto esses grupos contavam com os músculos contralaterais à imobilização. Para o músculo sóleo, a quantificação foi realizada em lâminas reativas à ATPase miofibrilar pH 9,4, uma vez que este músculo só apresentava fibras do tipo I e IIB em sua morfologia.

Entretanto, no músculo tibial anterior, procedeu-se a mensuração através dos cortes corados na reação de ATPase miofibrilar 4,6, que permitiu a diferenciação dos 3 tipos de fibras. Neste músculo, foram avaliadas 50 fibras de cada tipo (I, IIA e IIB), totalizando 150 fibras em cada grupo C1 e C2. Para a análise dos grupos G1 e G2, foi quantificado um total de 300 fibras em cada grupo, pois nestes grupos estavam incluídos os músculos tibiais anteriores dos membros imobilizados e contralaterais às órteses.

Para capturar as imagens e determinar a área das fibras em μm^2 , utilizou-se o mesmo equipamento de imagem computadorizado descrito no item anterior¹⁹ acoplado a um microscópio binocular²⁰ com objetiva de 40x (Figura 4).

²⁰ Axionscope® 40, Carl Zeiss, Alemanha.

Figura 4 – Programa de aquisição de imagens. Imagem capturada no microscópio binocular com objetiva de 40x. Medida da área de secção transversa das fibras do tipo I, IIA e IIB no músculo tibial anterior.

3.10 Estereologia

3.10.1 Densidade das fibras musculares nas áreas de secção transversa

A densidade total e das fibras musculares dos tipos I, IIA e IIB foi obtida utilizando-se três cortes escolhidos aleatoriamente, em cada músculo tibial anterior e sóleo.

Para a análise da densidade das fibras no músculo tibial anterior, estabeleceu-se uma diferenciação de regiões, pois este músculo não apresentava distribuição homogênea das suas fibras. Sendo assim, estipulou-se uma região superficial onde estava presente maior quantidade de fibras do tipo II e uma região

profunda, na qual se concentrava uma variada quantidade de todos os tipos de fibra (Figura 5).

Figura 5 – Tipificação das fibras do Músculo Tibial Anterior pela reação de NADH-tr. Representação das diferenciadas regiões para a quantificação das densidades. **S**- região superficial e **P**- região profunda.

Após a obtenção, em pequeno aumento, de 4 imagens para o músculo sóleo e 2 imagens para cada região específica do músculo tibial anterior, foi colocado um sistema teste quadriculado sobre a tela do computador, cobrindo todo o corte visualizado na tela. Marcou-se então, os campos eqüidistantes do sistema teste e, com o auxílio de um micrometro objeto, calculou-se a área de cada campo eqüidistante deste sistema analisado, tendo como resultado $0,068\mu\text{m}^2$ (Figura 6A).

Em seguida, de acordo com Mandarin-de-Lacerda (1995), identificou-se os diferentes tipos de fibras que estavam dentro dos campos apropriados para a contagem, adotando-se nos mesmos, 2 linhas permitidas para contagem e 2 linhas proibidas, com o intuito de se desprezar as fibras que tocavam o sistema (Figura 6B).

Figura 6 – Sistema teste sobre a reação de ATPase pH 4,6. A - Campos do sistema teste próprios para contagem da densidade das fibras musculares. **B -** Campo de $0,068\mu\text{m}^2$ em maior aumento, com a contagem dos diferentes tipos de fibras. As linhas vermelhas representam a parte do campo onde foi proibida a contagem das fibras que a tocavam. As fibras do tipo I, IIA e IIB foram representadas com as letras I, A e B respectivamente.

3.11 Tratamento estatístico

Para a determinação da área de secção transversa do músculo (mm^2), área do perfil das fibras (μm^2), densidade total e dos tipos de fibras (n° de fibras/ mm^2) dos músculos nos diferentes grupos e períodos experimentais, empregou-se a análise de variância (ANOVA) com dois fatores. Em seguida para uma maior sensibilidade da amostra, entre os músculos submetidos à imobilização e contralaterais, foi feita a análise de variância com medidas repetidas, uma vez que estes músculos eram adquiridos do mesmo animal. O nível de significância adotado foi de 1984).

4.1 Análise qualitativa

4.1.1 Histologia

Através da análise histológica dos cortes corados com a técnica da Hematoxilina e Eosina, foram observadas algumas diferenças, relativas aos músculos pertencentes aos grupos imobilizados por 2 e 4 semanas. Ao se avaliar as fibras dos músculos controles, notou-se que estas apresentaram contornos diversos e núcleos bem evidentes corados em azul, situados na periferia da célula (Figura 7A e B). Enquanto nos músculos imobilizados por 2 semanas, os fascículos e contornos das células musculares aparentemente não sofreram alterações; todavia, uma maior quantidade de núcleos foi observada na periferia destas células. Ainda nestes animais, algumas células ressaltaram núcleos localizados em meio ao sarcoplasma, isto é, na parte central da fibra muscular, sugerindo regeneração celular (Figura 7C e D).

Durante o período em que os músculos sóleos permaneceram imobilizados por 4 semanas, registrou-se que a quantidade de núcleos continuou a aumentar, e além disso, detectou-se a formação de algumas lojas encapsuladas em meio aos fascículos e fibras musculares. Notou-se, ainda, a presença de fibras musculares com aparente diminuição discrepante do seu diâmetro (Figura 7E e F).

Figura 7 – Fotomicrografias de cortes transversais de músculos sóleos do grupo controle (A e B), imobilizados por 2 semanas (C e D) e imobilizados por 4 semanas (E e F) corados pela técnica de H-E. A – Fibras bem organizadas dentro dos fascículos musculares sem aparentes alterações. B – Células contendo aspectos diversos e com núcleos situados na periferia (setas). C – Após 2 semanas de imobilização foi encontrado a presença de núcleo centralizado (seta) e aumento na quantidade de núcleos. D – Disposição do núcleo em meio ao sarcoplasma. E – Presença de lojas encapsuladas entre os fascículos e fibras musculares (seta). F – Fibra apresentando grande discrepância de tamanho (cabeça de seta). Células alongadas com grande concentração de núcleos periféricos (setas menores).

Em relação aos músculos tibiais anteriores, a imobilização também sugeriu uma deformação da estrutura muscular (Figura 8D, E, G e H). Assim, no período de 4 semanas observou-se, não somente a migração de alguns núcleos (Figura 8E), como também alterações da morfologia das fibras (Figura 8E,G) e dos fusos neuromusculares (Figura 8 D,H).

As fibras intrafusais foram encontradas no interior dos fusos neuromusculares, com diâmetro menor do que aquelas constituintes das fibras musculares esqueléticas e agrupadas entre si, por uma cápsula fibrosa, verificando-se uma nítida delimitação entre este envoltório e as fibras (Figura 8 B e F). Na fase de imobilização por 4 semanas, a cápsula do fuso estava mais espessada, promovendo um maior adensamento das fibras intrafusais.

Figura 8 – Fotomicrografias de cortes transversais de músculos tibiais anteriores do grupo controle (A, B, C e F) e imobilizados por 4 semanas (D, E, G e H). A – Músculo tibial anterior de morfologia normal, apresentando fibras heterogêneas em tamanho (setas). B e F – Fuso neuromuscular com fibras intrafusais (seta menor), apresentando espaçamento entre fibras e cápsula do fuso (seta). C – Característica do contorno das fibras de maior e menor diâmetro no músculo tibial anterior (setas). D e H – Fusos neuromusculares apresentando maior quantidade de núcleos, diminuição do espessamento entre as fibras e cápsula, além do espessamento capsular (seta). E – Fibra com núcleo centralizado (seta maior), existência de 2 fibras com a morfologia totalmente alterada (setas menores). G – Fibras musculares arredondadas (-) entre fibras com rudes alterações em seu formato (setas claras). Tecido indefinido contendo estruturas semelhantes a núcleos celulares (seta escura). (A-D,E,G – H.E.; F, H – Picro-Sírius).

Na análise qualitativa do tecido conjuntivo associado às fibras musculares realizada em cortes submetidos à técnica de coloração pelo Picro-Sírius sob luz polarizada (Figura 9), os músculos controles exibiram na constituição do esqueleto fibroso, fibras colágenas tipo I e tipo III. As primeiras, exibindo uma coloração variando entre amarelo, laranja e vermelho e as do tipo III com coloração verde.

Com essa técnica, detectaram-se diferenças importantes nos animais imobilizados, nos dois períodos experimentais. Desta forma, nos músculos imobilizados por 2 semanas, foi nítido o espessamento do perimísio, constituído, principalmente, por uma maior quantidade de fibras colágenas tipo I, comparativamente aos animais controle.

Esta deposição de colágeno tipo I foi ainda maior nos animais imobilizados por 4 semanas, infiltrando-se no endomísio dos músculos, caracterizando uma fibrose deste arcabouço conjuntivo.

Figura 9 – Fotomicrografias de cortes transversais de músculos tibiais anteriores do grupo controle (A e B), imobilizados por 2 (C e D) e 4 semanas (E e F) submetidos a coloração de Picro-Sírius. A e B – Músculo apresentando a morfologia do tecido conjuntivo sem alterações. Fibras agrupadas em fascículos (*) e delimitadas por perimísio (seta). C e D – Aumento da deposição de colágeno no perimísio do músculo (setas), fascículo (*). E – Aumento de deposição de colágenos no endomísio (setas). F – Fibras colágenas do tipo I entre os fascículos (seta maior) e fibras musculares (setas). (B, D e F sob luz polarizada)

4.1.2 Histoquímica

4.1.2.1 Reação da NADH-tr

Pela análise dos cortes corados com a técnica da NADH-TR dos músculos sóleo (Figura 10A) e tibial anterior (Figura 10B e C) evidenciou-se que a diferenciação das fibras musculares em glicolíticas, oxidativas e intermediárias só existiu no músculo tibial anterior.

No músculo tibial anterior imobilizado por 4 semanas (Figura 10D), observou-se uma redução do diâmetro das fibras glicolíticas e maior concentração das fibras oxidativas ao se comparar com os animais controles.

Fusos neuromusculares também foram bem definidos com esta reação. Diferentes diâmetros e intensidades de coloração foram evidenciados, tanto nos animais controles como imobilizados (Figura 10E e F).

Assim, as fibras com bolsa nuclear (chamadas de *bag2*), aquelas que não apresentam a propriedade da contratilidade, ficaram fracamente reativas e foram evidenciadas como as de maior diâmetro dentre as fibras intrafusais; tanto nos músculos controles como nos imobilizados (Figura 10E e F). No entanto as fibras com bolsa nuclear chamadas de *bag1*, em número de duas e com diâmetro intermediário, exibiram reatividade moderada. As fibras com *cadeia nuclear*, caracterizadas pela contratilidade, foram identificadas como tendo o menor diâmetro e a reatividade mais intensa entre todas as fibras constituintes do fuso (Figura 10E e F).

Figura 10 – Fotomicrografias de cortes transversais do músculo tibial anterior e sóleo submetidos à reação da NADH-tr. A – Músculo sóleo controle não apresentando distinção dos tipos de fibras. B – Músculo tibial anterior controle apresentando distinção entre as fibras oxidativas (seta preta), glicolíticas (cabeça de seta) e intermediárias (setas branca). C – Região profunda do músculo tibial anterior controle. D – Região profunda do músculo tibial anterior imobilizado por 4 semanas. E – Fuso neuromuscular de músculo controle. Fibras com bolsa nuclear *bag 2* (seta branca). Fibras com cadeia nuclear (seta preta) e fibras com bolsa nuclear *bag 1* (cabeça de seta). F – Fuso neuromuscular de animal imobilizado, apresentando os mesmo componentes, porém arranjados mais densamente.

4.1.2.2 Reação da ATPase miosínica

A figura 11A e B representa as marcações da ATPase no músculo sóleo, em diferentes pHs.

Com a reação da ATPase (pH 9,4) que evidencia fortemente as fibras musculares do tipo II, foi possível observar que, nos músculos controles, essas fibras apareceram em menor quantidade quando se comparou com os músculos imobilizados por 2 semanas (Figura 11C), onde foi nítida uma maior quantidade das mesmas. Nos animais imobilizados por 4 semanas, reparou-se que estas fibras estavam presentes em menor quantidade e com características atípicas, isto é, menores e com contorno irregular (Figura 11D).

Nos fusos musculares distinguiu-se de 3 a 5 fibras intrafusais, sendo que as de *cadeia nuclear* exibiram marcação de intensidade intermediária. Dentre aquelas que não apresentaram a propriedade da contratilidade, fibras com bolsas nucleares *bag1* e *bag2*, apresentaram reação intensa (Figura 11E e F).

Figura 11 – Fotomicrografias do músculo sóleo submetido à reação histoquímica da ATPase.

A e B – Músculo sóleo controle apresentando fibras do tipo I em maior quantidade que as fibras do tipo II (seta). **C** – Músculo imobilizado por 2 semanas apontando maior quantidade de fibras tipo II. **D** – Músculo sóleo imobilizado por 4 semanas com menor quantidade e alterações na morfologia das fibras tipo II (setas). **E** – Fuso neuromuscular de músculo controle conferindo marcação mais intensa e maior diâmetro da fibra com bolsa nuclear *bag 2*(seta) **F** – Fuso neuromuscular de animal submetido a 4 semanas de imobilização, marcação mais intensa e maior diâmetro da fibra com bolsa nuclear *bag 2*(seta). (**A, C, D, E e F** - ATPase 9,4; **B** - ATPase 4,3).

A figura 12 ilustra as reações da ATPase com seus diferentes pHs, no músculo tibial anterior dos grupos controle (A, C e E) e imobilizados por 2 semanas (B, D e F). Assim, verificou-se que, com pré-incubação em pH 9,4, as fibras musculares do tipo I foram pouco reativas, isto é, fracamente coradas, enquanto as fibras musculares do tipo II (IIA e IIB) apresentaram uma reação intensa (Figura 12A). Após 2 semanas de imobilização, notou-se que as fibras do tipo I apresentaram com maiores diâmetros e quantidade neste campo (Figura 12B).

Na pré-incubação com pH 4,6 (Figura 12C) as fibras do tipo I, intensamente reativas, exibiram menor diâmetro. As fibras do tipo IIA apresentaram intensidade de reação intermediária, enquanto que as fibras do tipo IIB foram às menos intensamente reativas, porém, com o maior diâmetro dentre os outros tipos de fibras. Ao promover a imobilização do músculo por 2 semanas, detectou-se que um ligeiro aumento das fibras do tipo I, à medida que as fibras do tipo IIB se atrofiavam (Figura 12C).

A reação da ATPase miosínica em pH 4,3 (Figura 12E e F) apresentou marcação inversa daquela observada com pH 9,4, ou seja, os mesmos resultados já analisados nas figuras 12A e B, porém com uma marcação inversa na coloração das fibras.

Figura 12 – Fotomicrografias da reação histoquímica da ATPase na região profunda do músculo tibial anterior nos grupos controle (A, C e E) e imobilizados por 2 semanas (B, D e F). A – ATPase pH 9,4 com fibras do tipo I apresentando coloração clara e tipo II, escura. B – Fibras do tipo I com aumento da densidade e diâmetro comparado aos músculos controles. C – Diferenciação das fibras tipo I (seta grande), tipo IIA (seta preta) e tipo IIB (seta branca) com a ATPase pH 4,6. D – ATPase pH 4,6 mostrando fibras do tipo I com área de secção transversa aumentada e fibras do tipo IIB atrofiadas. E e F – ATPase pH 4,3 apresentando os mesmos resultados da reação conduzida em pH 9,4, porém com coloração inversa.

Na figura 13 foram demonstradas as reações histoquímicas da região superficial do músculo tibial anterior.

Nos músculos controle, verificou-se uma grande quantidade de fibras do tipo IIB e uma menor fração de fibras do tipo IIA (Figura 13A e B).

Com a imobilização, ocorreram indicações de uma interconversão de fibras (Figura 13 C e D), pois detectou-se a presença de fibras do tipo I e maior quantidade de fibras do tipo IIA. Este fato foi nitidamente diferente daquele ocorrido nos animais controle, que exibiram pouca quantidade de fibras do tipo IIA (Figura 13C)

Como confirmado na análise das lâminas coradas com a técnica de H-E, algumas fibras apresentaram contornos bem atípicos de uma fibra muscular, que sob a técnica da ATPase pH 4,6, mostraram-se exclusivas das fibras do tipo IIB (figura 13C e D).

Figura 13 – Fotomicrografias da região superficial do músculo tibial anterior nos grupos controle (A e B) e imobilizados por 4 semanas (C e D) submetidos à técnicas histoquímicas. A – Músculo controle mostrando poucas fibras do tipo IIA (seta) na região. B – NADH-tr representando maior quantidade de fibras glicolíticas (tipo IIB) e poucas fibras intermediárias, equivalentes as fibras tipo IIA (seta) nesta região. C – Músculo imobilizado com aumento de concentração de fibra do tipo IIA (seta preta) e deformação das fibras do tipo IIB (seta branca). D – Presença de fibras tipo I na região superficial (cabeça de seta), fibras do tipo IIB deformadas (seta branca) e aspecto arredondado das fibras do tipo IIA (seta preta). (A,C,D – ATPase 4,6).

4.1.3 Ultra-estrutura

4.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os músculos sóleos dos animais do grupo controle evidenciaram, em sua ultra-estrutura, morfologia bem definida. Assim, verificou-se o alinhamento das estriações miofibrilares e linha Z, bem como a presença dos núcleos das células musculares próximos à lâmina basal e internamente ao sarcolema. As mitocôndrias estavam presentes com disposição regular e com características de normalidade em sua morfologia, sendo evidentes as cristas mitocondriais bem preservadas (Figura 14).

No músculo sóleo dos animais imobilizados de 4 semanas, células satélites em processo de alongamento, sinalizando potencial migratório em direção a focos de degeneração muscular foram detectadas. Os núcleos das células musculares apresentaram heterocromatina densa, assim como um intenso franzimento em seu contorno. Um maior espaçamento entre as miofibrilas foi verificado nesse grupo, sendo este espaço preenchido por mitocôndrias híidas, aparentemente maiores que a dos animais do grupo controle (Figura 14).

Figura 14 – Eletromicrografia de músculos sóleos do grupo controle (A, C, E) e imobilizados por 4 semanas (B, D, F). A – Presença de fibrilas colágenas de disposição transversal (●) e longitudinal (▼) no endomísio. Sarcolema envolvendo a fibra muscular (seta pequena). Estrutura semelhante a célula satélite, disposta fora do sarcolema (seta grande). B – Célula satélite em processo de alongamento (seta). C – Núcleo de célula muscular (n), disposto abaixo do sarcolema (seta). D – Núcleo de célula muscular (n), com nucléolo bem definido (seta pequena) e apresentando várias invaginações (seta grande). E – Espaço intermiofibrilar ({) contendo organelas sarcoplasmáticas, destacando-se as mitocôndrias (seta). F – Representação de mitocôndria (seta) e espaço intermiofibrilar ({) aumentado. (A, E, F – 30.000x; B – 7.500x; C – 40.000x e E – 12.000x).

No músculo tibial anterior, dos animais submetidos à imobilização por 2 semanas, detectou-se o desalinhamento nas linhas Z e aumento das estruturas do sarcolema entre as miofibrilas. No grupo imobilizado por 4 semanas, notou-se aumento de estruturas como o retículo sarcoplasmático nas proximidades da banda I; além disso, verificou-se alguns espaços *eletronlucentes* contendo alguns grânulos de glicogênio no interior da estrutura amorfa. Outra característica para esse grupo foi o aumento das mitocôndrias no interior do sarcoplasma entre as miofibrilas e a destruição das linhas Z, caracterizada pela presença de vacúolos (Figura 15).

Figura 15 – Eletromicrografia de músculos Tibial anterior do grupo controle (A) e imobilizados por 2 (B) e 4 semanas (C, D). A – Músculo exibindo linhas Z bem alinhadas em meio à banda I. B – Desalinhamento das linhas Z (setas). C – Espaço *eletronlucente* (seta grande) contendo alguns grânulos de glicogênio (seta pequena). Retículo sarcoplasmático (RS) alterado sobre a banda I. D – Imobilização provocando destruição das linhas Z (seta) e aumentos das estruturas sarcoplasmáticas entre as bandas I (}). (A - D – 30.000x).

4.2 Análise Quantitativa

Os resultados a seguir foram expressos em tabelas com a média $\pm$ desvio padrão e em figuras demonstrativas dos gráficos com cada uma das variáveis estudada.

4.2.1 Peso dos animais

Com os dados da tabela 4 verificou-se que os animais imobilizados por 2 semanas não sofreram alterações significantes no decorrer do período experimental; entretanto, aqueles animais que tiveram os membros pélvicos imobilizados por 4 semanas sustentaram uma tendência a perda de peso quando comparado aos animais controles, mas sem significância estatística (Figura 16).

Tabela 4 – Média e desvio padrão do peso dos animais em gramas.

Peso	Controle	Imobilizado
2 Semanas	315,07 $\pm$ 21,26	313,37 $\pm$ 25,89
4 Semanas	351,67 $\pm$ 15,82	320,29 $\pm$ 27,54

Figura 16 – Gráfico da média e desvio padrão do peso dos animais no final do período experimental de 2 e 4 semanas.

4.2.2 Área de Secção Transversa (AST)

4.2.2.1 AST do Músculo Sóleo

O resultado das secções transversas dos músculos sóleos nos períodos de 2 e 4 semanas foram expressos na tabela 5.

Tabela 5 – Média e desvio padrão da Área de Secção Transversa (AST) em mm² do músculo Sóleo.

AST – Sóleo	Controle	Imobilizado	Contralateral
2 Semanas	7,38±1,76	7,96±1,68	8,65±1,36
4 Semanas	11,11±1,37	8,28±1,32	11,14±0,83

Foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) nos músculos sóleos submetidos à imobilização por 4 semanas. Estes obtiveram uma redução da área de

secção transversa quando comparado aos grupos controle e contralateral (Figura 17).

Além disso, os músculos controles e contralaterais de 2 e 4 semanas se comportaram de modo diferente, uma vez que os animais estudados no final da segunda semana de experimento tinham idade de 104 dias e os animais que compunham o grupo experimental de 4 semanas foram submetidos à eutanásia com idade de 118 dias. Portanto, os músculos sóleos do grupo experimental de 4 semanas nas condições de controle e contralateral apresentaram AST maior ($p < 0,05$) quando comparados aos mesmos grupos com período experimental de 2 semanas (Figura 17).

Figura 17 – Gráfico da média e desvio padrão da **AST** (mm²) do músculo Sóleo no período experimental de 2 e 4 semanas.

4.2.2.2 AST do Músculo Tibial Anterior

Foram expressos na tabela 6, os resultados das áreas de secção transversa do músculo Tibial anterior durante o período de 2 e 4 semanas de estudo.

Tabela 6 – Média e desvio padrão da Área de Secção Transversa (AST), em mm², do músculo Tibial Anterior.

AST - Tibial Anterior	Controle	Imobilizado	Contralateral
2 Semanas	34,25±0,82	32,64±3,47	42,22±6,16
4 Semanas	48,06±6,02	36,57±2,44	42,97±4,07

No músculo tibial anterior, observou-se diferenças significativas entre os animais controles de 2 e 4 semanas ($p < 0,05$), como verificado nos músculos tibiais anteriores, a AST dos animais controles de 2 semanas foram menores que os de 4 semanas (Figura 18).

Entre os grupos controle e contralateral de 2 semanas, existiu uma tendência de aumento na AST do músculo tibial anterior contralateral ($0,05 < p < 0,10$). Pela análise da figura 16 verifica-se que a imobilização reduziu significativamente ($p < 0,05$) a AST dos músculos tibiais anteriores quando comparado aos controles e contralaterais de 4 semanas. Além disso, ocorreu diminuição significativa ($p < 0,05$) dos músculos imobilizados por 2 semanas, quando comparado aos músculos contralaterais de mesmo período experimental.

- $p < 0,05$ comparado com controle de 4 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com contralateral de 2 semanas
- ▼ $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 4 semanas

Figura 18 – Gráfico da média e desvio padrão da **AST** (mm^2) do músculo Tibial Anterior no período experimental de 2 e 4 semanas.

4.2.3 Área do Perfil das Fibras Musculares (APF)

4.2.3.1 APF do Músculo Sóleo

Na tabela 7 observou-se, numericamente, o comportamento das fibras musculares tipo I e tipo IIB durante o período experimental de 2 e 4 semanas.

Tabela 7 – Média e desvio padrão, em μm^2 , da Área do Perfil das Fibras (APF) do músculo Sóleo nas diferentes condições de grupos e períodos experimentais.

APF – Sóleo		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s	2201,66±193,11	2179,49±568,99	2739,85±351,27
	4s	3147,05±546,43	2534,66±327,71	3521,60±347,98
Tipo IIB	2s	2223,28±359,07	1824,13±452,19	2342,58±871,15
	4s	2699,64±650,37	1544,50±421,19	1567,44±382,24

A figura 19 demonstrou que a APF do músculo sóleo no período de 2 semanas para as fibras do I dos músculos contralaterais, apresentaram aumento significativo da área ($p < 0,05$) em relação aos respectivos grupos, enquanto que as fibras do tipo IIB do grupo imobilizado tiveram uma tendência à diminuição da ($p = 0,253$).

▲ $p < 0,05$ comparado com as fibras do tipo I controle e imobilizado

Figura 19 – Gráfico da média e desvio padrão da **APF** (μm^2) do músculo Sóleo no período experimental de 2 semanas.

A análise de variância com medidas repetidas detectou diferenças significantes entre os músculos sóleos imobilizados e contralaterais no decorrer de 4 semanas, onde as fibras tipo I dos músculos contralaterais exibiram aumento da sua área ($p < 0,05$). Conforme se observa na figura 20, há uma tendência à perda da APF do tipo I nos músculos imobilizados ($0,05 < p < 0,10$) ao se comparar com os espécimes controles.

Relativamente às fibras IIB, notou-se que, nos animais imobilizados e em seus membros contralaterais, a APF desse tipo de fibra diminuiu ($p < 0,05$) ao se comparar com o grupo controle (Figura 20).

Figura 20 – Gráfico da média e desvio padrão da **APF** (μm^2) do músculo Sóleo no período experimental de 4 semanas.

A figura 21 representou o comportamento das fibras do tipo I nos períodos experimentais de 2 e 4 semanas.

No decorrer dessas semanas, os grupos controles também apresentaram diferenças significativas na APF do tipo I ($p < 0,05$), sendo os animais de 4 semanas os que continham a maior APF do tipo I. Novamente, foi observado diferenças entre os músculos controles de 2 e 4 semanas, onde a APF dos animais de 4 semanas eram mais elevadas ($p < 0,05$). Da mesma forma, este dado foi refletido ao se comparar a APF do tipo I nos contralaterais de 2 e 4 semanas (Figura 21).

Figura 21 – Gráfico da média e desvio padrão da APF (μm^2) tipo I no músculo Sóleo.

Em relação à APF tipo IIB no músculo sóleo, no decorrer de 2 e 4 semanas, os grupos controles apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), notando-se nos animais de 4 semanas, as maiores APF tipo IIB. Além disso, os animais do grupo imobilizado e contralateral de 4 semanas alcançaram menor APF ($p < 0,05$) que seu respectivo controle (Figura 22).

A APF tipo IIB no período experimental de 2 semanas (Figura 22), mostra que os animais com membros imobilizados tenderam a uma menor APF ($p = 0,253$) dentre todos os grupos estudados.

• $p < 0,05$ comparado com imobilizado e contralateral de 4 semanas

Figura 22 – Gráfico da média e desvio padrão da APF (μm^2) tipo IIB no músculo Sóleo.

4.2.3.2 APF do Músculo Tibial Anterior

Na tabela 8 expressou-se os resultados para a APF do tipo I, IIA e IIB dos músculos tibial anterior (controle, imobilizado e contralateral), no decorrer do experimento em 2 e 4 semanas.

Tabela 8 – Média e desvio padrão, em μm^2 , da Área do Perfil das Fibras (APF) do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições de grupos e períodos experimentais.

APF – Tibial Anterior		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s	608,50±124,74	1329,58±215,38	926,30±86,96
	4s	1247,19±109,05	1206,34±276,88	1032,04±110,17
Tipo IIA	2s	1077,39±108,53	1606,34±190,68	1560,69±113,41
	4s	2033,08±383,64	1473,41±141,87	2063,87±205,88
Tipo IIB	2s	2835,47±613,87	2044,14±493,91	2806,61±90,12
	4s	3987,14±934,79	2295,54±365,73	3957,28±236,73

Os valores médios obtidos para a APF do músculo Tibial Anterior no período de 2 semanas podem ser visualizados na figura 23.

Figura 23 – Gráfico da média e desvio padrão da APF (μm^2) do músculo Tibial Anterior no período experimental de 2 semanas.

A análise de variância com 2 fatores detectou diferença significativa na APF tipo I nos músculos imobilizados e contralaterais quando comparados aos animais do grupo controle, onde se verificou as menores APF tipo I ($p < 0,05$) em 2 semanas de estudo. Da mesma forma, a APF tipo I no grupo imobilizado de 2 semanas se constituiu na maior área, comparativamente aos músculos do grupo controle (Figuras 23 e 25).

Em relação à APF tipo IIA no período de 2 semanas (Figura 23 e 26), notou-se que os animais imobilizados e contralateral foram semelhantes, estatisticamente;

contudo, as amostras dos animais controle, quando comparadas às dos animais imobilizados e contralateral, apresentavam uma menor APF tipo IIA ($p < 0,05$).

Dentre as APF tipo IIB com 2 semanas de experimento (Figuras 23 e 27), foi possível detectar uma redução significativa ($p < 0,05$) nos animais imobilizados, em relação aos demais grupos.

A figura 24 representa dados dos animais do grupo experimental de 4 semanas. Ao contrário daquela observada nos animais de 2 semanas, as APF tipo I nos grupos controle e imobilizado permanecem inalteradas em 4 semanas. No entanto, como se comprova nas figuras 24 e 25, a APF tipo I dos músculos controle foi menor, sob o aspecto estatístico ($p < 0,05$).

- $p < 0,05$ comparado com as fibras tipo I imobilizado
- ▲ $p < 0,05$ comparado com as fibras tipo IIA controle e contralateral
- ▼ $p < 0,05$ comparado com as fibras IIB controle e contralateral

Figura 24 – Gráfico da média e desvio padrão da APF (μm^2) do músculo Tibial Anterior no período experimental de 4 semanas.

Entre as APF do tipo IIA no período de 4 semanas, foram observadas diferenças significativas quando se relacionou os grupo controle e contralateral, ao grupo imobilizado. Assim, o mesmo patamar foi verificado para os primeiros, apresentando-se maiores do que os valores encontrados para o grupo imobilizado ($p<0,05$). (Figuras 24 e 26).

Diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) foram observadas para a APF tipo IIB nos animais de 4 semanas (Figuras 24 e 27). Repetindo os dados apresentados para essas fibras no período de 2 semanas, os grupos controle e contralateral alcançaram maiores valores do que as amostras do grupo imobilizado.

Nos gráficos das figuras 25, 26 e 27, estão representadas as comparações das APF tipo I, IIA e IIB, nos períodos de 2 e 4 semanas da presente pesquisa. Quando se analisa os dados relativos à APF tipo I, IIA e IIB observaram-se diferenças significativas ($p<0,05$) em todas as fibras, nos grupos controle e contralateral; contudo, as amostras dos músculos imobilizados respeitaram os mesmo padrões, tanto em 2, como em 4 semanas de experimento.

- $p<0,05$ comparado com controle de 4 semanas, imobilizado e contralateral de 2 semanas
- ▲ $p<0,05$ comparado com controle e contralateral de 2 semanas
- ▼ $p<0,05$ comparado com imobilizado de 4 semanas e contralateral de 2 semanas

Figura 25 – Gráfico da média e desvio padrão da APF (μm^2) tipo I no músculo Tibial Anterior.

- $p < 0,05$ comparado com controle de 4 semanas, imobilizado e contralateral de 2 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 4 semanas
- ▼ $p < 0,05$ comparado com contralateral de 4 semanas

Figura 26 – Gráfico da média e desvio padrão da **APF** (μm^2) tipo IIA no músculo Tibial Anterior.

- $p < 0,05$ comparado com controle de 4 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 2 semanas
- $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 4 semanas
- ▼ $p < 0,05$ comparado com contralateral de 2 semanas

Figura 27 – Gráfico da média e desvio padrão da **APF** (μm^2) tipo IIB no músculo Tibial Anterior.

4.2.4 Densidade das fibras musculares (DFM)

4.2.4.1 DFM do músculo Sóleo

A tabela 9 expressou numericamente a densidade total de fibras (DTF) e quantidade de fibras dos tipos I e IIB, por mm².

Tabela 9 – Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM), nº de fibras/mm², do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais de 2 e 4 semanas.

DFM – Sóleo		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s	333,22±21,10	326,76±43,17	295,30±62,55
	4s	247,88±26,96	339,08±38,23	274,8±27,08
Tipo IIB	2s	30,00±14,88	48,52±35,43	12,92±13,37
	4s	24,64±13,87	12,92±13,37	7,94±3,29
Total	2s	363,20±27,52	375,28±24,96	317,36±49,41
	4s	272,48±23,61	352,00±30,64	282,74±27,48

A imobilização durante o período experimental de 2 semanas não alterou significativamente a densidade total de fibras (**DTF**), quando comparado com os músculos sóleos controles. No entanto, a análise de variância com medidas repetidas detectou uma diminuição de DTF ($p<0,05$) nos músculos contralaterais, em relação aos membros imobilizados (figura 28). Já aqueles músculos que estiveram imobilizados no decorrer de 4 semanas, apresentaram um aumento significativo da DTF ($p<0,05$) em relação aos músculos sóleos controles e contralaterais (Figura 28).

Figura 28 – Gráfico da média e desvio padrão da **DTF** (nº de fibras/mm²) do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.

Em relação à DFM tipo I no período de 2 semanas, notou-se que estas acompanharam a mesma disposição estatística da DTF em 2 semanas (Figura 29).

No período de 4 semanas, a DFM tipo I manteve um comportamento semelhante àquele apresentado pela densidade total de fibras, tendo assim, os animais imobilizados, a maior DFM tipo I ($p < 0,05$), quando comparado às demais amostras.

- $p < 0,05$ comparado com controle de 2 semanas e imobilizado de 4 semanas
- $p < 0,05$ comparado com contralateral de 2 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com imobilizado de 4 semanas

Figura 29 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo I (nº de fibras/mm²) do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.

De acordo com a figura 30, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) da DFM tipo IIB entre os grupos controles de 2 e 4 semanas. Ainda, na comparação dos animais controles com os imobilizados, notou-se uma tendência ao aumento da densidade dessas fibras ($p = 0,171$), nos músculos imobilizados por 2 semanas. Relativamente à comparação entre os músculos imobilizados com seus respectivos contralaterais, foi detectada maior DFM tipo IIB ($p < 0,05$) para os músculos imobilizados. No período experimental de 4 semanas, as fibras tipo IIB nos músculos contralaterais constituiu o menor número de fibras por mm². Pela análise de variância detectou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os músculos contralaterais e imobilizados; contudo, ao se comparar os músculos controles como os imobilizados e os contralaterais, detectou-se apenas uma tendência à diminuição da DFM tipo IIB ($p = 0,171$).

- $p < 0,05$ comparado com controle de 4 semanas
- $p < 0,05$ comparado com contralateral de 4 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com imobilizado de 2 semanas

Figura 30 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo IIB (nº de fibras/mm²) do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.

4.2.4.2 DFM na região superficial do músculo Tibial Anterior

A tabela 10 expõe dados quantitativos sobre a densidade total de fibras (DTF) e a densidade das fibras musculares (DFM) tipo I, IIA e IIB.

Tabela 10 – Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM), nº de fibras/mm², da Região Superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

DFM - Região Superficial				
Tibial Anterior		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s	2,2±3,5	0,4±0,5	0,2±0,4
	4s	0,0±0,0	6,8±9,9	0,6±0,5
Tipo IIA	2s	44,6±14,3	108,0±15,8	52,6±18,4
	4s	41,2±6,4	74,8±36,1	39,4±12,9
Tipo IIB	2s	215,4±30,2	257,8±32,8	192,6±27,4
	4s	175,2±21,1	201,0±35,8	176,2±16,2
Total	2s	262,2±32,4	366,2±35,5	245,4±40,2
	4s	216,4±22,1	282,6±33,6	216,2±25,6

Como se representou na figura 29, a DTF nos músculos imobilizados exibira maiores valores e, quando comparada àquela dos músculos controles e contralaterais, esta diferença foi significativa ($p<0,05$) nos animais de 2 e 4 semanas.

A comparação entre os grupos controles de 2 e 4 semanas revelou que a menor DTF ocorreu no grupo mais velho ($p<0,05$), em todos os grupos (controles, imobilizados e contralaterais) (Figura 31).

- $p < 0,05$ comparado com controle de 4 semanas
- $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 2 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 2 semanas
- ▼ $p < 0,05$ comparado com contralateral de 4 semanas

Figura 31 – Gráfico da média e desvio padrão da **DTF** (nº de fibras / mm²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

Em relação à DFM tipo I na região superficial do músculo tibial anterior, registrou-se que 2 semanas de imobilização promoveu um aumento significativo deste parâmetro ($p < 0,05$) quando comparado aos músculos contralaterais.

A imobilização também provocou alterações significantes durante o período experimental de 4 semanas pois esses músculos exibiram maior DFM tipo I ($p < 0,05$). (figura 32). Notou-se ainda, que os músculos controles de 4 semanas não apresentaram DFM tipo I na sua região superficial; portanto, ao se comparar estes com os músculos contralaterais, estes exibiram maior densidade ($p < 0,05$). (Figura 32).

- $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 4 semanas
- $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 2 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com imobilizado de 4 semanas

Figura 32 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo I (nº de fibras/mm²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

Na figura 33, representou-se a DFM tipo IIA e, como ocorrido com a densidade total de fibras desta região, a imobilização também causou alterações na DFM tipo IIA. Logo, comparativamente, averiguou-se maior número dessas fibras por mm² ($p < 0,05$) nos músculos imobilizados por 2 e 4 semanas, quando comparados aos animais controles e contralaterais. A mesma situação repetiu-se na comparação entre os músculos imobilizados de 2 e 4 semanas, onde os animais de 2 semanas continham maiores DFM tipo IIA (Figura 33).

- $p < 0,05$ comparado com imobilizado de 4 semanas, controle e contralateral de 2 semanas
- $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 4 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado contralateral de 2 semanas.

Figura 33 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo IIA (nº de fibras / mm²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

A imobilização também promoveu alterações na DFM tipo IIB da região superficial. A figura 34 mostrou que músculos imobilizados por 2 semanas alcançaram a maior densidade estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os animais imobilizados com 4 semanas, apresentaram aumento significativo dessa densidade ($p < 0,05$) ao serem comparados com os músculos contralaterais.

- $p < 0,05$ comparado com controle de 4 semanas
- $p < 0,05$ comparado com imobilizado de 4 semanas controle e contralateral de 2 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com controle e contralateral de 4 semanas

Figura 34 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo IIB (nº de fibras/mm²) na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

4.2.4.3 DFM na região profunda do músculo Tibial Anterior

Na tabela 11 foram expressos os dados quantitativos sobre a densidade total de fibras (DTF) e a densidade das fibras musculares (DFM) tipo I, IIA e IIB.

Tabela 11 – Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM), nº de fibras/ μm^2 , da Região Profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

DFM - Região Profunda				
Tibial Anterior		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s	45,4±9,7	53,6±13,7	39,0±3,6
	4s	41,6±8,7	58,0±28,2	39,0±14,2
Tipo IIA	2s	212,6±65,6	200,2±24,7	208,4±45,7
	4s	127,8±41,2	189,0±46,2	136,8±27,1
Tipo IIB	2s	170,8±19,5	242,2±66,6	146,8±15,2
	4s	204,2±22,0	169,4±24,7	201,2±27,9
Total	2s	428,8±86,2	496,0±52,8	394,2±34,7
	4s	373,6±52,7	416,4±44,73	377,0±31,1

Nos músculos submetidos à imobilização por 2 semanas, houve uma tendência à elevação da DTF ($0,05 < p < 0,10$), quando comparada à dos animais controles. Todavia, a análise de variância com medidas repetidas mostrou que esta diferença era significativa ($p < 0,05$) na comparação do grupo imobilizado com os respectivos contralaterais de 2 semanas (Figura 35). Para os animais de 4 semanas, notou-se apenas uma tendência ($0,05 < p < 0,10$) para maior DTF, nos músculos imobilizados.

Na comparação entre os músculos controles de 2 e 4 semanas, houve diferença significativa ($p < 0,05$), com maior DTF para o grupo de 2 semanas; estatisticamente, a mesma situação foi verificada para os músculos imobilizados (Figura 35).

- $p < 0,05$ comparado com controle de 4 semanas
- $p < 0,05$ comparado com imobilizado de 4 semanas e contralateral de 2 semanas

Figura 35 – Gráfico da média e desvio padrão da **DTF** (n° de fibras / mm^2) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

Como demonstrou a figura 36, nesta região foi possível detectar diferença estatística ($p < 0,05$) apenas na comparação dos músculos imobilizados com os contralaterais em 2 e 4 semanas onde, novamente, o tratamento de imobilização resultou em maior DFM tipo I.

- $p < 0,05$ comparado com contralateral de 2 semanas
- $p < 0,05$ comparado com contralateral de 4 semanas

Figura 36 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo I (n° de fibras/mm²) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

No gráfico da figura 37, foram representadas as comparações das DTF tipo IIA, nos períodos de 2 e 4 semanas. Ao se analisar dados relativos a esta região, muito embora tenha se visualizado desníveis entres os valores, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas, entre os grupos estudados.

Figura 37 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo IIA (n° de fibras/mm²) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

A figura 38 demonstrou que a DFM tipo IIB se alterou, principalmente com o tratamento de imobilização. Em 2 semanas, a densidade deste tipo de fibras apresentou um aumento significativo ($p<0,05$), em relação aos demais grupos dessa fase. Além disso, não só houve esta diferença significativa, como também foi detectada diferença entre os músculos imobilizados de 2 e 4 semanas.

Nos animais experimentais de 4 semanas, através da análise de variância com 2 fatores, foi detectada apenas uma indicação ($0,05<p<0,01$) de que os músculos controles apresentaram maior DFM tipo IIB, em relação aos músculos imobilizados. Ao contrario, quando feita à comparação com os músculos contralaterais, notou-se diferença significativa ($p<0,05$), pois os músculos imobilizados apresentaram menores densidades (Figura 38).

Figura 38 – Gráfico da média e desvio padrão da **DFM** tipo IIB (nº de fibras / mm²) na região profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

4.2.5 Porcentagem das fibras musculares nas secções transversas

4.2.5.1 Porcentagem dos tipos de fibras no músculo Sóleo

Na tabela 12 expressou-se os resultados para DTF, DFM tipo I e IIB e suas respectivas porcentagens para os músculos sóleos (controle, imobilizado e contralateral), no decorrer do experimento, em 2 e 4 semanas.

Tabela 12 – Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM) e porcentagem das fibras do tipo I e IIB do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.

DFM e Porcentagem (%)					
	Sóleo		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s		333,2±21,1	326,8±43,2	295,3±62,5
			(91,9±3,8%)	(87,0±9,5%)	(92,4±6,2%)
	4s		247,9±27,0	339,1±38,2	274,8±27,1
			(90,9±5,2%)	(96,2±4,0%)	(97,2±1,2%)
Tipo IIB	2s		30,00±14,9	48,5±35,5	22,1±16,7
			(8,1±3,8%)	(13,0±9,5%)	(7,6±6,2%)
	4s		24,6±13,9	12,9±13,4	7,9±29,0
			(9,1±5,2%)	(3,8±4,0%)	(2,8±1,2%)
Total	2s		363,2±27,5	375,3±25,0	317,36±49,4
			(100%)	(100%)	(100%)
	4s		272,5±23,6	352,0±30,6	282,7±27,5
			(100%)	(100%)	(100%)

Ao se observar o comportamento dos músculos submetidos à imobilização por 2 semanas, verificou-se que houve indicação ($p=0,053$) de interconversão de fibras do tipo I em fibras do tipo IIB, com os músculos controles e contralaterais permanecendo, respectivamente, com 8,1 e 7,6%, de fibras do tipo IIB em sua

morfologia. Já os músculos que sofreram o processo de imobilização, apresentaram em média 13% de fibras do tipo IIB (Figura 39).

Quando da análise deste músculo no período de 4 semanas, houve uma indicação ($p=0,053$) inversa de interconversão de fibras entre os animais controles e contralaterais, visto que a porcentagem de fibras do tipo I nos animais controles (91,9%) foi menor do que a verificada para os animais imobilizados (96,2%).

Figura 39 – Gráfico da média e desvio padrão da porcentagem das fibras do músculo Sóleo nas diferentes condições e períodos experimentais.

4.2.5.2 Porcentagem dos tipos de fibras na região superficial do músculo Tibial Anterior

Na tabela 13 expressou os resultados para DTF, DFM tipo I, IIA e IIB e suas respectivas porcentagens para a região superficial dos músculos tibial anterior nas condições de controle, imobilizado e contralateral no decorrer de 2 e 4 semanas.

Tabela 13 – Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM) e Porcentagem das fibras na Região Superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

DFM e Porcentagem (%)		Região Superficial		
		Tibial Anterior		
		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s	2,2±3,5	0,4±0,5	0,2±0,4
		(0,8±1,3%)	(0,1±0,1%)	(0,1±0,1%)
	4s	0,0±0,0	6,8±9,9	0,6±0,5
		(0,0±0,0%)	(2,4±3,4%)	(0,3±0,2%)
Tipo IIA	2s	44,6±14,3	108,0±15,8	52,6±18,4
		(17,0±5,7%)	(29,6±4,3%)	(21,2±4,8%)
	4s	41,2±6,4	74,8±36,1	39,4±12,9
		(19,1±3,1%)	(26,0±11,7%)	(17,9±4,5%)
Tipo IIB	2s	215,4±30,2	257,8±32,8	192,6±27,4
		(82,2±6,0%)	(70,3±4,2%)	(78,8±4,9%)
	4s	175,2±21,1	201,0±35,8	176,2±16,2
		(80,9±3,1%)	(71,6±13,0%)	(81,8±4,5%)
Total	2s	262,2±32,4	366,2±35,5	245,4±40,2
		(100%)	(100%)	(100%)
	4s	216,4±22,1	282,6±33,6	216,2±25,6
		(100%)	(100%)	(100%)

A porcentagem das fibras do tipo I desta região permaneceram inalteradas durante o período experimental de 2 semanas, ou seja, nos animais controle foi encontrada uma porcentagem inexpressiva (0,8%), e mais ainda, nos animais submetidos à imobilização e em seus respectivos músculos contralaterais (0,1%).

Em relação aos outros tipos de fibras no período de 2 semanas, constatou-se que a imobilização produziu ($p < 0,05$) uma interconversão de fibras do tipo IIB para o tipo IIA, tanto para os músculos controles, quanto para os contralaterais (Figura 40).

Os dados quantitativos revelaram que, nos músculos imobilizados por 4 semanas, existiu uma interconversão ($p<0,05$) das fibras do tipo IIB, não só para as fibras do tipo IIA, mas também, uma plasticidade destas, ao se transformarem em fibras do tipo I (Figura 40).

Figura 40 – Gráfico da média e desvio padrão da porcentagem das fibras na região superficial do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

4.2.5.3 Porcentagem dos tipos de fibras na região profunda do músculo Tibial Anterior

Os resultados para DTF, DFM tipo I, IIA e IIB e suas respectivas porcentagens para a região profunda do músculo tibial anterior, foram expressos na tabela 14.

Tabela 14 – Média e desvio padrão da Densidade das Fibras Musculares (DFM) e Porcentagem das fibras na Região Profunda do músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

DFM e Porcentagem (%)		Região Profunda		
		Tibial Anterior		
		Controle	Imobilizado	Contralateral
Tipo I	2s	45,4±9,7 (10,6±0,9%)	53,6±13,7 (11,0±3,5%)	39,0±3,6 (10,0±1,8%)
	4s	41,6±8,7 (11,1±1,4%)	58,0±28,2 (14,3±8,3%)	39,0±14,2 (10,5±4,3%)
Tipo IIA	2s	212,6±65,6 (48,8±5,6%)	200,2±24,7 (40,7±6,1%)	208,4±45,7 (52,4±7,5%)
	4s	127,8±41,2 (33,8±7,0%)	189,0±46,2 (45,1±8,9%)	136,8±27,1 (36,3±6,1%)
Tipo IIB	2s	170,8±19,5 (40,6±6,0%)	242,2±66,6 (48,3±8,6%)	146,8±15,2 (37,6±5,9%)
	4s	204,2±22,0 (55,1±6,4%)	169,4±24,7 (40,6±2,4%)	201,2±27,9 (53,2±4,0%)
Total	2s	428,8±86,2 (100%)	496,0±52,8 (100%)	394,2±34,7 (100%)
	4s	373,6±52,7 (100%)	416,4±44,73 (100%)	377,0±31,1 (100%)

Nesta região, as fibras do tipo I não apontaram alterações significativas durante o período experimental de 2 e 4 semanas. Porém, as fibras do tipo IIB parecem ganhar espaço na porcentagem desta região ($0,05 < p < 0,10$) quando os músculos foram submetidos ao processo de imobilização (Figura 41).

Em relação aos tipos de fibras no período de 4 semanas, o dados assinalaram que a imobilização foi eficiente ($p < 0,05$) em converter fibras do tipo IIB em tipo IIA, pois a média percentual das fibras do tipo IIB nos animais controle e

contralaterais era de 55,1% e 53,2%, respectivamente. Após o período experimental de 4 semanas, estas porcentagens caíram para 40,6%, no grupo imobilizado culminando, concomitantemente, para um aumento de aproximadamente 10% das fibras do tipo IIA (Figura 41).

- $p < 0,05$ comparado com fibras tipo IIA e IIB controle de 4 semanas
- $p < 0,05$ comparado com fibras tipo IIA e IIB contralateral de 4 semanas
- ▲ $p < 0,05$ comparado com fibras tipo IIA controle de 4 semanas
- ▼ $p < 0,05$ comparado com fibras IIB controle de 4 semanas

Figura 41 – Gráfico da média e desvio padrão da porcentagem das fibras na região pro músculo Tibial Anterior nas diferentes condições e períodos experimentais.

A ocorrência da atrofia muscular é considerada um dos grandes problemas durante o processo de recuperação do aparelho locomotor. O grau de comprometimento desta atrofia é bastante variável, uma vez que a posição articular, assim como os tipos de fibras predominantes no músculo, parece ser um fator determinante para um acometimento da estrutura (TABARY et al., 1972).

Não só as imobilizações são responsáveis por alterações na morfologia muscular mas, conforme os estudos de Oliveira (2006), traumas sistêmicos como a lesão térmica por escaldamento podem afetar as estruturas do sistema muscular.

Outro fator importante a ser considerado, é o estado nutricional do indivíduo, pois em pesquisas onde os animais foram submetidos à desnutrição protéica, verificou-se um aumento na densidade das fibras musculares, concomitantemente a diminuição da área dos perfis destas (SIMÃO, 2004; MATHIENSEN, 2004; PACHECO 2006).

De acordo com Aoki et al. (2004), intervenções nutricionais demonstraram que, uma suplementação a base de creatina, minimiza os efeitos do imobilismo sobre a perda de massa muscular.

Nesse contexto, muitas pesquisas buscam as respostas musculares frente a inúmeras situações, dentre elas, o encurtamento e o alongamento. Para tanto, foram estabelecidos alguns modelos experimentais utilizando matérias como gesso, resina acrílica, malhas de aço, termoplástico e diversos outros, numa tentativa de reproduzir tais situações (BOOTH e KELSO, 1973; ANSVED, 1995; APPELL, 1995; JÄRVINEN et al., 2002; DA SILVA et al., 2006).

Além desses métodos, outra condição na qual os músculos são dispostos à hipoatividade, é aquela onde os animais são suspensos pela cauda, com o intuito

de se evitar a descarga de peso nos membros pélvicos, produzindo assim uma atrofia muscular. Este modelo experimental vem ganhado prestígio em países com programas espaciais avançados, em virtude de o modelo simular a atrofia muscular em condições de vôo espacial (MUSACCHIA; STEFEN; FELL, 1988).

Os estudos com esses modelos experimentais já comprovam os efeitos deletérios da hipoatividade no sistema musculoesquelético, destacando-se a contratura muscular e a redução da amplitude de movimento, devido à deposição do tecido colágeno entre as fibras e fascículos do músculo (JÓZSA et al., 1990). Conseqüentemente não só o esqueleto fibroso do músculo se transforma com o desuso muscular, mas também, já foram evidenciadas alterações no fenótipo, massa muscular, redução da reserva de glicogênio, modificações de sarcômeros em série, diminuição da força e resistência à fadiga, como descrito por Reardon (2001), Okita et al. (2004) e Aoki et al. (2006).

Essas pesquisas motivaram o desenvolvimento do presente estudo, uma vez que poucos são os relatos concernentes às imobilizações funcionais envolvendo apenas um segmento articular.

5.1 Modelo experimental

Dentre os diferentes animais que têm sido empregados como modelos experimentais, optou-se pelo rato na presente pesquisa, uma vez que a sua constituição musculoesquelética pode ser considerada semelhante à do ser humano. Além disso, o baixo custo associado ao fácil manuseio desses animais no que tange aos diversos procedimentos, foram determinantes para a escolha. Outro fator importante de se destacar é a possibilidade de se mapear todo o músculo do animal

em uma lâmina histológica contendo cortes transversais com a tipificação das fibras musculares, condição esta, impossível de ser repetida em animais de maior porte. Para que tal episódio pudesse ser realizado em humanos, seriam necessárias várias biopsias de diferentes regiões a fim de se ter uma noção relativamente exata da distribuição dos tipos de fibras.

Para reproduzir os efeitos deletérios do desuso muscular, o modelo aqui desenvolvido preocupou-se em ser condizente com as situações rotineiras da prática clínica, onde a articulação talocrural pudesse ser imobilizada em posição neutra, permitindo ao animal, a realização da descarga de peso nos membros imobilizados. Portanto, nos músculos imobilizados, não foram abolidas todas as atividades, admitindo-se a ocorrência de contrações isométricas sem, contudo, liberar os movimentos angulares das articulações. Além disso, aos animais era permitido a deambulação, com o auxílio do membro imobilizado.

Até chegar ao modelo de órtese utilizado na presente pesquisa, alguns estudos pilotos foram conduzidos para imobilizar a articulação talocrural. Desta forma, órteses produzidas com material termoplástico (o mesmo material utilizado para as imobilizações funcionais em humanos), não obtiveram êxito em manter os membros dos animais por um longo período de desuso, pois eram roídas por eles, muito antes do término do experimento. Diante desse problema, promoveu-se algumas modificações na órtese como proposto por Ansved (1995), revestindo-se todo o dispositivo com uma fina malha de aço, o que também não foi eficaz.

Sanado o problema do material a ser utilizado, deparou-se com outras dificuldades, pois, apesar da órtese ter sido moldada com a maior fidelidade anatômica possível, alguns animais sentiam desconforto com o dispositivo e tentavam retirá-lo dos membros, empurrando-o em direção as falanges. Quando tal

evento ocorria, a órtese emperrava sobre a cabeça dos metatarsianos e impossibilitava o retorno venoso, provocando cianose e edema exacerbado nas patas, obrigando a excluí-los do estudo.

O propósito desta imobilização foi verificar se os músculos neste modelo experimental reagiriam de acordo com aqueles previamente estudados em posição de encurtamento, onde os resultados confirmam uma redução da massa muscular, da área das fibras, diminuição no número de sarcômeros em série e maior proliferação do tecido conjuntivo, ou conforme os músculos submetidos à imobilização em posição de alongamento, que acarreta aumento da massa muscular, da síntese protéica, adição de sarcômeros em série e menor proliferação de tecido conjuntivo (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; TARDIEU et al. 1982).

Não somente a posição articular, mas também o tipo de músculo analisado interfere nas modificações estruturais do tecido. Sendo assim, ao imobilizar a articulação talocrural, optou-se pelos músculos tibial anterior e sóleo, uma vez que estes apenas cruzavam articulação talocrural e, conseqüentemente, eram responsáveis pelos movimentos de flexão plantar e dorsal da pata.

Algumas pesquisas realizadas entre as décadas de 70 e 80 e que avaliaram a influência da imobilização, são contraditórias no que diz respeito a qual tipo de fibra muscular é mais susceptível à atrofia (BARNÁRD et al., 1971; TABARY et al., 1972; BOOTH e KELSO, 1973; TARDIEU et al., 1982; MAYO et al., 1988; MUSACCHIA et al., 1988). Desta forma, o músculo tibial anterior forneceu dados sobre os efeitos da imobilização em um músculo de contração fásica, visto que sua composição apresentava 90% de fibras glicolíticas. Além disso, a eleição do músculo sóleo permitiu obter informações sobre o fator imobilização em músculos de

contração tônica, pois neste, foram encontradas aproximadamente 90% de fibras oxidativas.

Relativamente ao período de imobilização, existem algumas discrepâncias sobre qual é o tempo necessário para produzir alterações na morfologia muscular. Autores como Kauhanen et al. (1998) através de técnicas de imunohistoquímica, relataram alterações no sarcoplasma e interstício de fibras musculares com apenas 3 dias de imobilização; no entanto, a maioria dos trabalhos afirmam que o período de imobilização por 2 semanas é responsável por promover maiores modificações no tecido muscular (PATTULLO et al., 1992; AOKI et al., 2004; OKITA et al., 2004; TANAKA et al., 2004; FRIMEL et al., 2005; ISHIKAWA et al., 2005; YASUDA et al., 2005). Essas afirmações não podem ser assim consideradas no presente experimento, uma vez que, como será detalhado posteriormente, o período de duas semanas de imobilização, não foi aquele que promoveu as maiores modificações estruturais nos músculos estudados.

Já o período experimental de 4 semanas, consagrado por trabalhos clássicos sobre o assunto (TABARY et al., 1972; BOOTH e KELSO, 1973; TOMANEK e LUND, 1974; ANSVED, 1995), foi utilizado para se verificar a existência de uma perda exponencial dos parâmetros morfoquantitativos de acordo com o tempo de imobilização.

Para todas as variáveis estudadas, foi adotado um grupo controle especial além daquele contralateral à imobilização, uma vez que trabalhos como o de Heslinga et al. (1992) demonstraram que o membro contralateral sofre alterações morfológicas, quando comparados aos verdadeiros animais controles.

5.2 Considerações sobre os resultados qualitativos e quantitativos

As células precursoras do tecido muscular são chamadas geralmente de células satélites; estas se encontram no meio muscular, entre a membrana basal e o sarcolema de um músculo já desenvolvido, sendo de difícil distinção com os núcleos que ficam contidos pelo sarcolema (POWNALL et al., 2002). As células satélites podem se diferenciar e se incorporar nas fibras musculares que estão hipertrofiando, ou ainda, formar novas fibras musculares. Estas células são representadas como células-tronco adultas e estão envolvidas no crescimento muscular normal, como também na regeneração pós-traumática ou patológica (GROS et al., 2005).

A maioria das células satélites permanece estática em condições normais; porém, em condições de denervação (GOSSELIN et al., 1994), compressão muscular (TERÄVÄINEN, 1970), sobrecarga (DARR e SCHULTZ, 1987) e estiramento (WINCHESTER et al., 1991), elas se tornam ativas e se proliferam como mioblastos, antes de submeter-se à diferenciação miogênica.

Como verificado no presente estudo, os músculos submetidos à imobilização apresentaram um aumento visível na quantidade de núcleos, sendo a maioria deles evidenciados fora do sarcolema e membrana basal, levando a presumir que, dentre estes, encontravam-se núcleos de fibroblastos, células endoteliais dos capilares e células provenientes de resposta inflamatória, como os macrófagos. Tal fato pode ser corroborado com os achados em microscopia eletrônica de transmissão, onde foi encontrado células satélites alteradas, sugerindo a atividade das mesmas, nos focos de lesões.

Outra situação já cientificamente comprovada é que, os músculos esqueléticos ao receberem uma sobrecarga, experimentam uma hipertrofia de suas fibras musculares, resultado da síntese de miofibrilas, como verificado no trabalho

de Stromer et al. (1974). No modelo desuso muscular aqui proposto, notou-se a presença de estruturas no interior das fibras, como núcleos centralizados. Este episódio pode ser interpretado como um processo de atrofia levando a uma proteólise e, conseqüentemente, à perda das miofibrilas, como descrito por Boonyarom e Inui (2006). Além disso, Kauhanen et al. (1998) descreveram que esse espaço deixado pelas proteínas filamentosas que sofreram lise é ocupado pelos núcleos e células satélites, para se recompor a morfologia dos elementos alterados, evidenciando-se uma regeneração celular.

A importância da disposição do tecido conjuntivo no músculo esquelético não é bem esclarecida, mas provavelmente o colágeno é o maior colaborador para as propriedades tensionais do músculo (JÓSA et al.,1990). Conforme Järvinen et al. (2002), o acúmulo de tecido conjuntivo no endomísio e perimísio pode ser um empecilho para a circulação sanguínea intramuscular. Com base nessas informações, a ocorrência da diminuição dos capilares pode levar um aumento maior ainda de tecido conjuntivo, tornando este evento um círculo vicioso. Neste modelo de imobilização articular verificou-se um pronunciado aumento de colágeno no perimísio dos animais, que pode advir de 2 processos. O primeiro é devido à perda rápida e intensa do volume dos elementos contráteis; e o segundo é devido à produção da quantidade de colágeno nos músculos em desuso. Na presente pesquisa, percebeu-se que este aumento de tecido conjuntivo ocorreu tanto no músculo sóleo, como no tibial anterior, sendo mais pronunciado no período de 4 semanas. Desta forma pode-se salientar que a imobilização da articulação talocrural em posição funcional fornece as mesmas alterações no esqueleto fibroso do músculo que aquelas verificadas por Williams e Goldspink (1973) para produzir o encurtamento muscular. Todavia, não se observou alterações relativas à

vascularização provenientes do aumento do tecido conjuntivo, como descrito por Järvinen et al. (2002).

Ainda relativamente à deposição de tecido conjuntivo, foi notado que a mesma afetou também a morfologia dos fusos neuromusculares, traduzido pelo espessamento de sua cápsula e uma diminuição do espaço entre as fibras intrafusais e a cápsula do fuso propriamente dita. Pelo fato dos fusos neuromusculares serem estruturas sensoriais, o aumento de tecido conjuntivo em torno do órgão pode prejudicar suas funções proprioceptivas; sendo assim, acredita-se que este seja um fator importante quando se considerar lesões musculares pós imobilização. Contudo, apesar de todo o acometimento em relação à cápsula do fuso neuromuscular, as propriedades histoquímicas das fibras intrafusais foram mantidas, de acordo com o grupo controle.

Na maioria das variáveis estudadas, houve diferença significativa entre os grupos controles de 2 semanas e 4 semanas; no entanto, estes dados podem ser facilmente interpretados, pois os animais utilizados para o controle de 2 semanas sofriam eutanásia no 104º dia de vida, enquanto que os animais do período experimental de 4 semanas permaneciam vivos por 118 dias. Segundo Ansved (1995) ratos com 90 dias de vida são sexualmente maduros, porém, ainda jovens em termos de crescimento; entretanto, o peso corporal destes animais aumenta até 175 dias após o nascimento. Sendo assim, essa diferença foi aqui atribuída entre os grupos controles ao fato de um grupo apresentar 14 dias a mais de idade.

Além disso, em algumas variáveis dos membros contralaterais, ocorreu aumento significativo dos valores para área do perfil das fibras (APF) e diminuição da densidade das fibras musculares (DFM) em relação ao grupo controle, possivelmente devido a uma sobrecarga gerada no membro contralateral à

imobilização. Esses que vão ao encontro dos estudos de Heslinga et al. (1992) onde os parâmetros morfométricos dos membros contralaterais não fornecem resultados semelhantes de um verdadeiro grupo controle.

A imobilização durante 2 semanas em posição neutra, não promoveu alterações na área de secção transversa (AST) do músculo sóleo; por outro lado, ocorreu redução significativa deste parâmetro no período experimental de 4 semanas. Neste contexto, músculos submetidos à imobilização por 2 semanas já experimentam um aumento de tecido conjuntivo nos envoltórios musculares, contrabalançando a pequena atrofia muscular neste período. Além disso, verificou-se que as fibras do tipo I são as que menos sofrem com todo o processo de imobilização e, como a morfologia do músculo sóleo é de aproximadamente 90% dessas fibras oxidativas, elas apresentaram maior sofrimento com o período de 4 semanas.

Surpreendentemente, as fibras dos tipos I e IIA no músculo tibial anterior dos animais imobilizados por 2 semanas, ratificaram uma hipertrofia segundo os parâmetros morfométricos avaliados. Pode-se propor através destes dados, que o período de imobilização por 2 semanas não foi suficiente para adaptação do animal à órtese. Todavia, algum desconforto causando micro-lesões seria o responsável por desencadear edema nestes tipos de fibras, uma vez que estas apresentam uma maior microvascularização. Além disso, Williams e Goldspink (1984) verificaram que os músculos imobilizados em posição de alongamento estão submetidos à constante tensão, o que estimula o acréscimo no número de sarcômeros em série. Por conseguinte, foram adicionadas proteínas filamentosas no músculo para a geração de novos sarcômeros, subentendendo-se então, que as fibras dos tipos I e IIA na

imobilização funcional se comportaram como se estivessem passando por um processo de imobilização em alongamento.

Em contraste, as fibras do tipo IIB atrofiaram-se, pois estas são mais sensíveis a ação catabólica dos glicocorticóides, os quais, segundo Goldberg e Goodman (1969) estão em níveis aumentados no processo de imobilização. Na ultra-estrutura aqui avaliada, foi possível confirmar em meio às miofibrilas do músculo tibial anterior, grandes áreas circunscritas de lesão contendo grânulos de glicogênio, a principal fonte de energia das fibras musculares do tipo IIB.

Ao se analisar os dados relativos à densidade das fibras musculares (DFM), se faz necessário uma correlação com a área do perfil das fibras (APF). Para o entendimento destes parâmetros pode-se afirmar que estas são variáveis inversamente proporcionais, pois à medida que a APF diminui, verifica-se um aumento na concentração de fibras numa determinada região, traduzindo-se em aumento da DFM. Portanto, a atrofia muscular aumenta a DFM, enquanto a hipertrofia a diminui – com raríssimas exceções, uma constante no presente estudo.

Relativamente à interconversão de fibras no músculo sóleo, verificou-se que na imobilização por 2 semanas, houve uma tendência à interconversão de fibras do tipo I para o tipo II, assim como descrito por Picquet e Falempin (2003), que observaram no músculo sóleo, uma redução da área das fibras e conseqüentemente da força do músculo, bem como a transição de fibras lentas para rápidas, em ratos submetidos ao modelo de suspensão, durante 14 dias. Contudo, o inverso foi notificado no período de 4 semanas de inatividade, pois houve uma tendência à destruição das fibras do tipo II; além disso, a ultra-estrutura forneceu subsídios importantes, pois foi notado nos animais imobilizados um aumento das estruturas sarcoplasmáticas, como as mitocôndrias, nos animais imobilizados. Portanto,

subentende-se que estes músculos adquiriram maior capacidade oxidativa e menor velocidade de contração.

Ao se fazer a subdivisão das regiões profunda e superficial do músculo tibial anterior, foram observadas duas situações distintas. Na primeira, ao se analisar a região superficial do músculo, verificou-se a porcentagem máxima de 1,3% de fibras do tipo I e todo o restante da subdivisão composta por fibras do tipo IIA e IIB; por conseguinte, uma região extremamente glicolítica e adaptada a contrações rápidas e vigorosas. Na segunda, a região profunda mostrou-se bem heterogênea, pois foram identificadas, aproximadamente, 10% de fibras do tipo I, 40% de fibras do tipo IIA e 50% de fibras do tipo IIB.

Isto posto, pode-se admitir que a imobilização por 2 semanas provocou alterações distintas nas regiões superficial e profunda do músculo tibial anterior. Enquanto na região superficial as fibras do tipo IIB transformaram-se em fibras do tipo IIA, o inverso foi observado para a região profunda, este último dado corroborando com as observações feitas no músculo sóleo imobilizado por 2 semanas. Todavia, a imobilização por 4 semanas acarretou alterações semelhantes nas regiões superficial e profunda, pois ratificou-se uma interconversão de fibras do tipo IIB em IIA nas duas regiões; além disso, um dado impressionante foi a localização das fibras do tipo I na região superficial dos músculos imobilizados por 4 semanas. Possivelmente o aumento da DFM do tipo I colaborou para este surpreendente achado na região superficial do músculo tibial anterior.

Assim, os resultados da presente pesquisa levam a crer que, até o presente momento, a imobilização muscular em posição neutra é assunto ainda controverso, pois diferentes músculos assumem respostas distintas ao processo de imobilização.

Novos estudos tornam-se necessários para um melhor entendimento das modificações morfológicas das fibras musculares e fusos neuromusculares, pois os profissionais da área da saúde responsáveis pela prevenção, processo de cura e reabilitação dos transtornos no aparelho locomotor, carecem deste tipo de informações. Sobretudo, é indispensável o conhecimento dos fatores aqui apresentados, para que o profissional possa atuar com segurança e positivamente, a fim de se dedicar à árdua tarefa de tentar restaurar a integridade do paciente.

6 CONCLUSÃO

A imobilização da articulação talocrural em posição neutra, por 2 e 4 semanas, resultou em adaptações das estruturas contráteis, estáticas e ultraestruturais dos músculos sóleo e tibial anterior. Desta forma:

1. Quanto aos aspectos qualitativos:

- 1.1 A imobilização provocou alteração e migração dos núcleos das células musculares;
- 1.2 Em 4 semanas de imobilização, as fibras musculares do tipo IIA apresentaram contorno arredondado, enquanto nas fibras do tipo IIB esse contorno foi indefinido;
- 1.3 Em 4 semanas de imobilização ocorreu o espessamento da cápsula dos fusos neuromusculares; a imobilização (2 ou 4 semanas) não provocou alterações histoquímicas nas fibras intrafusais;
- 1.4 Ocorreu um aumento do perímio nos músculos imobilizados por 2 semanas; houve um espessamento do perímio e do endomímio dos músculos imobilizados por 4 semanas;
- 1.5 As fibras colágenas dos tipos I e III foram detectadas no arcabouço fibroso dos músculos com 2 semanas de imobilização, sem aparente predomínio de um dos tipos; na imobilização por 4 semanas prevaleceram as fibras colágenas do tipo I;
- 1.6 As linhas Z estavam desalinhadas no músculo tibial anterior com 2 semanas de imobilização; na imobilização por 4 semanas, ocorreu destruição das linhas Z, aumento das organelas e focos de lesões entre as miofibrilas, além de promover ativação das células satélites.

2. Em relação às características morfoquantitativas:

- 2.1 A área de secção transversa dos músculos sóleo e tibial anterior reduziu após 4 semanas de imobilização;
- 2.2 Com 2 semanas de imobilização ocorreu uma diminuição da densidade das fibras tipo I no músculo sóleo e tibial anterior contralaterais e hipertrofia das fibras do tipo I no músculo sóleo contralateral;
- 2.3 No músculo sóleo as fibras do tipo IIB atrofiaram após 4 semanas de imobilização;
- 2.4 A imobilização por 2 semanas provocou hipertrofia das fibras do tipo I e IIA no músculo tibial anterior, ao passo que as fibras do tipo IIB atrofiaram em 2 e 4 semanas de imobilização e as fibras do tipo IIA, em 4 semanas;
- 2.5 A imobilização aumentou a densidade das fibras do tipo IIA e IIB na região superficial do músculo tibial anterior. Na região profunda, as fibras do tipo IIB tiveram a densidade aumentada somente com 2 semanas de imobilização.
- 2.6 A imobilização promoveu a interconversão das fibras do tipo IIB em tipo IIA na região superficial do músculo tibial anterior; com 4 semanas, houve a interconversão das fibras do tipo IIA em tipo I. Nesse mesmo período, detectou-se a interconversão das fibras do tipo IIB em tipo IIA na região profunda do músculo tibial anterior.

REFERÊNCIAS *

- AOKI, M. S.; LIMA, W. P.; MIYABARA, E. H.; GOUVEIA, C. H. A.; MORISCOT, A. S. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. **Clin. Nutr.**, v. 23, p. 1176-1183, 2004.
- AOKI, M. S.; MIYABARA, E. H.; SOARES, A. G.; SALVINI, T. F.; MORISCOT, A. S. Cyclosporin-A does not affect skeletal muscle mass during disuse and recovery. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 2, p. 243-251, 2006.
- ANSVED, T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 154, p. 291-302, 1995.
- APPELL, H. J. Skeletal muscle atrophy during immobilization. **Int. J. Sports Med.**, v.7, p. 1-5, 1995.
- BARANY, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. **J. Gen. Physiol.**, v. 50, n. 6, p. 197-218, 1967.
- BARNÁRD, R. J.; EDGERTON, V. R.; FURUKAWA, T. PETER, J. B. Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. **Am. J. Physiol.**, v. 220, n. 2, p. 410-414, 1971.
- BEHMER, O. A.; DE TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São paulo: EDART, 1975.
- BOOTH, F. W.; KELSO, J. R. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. **Pflugers Arch.**, v. 342, p. 231-238, 1973.
- BOONYAROM, O.; INUI, K. Atrophy and Hypertrophy of skeletal muscles: Structural and functional aspects. **Acta Physiol.**, v. 188, p. 77-89, 2006.
- BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind?. **Arch. Neurol.**, v. 23, n. 4, p. 369-379, 1970.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 6023**: Informação e Documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURKE, R. Motor units: Anatomy, physiology, and functional organization. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 19, p. 221-223, 1981.

DARR, K. C.; SCHULTZ, E. Exercise induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 63, p. 1816-1821, 1987.

DA SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M.L.O.; CANCELLIERO, K. M.; DURIGAN, J. L. Q. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 979-985, 2006.

DE OLIVEIRA, F. **Características Histoquímicas das fibras do músculo gastrocnêmio medial de ratos wistar desnutridos submetidos à lesão térmica corporal**. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H. **Muscle biopsy: a modern approach**. London: W. B. Saunders., 1973.

FRIMEL, T. N.; WALTER, G. A.; GIBBS, J. D.; GAIDOSH, G. S.; VANDENBORNE, K. Noninvasive monitoring of muscle damage during reloading following limb disuse. **Muscle Nerve**, v. 32, p. 605-612, 2005.

GOLDBERG, A. L.; GOODMAN, H. M. Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. **J. Physiol.**, v. 200, p. 667-675, 1969.

GOSSELIN, L. E.; BRICE, G.; CARLSON, B.; PRAKASH, Y. S.; SIECK, G. C. Changes in satellite cell mitotic activity during acute period of unilateral diaphragm denervation. **J. Appl. Physiol.**, v. 77, p. 1128-1134, 1994.

GROS, J.; MANCEU, M.; THOMÉ, V.; MARCELLE, C. A. A common somatic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. **Nature**, v. 435, p. 954-958, 2005.

HELGE, J. W.; FRASER, A. M.; KRIKETOS, A. D.; JENKINS, A.B.; CLVERT, G. D.; AYRE, K.J.; STORLIEN, L. H. Interrelationships between muscle fiber type, substrate oxidation and body fat. **Int. J. Obes.**, v. 23, n. 9, p. 986-991, 1999.

HESLINGA, J. W.; ROZENDAL, R. H.; HUIJING, P. A. Unilateral immobilization affects contralateral rat gastrocnemius muscle architecture. **Acta Anat.**, v. 143, n. 3, p. 231-235, 1992.

ISHIKAWA, T.; SHIMIZU, M.; MIKAWA, Y.; ZHU, B. L.; QUAN, L.; ZHAO, D.; MAEDA, H. Pathology of experimental disuse muscular atrophy in rats. **Conect. Tissue Res.**, v. 46, p. 101-106, 2005.

ITAI, Y.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Morphological changes in rat hindlimb muscle fibres during recovery from disuse atrophy. **Acta Physiol. Scand.**, v. 181, p. 217-224, 2004.

JÄRVINEN, T. A. H.; JÓSZÁ, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, T. L. N.; JÄRVINEN, M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles, an immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 23, p. 245-254, 2002.

JÓSZÁ, L.; KANNUS, P.; THÖRING, J.; REFFY, A.; JÄRVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue, a morphometric and microscopic study in rat calf muscles. **J. Bone Joint Surg.**, v. 72B, p. 293-297, 1990.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 159-178.

KAUHANEN, S.; VON BOGUSLAWSKY, K.; MICHELSSON, J. E.; LEIVO, I. Satellite cell proliferation in rabbit hindlimb muscle following immobilization and remobilization: an immunohistochemical study using MIB 1 antibody. **Acta Neuropathol.**, v. 95, p. 165-170, 1998.

KELLY, A.M.; RUBINSTEIN, N.A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. **Myology**. New York: McGraw-Hill, 1993.

MANDARIM DE LACERDA, C. A. **Quantitative methods in morphology**. Rio de Janeiro: Eduerj, 1995, p. 72-77.

MATHIESEN, A. L. **Estudo morfoquantitativo dos diferentes tipos de fibras do músculo bíceps braquial de ratos wistar submetidos à desnutrição protéica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MAYO, K. H.; ELLIS, E.; CARLSON, D. S.; ARBOR, A. Histochemical characteristics of masseter and temporalis muscles after 5 weeks of maxillomandibular fixation, an investigation in *Macaca mulata*. **Oral Surg. Med. Oral Pathol.**, v. 66, n. 4, p. 421-426, 1988.

MCDONAGH, J. C.; CALISTER, R. J.; FAVRON, M. L. Resistance to disuse atrophy in a turtle hindlimb muscle. **J. Physiol. A**, v. 190, p. 321-329, 2004.

MILLER, T. A.; LESNIEWSKI, L. A.; MULLER-DELP, J. M.; MAJORS, A. K.; SCALISE, D.; DELP, M. D. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. **J. Physiol.**, v. 281, p. 1710-1717, 2001.

MUSACCHIA, X. J.; STEFEN, J. M.; FELL, R. D. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 16, p. 61-87, 1988.

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

PACHECO, M. E. **Estrutura e tipificação das fibras musculares esqueléticas do músculo gastrocnêmio medial de ratos na desnutrição e renutrição precocemente corrigida**. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PATTULLO, M. C.; COTTER, M. A.; CAMERON, N. E.; BARRY, J. A. Effects of lengthened immobilization on functional and histochemical properties of rabbit tibialis anterior muscle. **Exp. Physiol.**, v. 77, p. 433-442, 1992.

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.

PICQUET, F.; FALEMPIN, M. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. **Exp. Neurol.**, v. 182, p. 186-194, 2003.

PITSILLIDES, A. A. Early effects of embryonic movement: a shot out of the dark. **J. Anat.**, v. 208, p. 417-431, 2006.

POWNALL, M. E.; GUSTAFSSON, M. K.; EMERSON, C. P. Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 18, 747-783, 2002.

REARDON, K.A.; DAVIS, J.; KAPSA, R.M.; CHOONG, P.; BYRNE, E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v. 24, p. 893-899, 2001.

REINOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 17, p. 208-212, 1973.

SALEM, A. E.; FUHMAKI, N.; ISHIKAWA, H.; TASHIRO, T.; KOMIYA, Y. Morphological changes and recovery process in the tenotomized soleus muscle of the rat. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 64, n. 2, p. 127-137, 2001.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLOAD, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Phys. Ther.**, v. 81, p. 1810-1816, 2001.

SIMÃO, T. R. P. **Avaliação histológica e histoquímica dos efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre as fibras constituintes dos músculos bíceps braquial e pterigóideo medial de ratos wistar.** Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. **DATASUS - Banco de dados do Sistema Único de Saúde.** Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2008.

STROMER, M. H.; GOLL, D. E.; YOUNG, R. B.; ROBSON, R. M.; PARRISH Jr, F. C. Ultrastructural features of skeletal muscle differentiation and development. **J. Anim. Sci.**, v. 38, n. 5, 1974.

TABARY, T. C.; TABARY, C.; TARDIEU, C.; TARDIEU, G.; GOLDSPINK, G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. **J. Physiol.**, v. 224, p. 231-244, 1972.

TANAKA, T.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. **J. Orthop. Sci.**, v. 9, p. 76-85, 2004.

TERÄVÄINEN, H. Satellite cells of striated muscle after compression injury so light as not to cause degeneration of the muscle fibers. **Z. Zellforsch**, v. 103, p. 320-327, 1970.

TARDIEU, C.; TABARY, J. C.; TABARY, C.; TARDIEU, G. Adaptation of connective tissue length to immobilization in the lengthened and shortened position in cat soleus muscle. **J. Physiol.**, v. 78, p. 214-220, 1982.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas. **Diretrizes para apresentação de dissertação e teses da USP**: Documentos eletrônicos e impressos. São Paulo: SIBI-USP, 2004.

YANG, S.; ALNAQEEB, M.; SIMPSON, H.; GOLDSPINK, G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. **J. Anat.**, v. 190, p. 613-622, 1997.

YASUDA, N.; GLOVER, E. I.; PHILLIPS, S. M.; ISFORT, R. J.; TANOPOLSKY, M. A. Sex-based differences in skeletal muscle function and morphology with short-term limb immobilization. **J. Appl. Physiol.**, v. 99, p. 1085-1092, 2005.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscles. **J. Anat.**, v. 138, n. 2, p. 343-350, 1984.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. **J. Cell Sci.**, v. 9, p. 751-767, 1971.

WINCHESTER, P. K.; ALWAYS, S. E.; GONYEA, W. J. Satellite cell activity in the stretch induced large muscle of the quail. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. 206-212.

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