

**Vanessa de Godoi**

**Avaliação da lesão e recuperação muscular após estiramento  
em ratos diabéticos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2011

**Vanessa de Godoi**

**Avaliação da lesão e recuperação muscular após estiramento  
em ratos diabéticos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alvaro Brandão  
Lopes Martins

São Paulo  
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Godoi, Vanessa de.

Avaliação da lesão e recuperação muscular após estiramento em ratos diabéticos. / Vanessa de Godoi. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação e terapêutica experimental.

Versão do título para o inglês: Evaluation of muscle injury and recovery after stretching in diabetic rats.

Descritores: 1. Diabetes Mellitus 2. Alongamento passivo 3. Lesão muscular 4. Ratos 5. Citocinas 6. Inflamação I. Martins, Rodrigo Álvaro Brandão Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB041/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Vanessa de Godoi.

Título da Dissertação: Avaliação da lesão e recuperação muscular após estiramento em ratos diabéticos.

Orientador(a): Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

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

**Aprovado(a)**       **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



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

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

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **139** nas fls. **77** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rodrigo Álvaro Brndão Lopes Martins, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo do processo de lesão e recuperação muscular em ratos diabéticos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Vanessa de Godói, Luciano Ramos, Rodney Cappa Pallota, Rafael Paolo Rossi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.12.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2009.

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

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

À minha amada família:

Em especial ao meu pai Carlos, pelo exemplo de vida, pelo amor e dedicação inigualáveis.

À minha mãe Izamara, que juntamente com meu pai não poupou esforços para minha formação acadêmica, com muito amor e apoio incondicional.

Ao meu irmão Luciano e à minha cunhada Denise pelo carinho, incentivo e compreensão.

Ao Rafael,

Meu amor...

Pelo apoio e incentivo constantes;

Por me reerguer nos momentos difíceis;

Pela compreensão e paciência sem fim;

Pelo companheirismo, amizade e amor;

E por me fazer crer que posso alcançar sempre mais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e dons recebidos durante toda minha vida.

Ao meu orientador, Doutor Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins, pela oportunidade de fazer o mestrado, pela confiança depositada no meu trabalho e também pela paciência e conhecimento proporcionados.

Ao meu amigo, Doutor Ernesto Cesar Pinto Leal Júnior, por me auxiliar, ensinar e me guiar nesta jornada acadêmica, desde os primeiros passos até hoje.

Às técnicas Simone Aparecida Teixeira e Patrícia de Almeida Silva por toda a ajuda prestada.

Aos meus colegas de laboratório que auxiliaram na elaboração desta tese, Luciano Ramos, Rafael Paolo Rossi, Rodney Capp Pallotta, Shaiane Tomazoni, Rodrigo Labat Marcos, Lucio Frigo, Rodrigo Carvalho e Maria Carla Petrellis.

À Dra. Zuleica Bruno Fortes pela colaboração e auxílio prestados.

À Simone Sartoretto, Maria Aparecida de Oliveira e Carmen Silvia Moreno Serra pelos ensinamentos e pela paciência.

Às secretárias do departamento de farmacologia, Selma Regina Malagueta Rigonati, Julieta Aparecida Gomes dos Santos e Camila Gonçalves Trindade pelo auxílio com os assuntos burocráticos.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que embora não nomeados, prestaram o seu apoio em diversos momentos, o meu muito obrigada!

## RESUMO

GODOI, V. **Avaliação da lesão e recuperação muscular após estiramento em ratos diabéticos**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

**Introdução:** O diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune cuja suscetibilidade é determinada pela combinação de fatores químicos, genéticos e ambientais. Neste estudo avaliamos a resposta de ratos diabéticos frente a lesão muscular através de parâmetros bioquímicos e funcionais. **Materiais e métodos:** Ratos Wistar machos dos grupos lesão e lesão+diabético foram submetidos a lesão por estiramento. Cada animal foi posicionado em decúbito dorsal com o membro posterior direito firmemente preso com uma linha, que passa por uma roldana, e se prende a uma pisseta com volume de água correspondente a 150% do peso corporal do animal. Esta linha foi fixada sobre o dorso da pata, realizando uma flexão plantar, alongando o músculo tibial anterior. O animal recebeu a tração durante 40 minutos. Foram realizadas análises de extravasamento protéico, níveis de TNF- $\alpha$  pelo teste imunoenzimático, expressão gênica de miostatina por *real time* RT-PCR, índice funcional e estudo eletromiográfico. **Resultados e discussão:** O diabetes promove um prejuízo na resistência à fadiga muscular e na recuperação funcional, elevação na expressão gênica de miostatina e na expressão protéica de TNF- $\alpha$ , além de aumento do extravasamento protéico.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus. Alongamento passivo. Lesão muscular. Ratos. Citocinas. Inflamação.



## ABSTRACT

GODOI, V. **Evaluation of muscle injury and recovery after stretching in diabetic rats**. 2011. 87 p. Masters thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

**Introduction:** Type I diabetes is a autoimmune disease where its susceptibility is determined by combination of chemical, genetic and environmental factors. In this study we evaluated the response of diabetic rats to muscle injury by biochemical and functional parameters. **Materials and methods:** Male Wistar rats of injury and injury+diabetes groups were submitted to stretching induced muscle injury. Each animal was positioned in dorsal decubitus with right posterior member firmly attached with a line, passing by a sheave, and attaching to a bottle with a water volume corresponding to 150% of animal body weight. The line was attached on the dorsal side of the paw, leading to a plantar flexion, and stretching the tibial anterior muscle. The animal received traction during 40 minutes. Protein extravasation, TNF- $\alpha$  by immune-enzimatic test, myostatin genic expression by real time PCR, functional index, and electromyographic analysis were performed. **Results and discussion:** Diabetes promotes a loss in resistance to muscle fatigue and in functional recovery, enhancement in myostatin genic expression and in TNF- $\alpha$  protein expression, besides increasing protein extravasation.

**Key words:** Diabetes Mellitus. Passive stretch. Muscle injury. Rats. Cytokines. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior .....	26
Figura 2. Rato andando em um corredor com as dimensões de 42 x 8,2 cm, em direção a uma caixa colocada num dos seus extremos, deixando as suas pegadas impressas na tira de papel .....	27
Figura 3. (A) Medição dos parâmetros numa pegada de um rato normal. (B) Face plantar do pé de um rato para ilustrar a correspondência anatômica dos parâmetros avaliados. PL = Comprimento da Pegada; TS = Largura da Pegada; e ITS = Largura Intermédia da Pegada .....	28
Figura 4. Músculo tibial anterior isolado .....	29
Figura 5. Estimulação indireta do músculo tibial anterior .....	29
Gráfico 1. Glicemia basal 10 dias após a injeção de aloxana nos ratos diabéticos e injeção de salina nos ratos controle. Os dados representam a média ± EPM, n=5 (teste T Student não pareado, *p<0,0001 vs. controle) .....	33
Gráfico 2. Variação de peso 10 dias após a injeção de aloxana nos ratos diabéticos e injeção de salina nos ratos controle. Os dados representam a média ± EPM, n=10 (teste T Student não pareado, *p<0,0001 vs. controle) .....	34
Gráfico 3. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 2 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média ±EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	35
Gráfico 4. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 6 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média ±EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, **p<0,01 vs. hígido, ##p<0,01 vs. diab.) .....	36
Gráfico 5. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média ±EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido) .....	37
Gráfico 6. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 24 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média ±EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	38

Gráfico 7. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 48 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	39
Gráfico 8. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 72 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	40
Gráfico 9. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido) .....	41
Gráfico 10. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 24 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido) .....	42
Gráfico 11. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 48 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido) .....	43
Gráfico 12. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 72 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido).....	44
Gráfico 13. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	45
Gráfico 14. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 24 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, **p<0,05 vs. hígido) .....	46
Gráfico 15. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 48 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	47

Gráfico 16. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 72 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	48
Gráfico 17. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste <i>walking track</i> . Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido, ###p<0,001 vs. diabético e ##p<0,01 vs. diabético) .....	49
Gráfico 18. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste <i>walking track</i> . Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, **p<0,01 vs. hígido) .....	50
Gráfico 19. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste <i>walking track</i> . Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	51
Gráfico 20. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste <i>walking track</i> . Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	52
Gráfico 21. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido) .....	53
Gráfico 22. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido, ***p<0,001 vs. hígido, #p<0,05 vs. lesão) .....	54
Gráfico 23. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido) .....	55
Gráfico 24. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido) .....	56

Gráfico 25. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido) .....	57
Gráfico 26. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, **p<0,01 vs. hígido, ***p<0,001 vs. hígido, #p<0,05 vs. lesão) .....	58
Gráfico 27. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido) .....	59
Gráfico 28. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido) .....	60
Gráfico 29. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, **p<0,01 vs. hígido) .....	61
Gráfico 30. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido, ***p<0,001 vs. hígido) .....	62
Gráfico 31. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido) .....	63
Gráfico 32. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os	

dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido) .....	64
Gráfico 33. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ###p<0,01 vs. lesão + diabético) .....	65
Gráfico 34. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, *p<0,05 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido, +p<0,05 vs. lesão + diabético, ++p<0,01 vs. lesão + diabético) .....	66
Gráfico 35. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	67
Gráfico 36. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey) .....	68

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Diabetes mellitus</b> .....	16
<b>1.2 Modelo experimental de diabetes mellitus induzido por aloxana</b> .....	18
<b>1.3 Lesão e recuperação muscular</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
<b>3.1 Animais</b> .....	24
<b>3.2 Indução do diabetes experimental tipo 1</b> .....	24
<b>3.3 Grupos experimentais</b> .....	24
<b>3.4 Modelo de lesão muscular por estiramento</b> .....	25
<b>3.5 Análise funcional</b> .....	26
<b>3.6 Estudo eletromiográfico</b> .....	28
<b>3.7 Análises bioquímicas</b> .....	30
<b>3.7.1 Extravasamento protéico - técnica de azul de Evans</b> .....	30
<b>3.7.2 Avaliação dos níveis de citocinas em músculo esquelético</b> .....	31
<b>3.7.3 Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time rt-pcr)</b> .....	32
<b>3.8 Análise estatística</b> .....	32
<b>4 RESULTADOS</b> .....	33
<b>4.1 Glicemia</b> .....	33
<b>4.2 Variação de peso</b> .....	34
<b>4.3 Extravasamento plasmático de azul de Evans</b> .....	35
<b>4.4 Análise dos níveis de citocina TNF-a no músculo tibial anterior de ratos após protocolo de estiramento muscular</b> .....	41
<b>4.5 Quantificação da expressão gênica de miostatina pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time rt-pcr)</b> .....	45
<b>4.6 Avaliação funcional</b> .....	49
<b>4.7 Eletroestimulação indireta do músculo tibial anterior</b> .....	53
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tornou-se uma epidemia e sua prevalência vem aumentando rapidamente devido ao crescimento da população, o envelhecimento, a urbanização e o aumento da incidência da obesidade e inatividade física. Em termos mundiais, em 1985 estimava-se que existissem 30 milhões de adultos com diabetes mellitus. Esse número aumentou para 135 milhões em 1995, atingiu 171 milhões de indivíduos em 2000 e em 2002 chegou a 173 milhões. Existe uma projeção de atingir 366 milhões em 2030, dos quais dois terços habitarão países em desenvolvimento. Já em relação ao Brasil, o número de pessoas com diabetes em 2000 era de 4,6 milhões e a estimativa para 2030 é de que esse número ultrapasse 11 milhões de pessoas (WILD et al., 2004).

O diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, que é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos. O diabetes tipo 1 compreende cerca de 5 a 10% do total de pessoas diagnosticadas com diabetes mellitus (PORTH, 2005). A crescente prevalência da doença representa uma preocupação significativa para a saúde pública, devido às suas numerosas e muitas vezes, graves complicações. Dentre as quais podemos destacar a nefropatia, retinopatia, neuropatia e doenças cardiovasculares (SOSKOLNE e KLINGER, 2001). O diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune multifatorial cuja suscetibilidade é determinada pela combinação de fatores químicos, genéticos e ambientais (ROSSINI, 2004; PORTH, 2005). Modelos experimentais de diabetes mellitus têm sido utilizados há um longo tempo permitindo uma avaliação mais profunda das causas e conseqüências da doença, que são de grande importância para uma melhor compreensão do problema (ROSSINI, 2004).

Diferentes condutas, tanto farmacológicas quanto não farmacológicas tem sido prescritas para a prevenção e tratamento do paciente diabético. Dentre estas, o exercício físico é sem duvida, de grande importância. Exercícios físicos de resistência são recomendados para pacientes com diabetes mellitus devido à melhora no controle da glicose e redução de outros fatores de risco (ALBRIGHT et al., 2000). Por outro lado, lesões musculares são muito comuns na prática desportiva, podendo causar na maioria das vezes, dor e incapacidade, levando a um



comprometimento tanto nas atividades ocupacionais quanto nas atividades de lazer (KIRKENDALL e GARRETT, 2002).

A cicatrização ou reparo tecidual de lesões musculares segue um padrão morfológico, independente dos diferentes mecanismos indutores da lesão (contusão, estiramento ou ruptura) em indivíduos normais (JÄRVINEN et al., 2005). Este processo é composto por três fases: destruição, reparo e remodelamento (HURME et al., 1991).

No entanto pouco se sabe a respeito do processo de recuperação funcional e respostas bioquímicas após uma lesão músculo-esquelética na vigência do quadro de diabetes.

No entanto, pouco se sabe a respeito da dinâmica do processo de recuperação funcional e respostas bioquímicas após uma lesão muscular na vigência do quadro de diabetes.

## **1.1 Diabetes Mellitus**

O DM tipo 1, forma presente em 5% - 10% dos casos, é caracterizado por uma deficiência de insulina determinada pela destruição gradual das células produtoras de insulina no pâncreas, as células beta ou B. Na maioria dos casos essa destruição das células beta é mediada por auto-imunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo auto-imune, sendo portanto, referida como forma idiopática do DM tipo 1. Este processo, mediado pelo sistema imunológico, ocasiona um quadro permanente de hiperglicemia o qual é característico da doença. No DM tipo 1 ocorrem alterações no metabolismo de hidratos de carbono, lipídios e proteínas, assim como alterações estruturais em diversos sistemas orgânicos incluindo micro angiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macro angiopatia (doença coronariana, insuficiência arterial periférica).

Muitos fatores são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento do diabetes e suas complicações, e dentre estes estão carga genética, dieta, sedentarismo, estilo de vida, fatores perinatais, idade e obesidade (SINGH et al., 2004). O diabetes tipo 1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais freqüente antes dos 20 anos de idade. A doença acomete cerca de 0,3% das populações caucasianas, com pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de idade (LIU e EISENBARTH, 2002).

O diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune multifatorial cuja suscetibilidade é determinada pela combinação de fatores químicos, genéticos e ambientais (ROSSINI, 2004; PORTH, 2005). Este tipo de diabetes não é diretamente herdado, porém, indivíduos que apresentam um determinado antígeno leucocitário humano (HLA – Human Leucocytes Antigens), encontrado no braço curto do cromossomo 6, podem herdar uma predisposição genética ao tipo 1 (KAWABATA et al., 2009).

Neste tipo de diabetes, células linfocitárias, macrófagos e células *natural killers* promovem a destruição das células beta, este processo é conhecido como insulite. As células linfocitárias predominantes no processo de insulite são os linfócitos T CD8+ (citotóxicos), porém também pode-se detectar a presença de linfócitos T CD4+ (auxiliares ou *helper*) e linfócitos B (responsáveis pela produção de anticorpos) (BALDA e PACHECO-SILVA, 1999).

Diversos mecanismos contribuem para a destruição das células beta. É provável que muitos desses mecanismos trabalhem em conjunto para produzir a perda progressiva destas células. Os linfócitos T reagem contra os antígenos das células beta, provocando a lesão celular (JANEWAY et al., 2007). Os linfócitos T CD4+ causam a lesão tecidual através da ativação dos macrófagos enquanto os linfócitos T citotóxicos CD8+ destroem as células beta diretamente e também secretam citocinas que ativam os macrófagos (MORRAN et al., 2008). Estas citocinas produzidas localmente pelos linfócitos T, como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), e citocinas produzidas pelos macrófagos, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), são ativadas durante a reação imune lesionando as células beta. Este processo resulta em hiperglicemia crônica (BROWNLEE, 2001). As manifestações clínicas do distúrbio metabólico surgem quando cerca de 80% das células beta são destruídas (LIU e EISENBARTH, 2002). Os sintomas de hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso e às vezes com polifagia e visão turva. Comprometimento no crescimento e suscetibilidade a determinadas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica.

O DM é uma das principais causas de prejuízo na cicatrização de lesões, sendo comuns os casos de amputação como resultado de feridas que não cicatrizam (GREENHALGH, 2003). A cicatrização de feridas é uma resposta fibroproliferativa que visa substituir os tecidos lesionados ou perdidos. É um fenômeno complexo que envolve processos tais como: recrutamento de células

inflamatórias, proliferação e migração de células do tecido conjuntivo, angiogênese e em seguida, formação do tecido de granulação (MARTIN, 1997).

Vários aspectos do processo de cicatrização estão alterados no diabetes, incluindo: disfunção na resposta inflamatória, formação reduzida do tecido de granulação e angiogênese prejudicada. Tem sido proposto que o aumento do número de células apoptóticas, o agravamento da apoptose de fibroblastos e a migração reduzida de fibroblastos são alguns dos mecanismos através dos quais ocorre o prejuízo na cicatrização no DM (LIU et al., 2004; DARBY et al., 1997; LERMAN et al., 2003).

Além disso, a hiperglicemia induz um estado pró-inflamatório que inclui células inflamatórias e estresse oxidativo. A inflamação a nível celular pode ser descrita como um aumento no fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB). A ativação de NFκB induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), moléculas de adesão e outros genes que regulam a transcrição, apoptose e a proliferação celular (DANDONA et al., 2007). Apesar de a hiperglicemia induzir este estado pró-inflamatório, ela tem efeitos específicos que bloqueiam o sistema imune inato, o que provavelmente contribui para os resultados negativos observados em estudos clínicos, particularmente aqueles que demonstram aumento de complicações infecciosas (COLLIER et al., 2008).

## **1.2 Modelo experimental de diabetes mellitus induzido por aloxana**

Modelos experimentais de diabetes mellitus têm sido utilizados há um longo tempo permitindo uma avaliação mais profunda das causas e conseqüências do diabetes, que são de grande importância para uma melhor compreensão desta doença (ROSSINI, 2004). A indução de diabetes experimental em ratos, utilizando produtos químicos que destroem seletivamente as células beta pancreáticas são muito convenientes e simples de usar. Uma das substâncias mais comuns para induzir esta doença em ratos é a aloxana (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) (SZKUDELSKI, 2001).

Por ser uma molécula similar à glicose, a aloxana é transportada para dentro do citosol pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT 2) (GORUS et al., 1982). Através da inativação da enzima glicoquinase, que é o sensor de glicose das células

beta, a aloxana inibe seletivamente a secreção de insulina induzida pelo aumento da glicose, o que provoca um estado de diabetes insulino-dependente (LENZEN, 2008). Animais em jejum são mais suscetíveis à aloxana. Isso se deve ao fato de que o aumento no nível de glicose sanguínea acarreta uma competição contra a aloxana, pelo GLUT 2 (SZKUDELSKI et al., 1998).

A aloxana exerce sua ação diabetogênica quando administrada por via parenteral: intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose necessária para indução do diabetes depende da espécie animal, da via de administração e do estado nutricional (EIZIRIK et al., 1994). A dose de aloxana utilizada por via intravenosa em trabalhos prévios apresenta valores diversos como 40 mg/kg (TOLEDO et al., 2003) chegando até a 100 mg/kg de peso corporal (SINGH et al., 2009).

### **1.3 Lesão e recuperação muscular**

Pacientes com diabetes tipo 1 de longa duração apresentam um decréscimo na força muscular das articulações do tornozelo e joelho (ANDERSEN, 1998; ANDERSEN et al., 1996). A fraqueza muscular observada pode ser explicada, em parte, pela atrofia secundária à neuropatia diabética (ANDERSEN et al., 1997). Entretanto, outros mecanismos celulares e substâncias podem estar envolvidos na alteração do desempenho muscular associado ao diabetes (ARMSTRONG e PHELPS, 1984). Uma destas substâncias parece ser a miostatina, apontada por alguns estudos como uma das responsáveis pela inibição do crescimento muscular. Esta afirmação é sustentada por evidências de que a inibição da miostatina suprime dramaticamente o aumento de massa muscular em várias espécies animais (McPHERRON et al., 1997; MCPHERRON e LEE, 1997; SHELTON e ENGVALL, 2007; CLOP et al., 2006) e em humanos (WILLIAMS, 2004).

Exercícios físicos de resistência são recomendados para pacientes com diabetes devido à melhora no controle da glicose e redução de outros fatores de risco (ALBRIGHT et al., 2000). Em indivíduos saudáveis, este tipo de atividade física promove aumento no número de capilares (GUTE et al., 1996), diminuição da espessura da membrana basal capilar (WILLIAMSON et al., 1996) e vasodilatação, melhorando assim o fluxo sanguíneo (CAMERON et al., 1992), o qual é necessário para o fornecimento de aminoácidos para os músculos e estimulação da síntese

protéica (TIPTON e WOLFE, 1998). Além disso, o exercício de resistência aumenta o fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1) (ELIAKIM et al., 1997; FEDELE et al., 2001), o qual tem o potencial de manter a massa muscular por ativação de células satélite (CHAKRAVARTHY et al., 2000) e redução da quebra de proteínas (KEE et al., 2002).

A lesão muscular decorrente da prática desportiva é muito comum em indivíduos ativos, causando na maioria das vezes dor e incapacidade, levando a um comprometimento tanto nas atividades ocupacionais quanto nas atividades de lazer (KIRKENDALL e GARRETT, 2002). De acordo com estudos realizados nos Estados Unidos, as lesões por contusão e por estiramento muscular correspondem a aproximadamente 90% de todas as lesões relacionadas ao esporte (CRISCO et al., 1994; GARRETT Jr., 1990). Estas lesões são muitas vezes localizadas próximas a junção miotendínea dos músculos superficiais biarticulares, como o reto femoral, semitendíneo e gastrocnêmio, por exemplo.

As principais alterações morfológicas que ocorrem nas fibras musculares estriadas esqueléticas após lesão por estiramento são identificadas por desarranjos e rompimento de miofilamentos, linha Z e sarcômeros, rompimento da arquitetura e desorganização das organelas, rompimento do sarcolema, acentuada atividade lisossomal, presença de células inflamatórias e/ou células satélite, basofilia e hipercontração de miofilamentos (GARRETT JR., 1996).

A magnitude da resposta inflamatória depende de dois fatores principais: a gravidade do dano e o grau de vascularização do tecido no momento da lesão (MERRICK, 2002). Após uma lesão muscular, ocorre ruptura de capilares e consequente chegada de células inflamatórias e citocinas ao local da lesão (TIDBALL, 2005; MERRICK, 2002). Posteriormente, as substâncias liberadas das partes necrosadas das fibras musculares atuam como quimiotáticos e aumentam ainda mais o extravasamento de células inflamatórias. Macrófagos e fibroblastos também são ativados e fornecem mais sinais quimiotáticos (por exemplo, fatores de crescimento) para células inflamatórias (TIDBALL, 1995).

Na resposta inicial à lesão músculo-esquelética, fatores quimiotáticos estimulam a infiltração de neutrófilos, incluindo prostaglandinas, TNF- $\alpha$  e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6. Na fase aguda, os neutrófilos são as células mais abundantes no sítio da lesão, mas dentro das primeiras 24 horas, o número de neutrófilos começa a decair e a quantidade de macrófagos aumenta (TIDBALL,

2005). Estas células produzem enzimas proteolíticas que realizam a fagocitose do material necrótico e reparo do tecido lesionado, porém, esta resposta não é específica, podendo acarretar lesão de células normais adjacentes ao local lesionado (HONG et al., 2009). Apesar deste declínio, os neutrófilos permanecem funcionalmente ativos e sua quantidade no sítio de lesão ainda se mantém elevada comparada ao nível basal, por aproximadamente cinco dias, após os quais sua atividade retorna gradualmente aos níveis pré-lesão (BUNN et al., 2004; SHEPHARD e SHEK, 1998). Notavelmente, a lâmina basal que circunda as partes necrosadas das fibras musculares é resistente ao ataque dos macrófagos, que permanece intacta e serve como um arcabouço dentro do qual as células satélite viáveis começam a formação de novas fibras musculares (HURME e KALIMO, 1992).

A cicatrização de lesões musculares segue um padrão razoavelmente similar, independente dos diferentes mecanismos indutores da lesão (contusão, estiramento ou ruptura) (JÄRVINEN et al., 2005). Este processo é composto por três fases (HURME et al., 1991):

- 1) Destruição: caracterizada pela ruptura e necrose subsequente de fibras musculares, formação de hematoma entre as fibras rompidas e uma reação de células inflamatórias.
- 2) Reparo: é constituída por fagocitose do tecido necrosado, regeneração de fibras musculares e produção concomitante de uma cicatriz de tecido conjuntivo bem como revascularização com surgimento de capilares na área lesada.
- 3) Remodelamento: período durante o qual ocorre a maturação de fibras musculares regeneradas, a contração e reorganização do tecido cicatricial e a recuperação da capacidade funcional do músculo.

Quando ocorre a formação de cicatriz fibrótica, subsequente a dano tecidual, ela está associada a uma recuperação lenta e incompleta da força muscular (FOSTER et al., 2003). Alguns estudos sugerem que a fibrose ocasionada após lesão, pode ser a causa de rupturas musculares recorrentes (GRECO et al., 1991; KUJALA et al., 1997). Há muito tempo é investigado se a diminuição na quantidade de macrófagos (como na fase tardia da inflamação) teria conseqüências negativas sobre o processo de cicatrização, incluindo a redução da regeneração muscular, da

diferenciação de células satélite e do crescimento de fibras musculares (LEIBOVICH e ROSS, 1975; TIDBALL e WEHLING-HENRICKS, 2007).

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo inflamatório e aspectos funcionais decorrentes da lesão muscular por estiramento em ratos diabéticos, comparados a ratos não diabéticos. Neste contexto, pretendemos contribuir para o entendimento da reação inflamatória na vigência do estado de hiperglicemia, onde o exercício físico é indicado e lesões musculares ocorrem com frequência.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando em torno de 200g, com 8 a 10 semanas de vida, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP. Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura (22-24 °C), umidade relativa (40-60%), ciclo de 12 horas claro-escuro com água e ração *ad libitum*. Nossos protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB\_USP) ( n° 139).

#### 3.2 Indução do Diabetes Experimental tipo 1

Após restrição alimentar de 12 horas, o diabetes foi induzido por injeção intravenosa (veia caudal) de aloxana (40 mg/kg), dissolvida em solução salina (cloreto de sódio 0,9%). Ratos do grupo controle receberam igual volume de solução salina. Após o período de dez dias, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais que receberam aloxana e dos animais controle para análise de glicemia por meio de glicosímetro portátil Accu-Chek® (Roche Diagnóstica Brasil Ltda., São Paulo, S.P., Brasil). Aqueles animais que receberam a injeção de aloxana e que apresentaram glicemia < 200mg/dL não foram utilizados no experimento. Os animais (grupo hígido, lesão, lesão diabético e diabético) foram pesados no dia da indução do diabetes e novamente após 10 dias.

#### 3.3 Grupos Experimentais

Os ratos que receberam aloxana e que apresentaram glicemia > 200mg/dL foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco animais: *grupo lesão diabético* e *grupo diabético*. Os animais do grupo controle foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 5 animais: *grupo hígido* e *grupo lesão*. Os procedimentos pelos quais os grupos passaram estão descritos a seguir.

*Grupo hígido* – os animais não sofreram nenhum tipo de procedimento.

*Grupo lesão* – os animais foram submetidos ao protocolo de lesão muscular por estiramento.

*Grupo lesão diabético* – animais diabéticos que foram submetidos ao protocolo de lesão muscular por estiramento dez dias após a indução do diabetes experimental.

*Grupo diabético* – animais diabéticos sem lesão.

O músculo tibial anterior foi coletado para análise nos períodos de 12, 24, 48 e 72 horas após a lesão muscular, seguida de eutanásia por dose excessiva do anestésico inalatório Halotano.

### **3.4 Modelo de Lesão Muscular por Estiramento**

O protocolo de lesão muscular do músculo tibial anterior utilizado neste trabalho foi desenvolvido em nosso laboratório baseado em um protocolo de Nikolaou et al. (1987). Segundo o protocolo original de Nikolaou, o alongamento era realizado diretamente no tendão distal do músculo tibial anterior. Neste momento era realizada uma avulsão, a fim de separar o músculo tibial do tecido subcutâneo juntamente com a pele. Para tal procedimento adentrava-se no pequeno corte já realizado com uma tesoura fechada sobre o músculo, retornando no sentido caudal com a tesoura aberta, expondo todo o músculo do animal. Em seguida, com o auxílio de um bisturi, o tendão era separado de sua inserção. Ao término do alongamento, a incisão era fechada e o animal recebia uma única dose de antibiótico.

No novo protocolo, desenvolvido e padronizado em nosso laboratório, ao contrário do protocolo de Nikolaou et al. (1987), realizamos o alongamento/estiramento muscular sem exposição cirúrgica do músculo, para evitar uma exacerbação do processo inflamatório pelo procedimento cirúrgico ou possíveis infecções oportunistas.

Os animais dos grupos lesão e lesão diabético foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente; König, Avellaneda, Argentina), por via intraperitoneal (i.p), antes de serem submetidos ao protocolo de alongamento passivo do músculo tibial anterior.

Após a pesagem, cada animal foi posicionado em decúbito dorsal, sobre cortiça acoplada ao sistema de alongamento (Figura 1). O membro posterior direito

ficou firmemente preso com uma linha que passa por uma roldana e se prende a uma pisseta com volume de água correspondente a 150% do peso corporal do animal. Esta linha foi fixada sobre o dorso da pata do animal, realizando uma flexão plantar, alongando o músculo tibial anterior da pata posterior direita do animal. O protocolo foi realizado uma única vez sendo que o animal recebeu a tração durante 40 minutos.



Figura 1. Sistema utilizado para alongamento do músculo tibial anterior

### 3.5 Análise Funcional

A avaliação funcional foi realizada utilizando a *walking track analysis*, descrita por De Medinacelli, 1982. Na *walking track analysis* o animal foi colocado em um corredor de madeira com acesso a um ambiente escuro e sobre o corredor foi colocado um papel com a mesma largura, o rato testado estava com as patas traseiras marcadas com tinta. O início da avaliação se deu com o animal sendo liberado no início do corredor, por onde caminhou em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as marcas das patas traseiras (Figura 2). Todos os ratos tiveram uma adaptação e exploração do local.

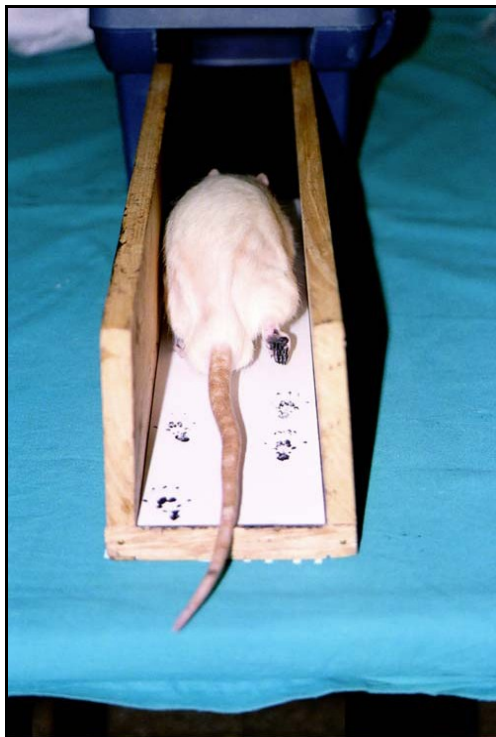


Figura 2. Rato andando em um corredor com as dimensões de 42 x 8,2 cm, em direção a uma caixa colocada num dos seus extremos, deixando as suas pegadas impressas na tira de papel.  
Fonte: Varejão et al. (2001).

O teste foi realizado antes do protocolo de alongamento para registro da normalidade de cada animal e uma hora antes do sacrifício. As seguintes medidas foram coletadas com paquímetro após o registro em papel: 1) o espaço entre a segunda e a quarta falange distal (ITS *intermediary toe spready*); 2) o espaço entre a primeira e a quinta falange distal (TS *toe spready*); e 3) o espaço entre a borda proximal do pé e a terceira falange distal (PL *print length*) (figura 3).

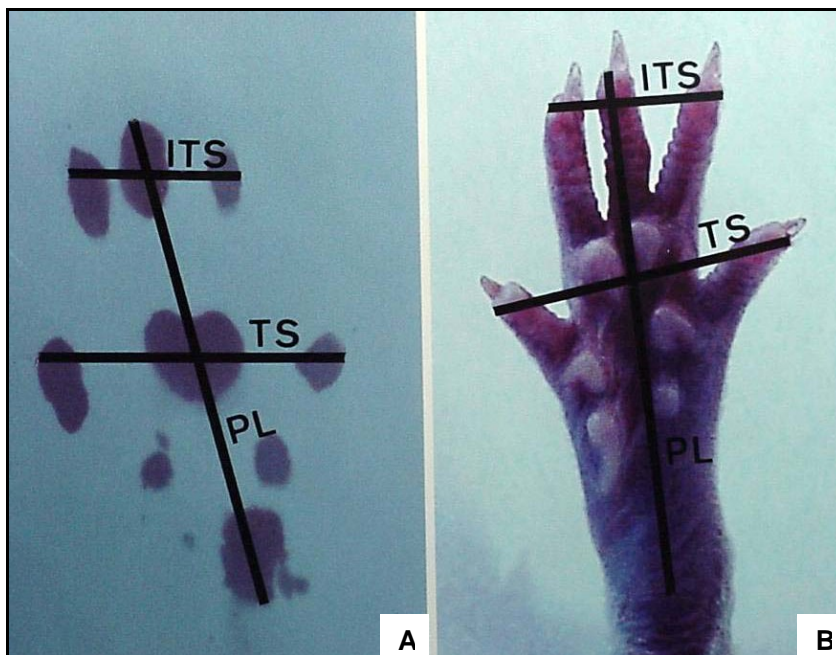


Figura 3. **(A)** Medição dos parâmetros numa pegada de um rato normal. **(B)** Face plantar do pé de um rato para ilustrar a correspondência anatômica dos parâmetros avaliados. PL = Comprimento da Pegada; TS = Largura da Pegada; e ITS = Largura Intermédia da Pegada.  
Fonte: Varejão et al. (2001).

Após serem calculados os valores nos testes de *walking track*, foi realizado o cálculo do SFI (sciatic function index) antes do protocolo de alongamento para registro da normalidade de cada animal (pré lesão) e também uma hora antes do sacrifício (pós lesão), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{SFI} = - 38,3 \times \frac{\text{EPL} - \text{NPL}}{\text{NPL}} + 109,5 \times \frac{\text{ETS} - \text{NTS}}{\text{NTS}} + 13,3 \times \frac{\text{EITS} - \text{NITS}}{\text{NITS}} - 8,8$$

As medidas foram identificadas pela letra E, para a pata em estudo, e pela letra N, para a pata normal.

Para a interpretação dos resultados, foram subtraídas as médias pós lesão da pré lesão de cada animal. Quanto maior o resultado do SFI, mais alterações nos padrões de deambulação foram apresentados pelo animal.

### 3.6 Estudo Eletromiográfico

O animal foi anestesiado com Cetamina e Xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente) e fixado numa mesa cirúrgica. Em seguida, o animal foi submetido a um pequeno corte na pele próximo a região dorsal do metatarso. Neste momento foi realizada uma avulsão, a fim de separar o músculo tibial do tecido subcutâneo

juntamente com a pele, para tal procedimento adentramos no pequeno corte já realizado com uma tesoura fechada sobre o músculo, retornando no sentido caudal com a tesoura aberta, expondo todo o músculo do animal. Então, com o auxílio de um bisturi, o tendão foi separado de sua inserção e amarrado a um fio. O próximo passo foi remover a fáscia muscular e dessa forma tornando mais fácil para isolar o músculo. Após a secção, o músculo foi puxado no sentido contrário a sua inserção através do fio, de forma a ficar isolado da tíbia (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Músculo tibial anterior isolado.  
Fonte: Lopes-Martins (2002).

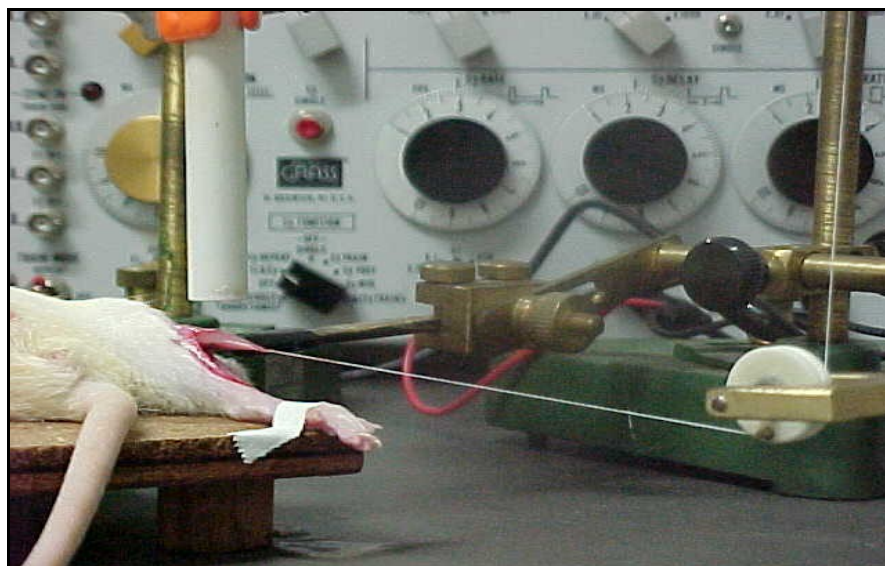


Figura 5. Estimulação indireta do músculo tibial anterior.  
Fonte: Lopes-Martins (2002).

Durante todo o procedimento de estimulação do músculo tibial anterior, o mesmo foi hidratado com solução salina (0,09%). Na região da inserção, próximo a região dorsal do metatarso, o músculo foi conectado através do tendão a um transdutor isométrico (Ugo Basile®; Varese, Italy) e o nervo ciático a um eletrodo bipolar.

O músculo foi submetido a uma tensão constante de 10g. A preparação foi estimulada indiretamente por pulsos de 6-7V, 0,2Hz e 2ms. de duração. As contrações musculares em resposta aos estímulos indiretos foram registradas em fisiógrafo GEMINI 7070 da UGO BASILE® (Ugo Basile Srl., Milão, Itália) através do transdutor isométrico. Para induzir a contração tetânica, elevou-se a frequência para 60Hz. A fadiga muscular foi caracterizada pela incapacidade de se manter a contração muscular, havendo o decaimento da amplitude em 50% da máxima registrada, para se evitar a morte do tecido, decorrente da contração tetânica.

Para cada grupo, foram realizadas as contrações tetânicas a cada 5 minutos, no período de 15 minutos, perfazendo um total de 3 contrações para cada animal de cada grupo.

A partir dos registros, foram analisados:

- a) a intensidade da força de contração (amplitude) em gramas;
- b) o tempo necessário para que a contração decaísse a metade da máxima (50% de fadiga muscular) em segundos;
- c) a área sob a curva tempo X intensidade.

### **3.7 Análises Bioquímicas**

#### ***3.7.1 Extravasamento Protéico – Técnica de Azul de Evans***

A determinação do extravasamento protéico, avaliado pela técnica que utiliza o corante Azul de Evans como marcador de alteração de permeabilidade vascular em músculo tibial anterior de ratos foi realizada de acordo com Moitra et al. (2007). Uma solução de azul de Evans a 2,5%, MERCK® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) artigo 3169, foi preparada em solução salina e posteriormente filtrada em membrana esterilizante (0,22µm; MILLIPORE®, Millipore Corporation, Billerica, M.A., EUA).

Após anestesia com Cetamina e Xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente), os animais receberam o corante azul de Evans (25mg/Kg, intravenosa) 1h antes de serem sacrificados. Após o sacrifício dos animais, com superdose de anestésico, o músculo tibial anterior foi coletado, pesado e posteriormente conservado por 24 horas a 37 °C em um tubo de vidro com solução de formamida (MERCK artigo 9684.1000, 5ml/g) para extração do azul de Evans das amostras do músculo.

Em seguida, os tubos foram agitados mecanicamente por 15 segundos em agitador PHOENIX® (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, São Paulo, S.P., Brasil) modelo AT 56 e finalmente 200 µl do corante extraído pela formamida foram transferidos para micro placas de 96 poços para leitura de absorbância em leitor de ELISA (Espectra Max plus 384, EUA) a 620 nm. A solução de formamida foi usada como branco para o teste. As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante (concentrações entre 1000 e 9 µM). As concentrações das amostras foram calculadas em nanogramas de azul de Evans por miligrama de tecido muscular.

### ***3.7.2 Avaliação dos níveis de citocinas em músculo esquelético***

As dosagens da citocina TNF-a nas amostras de tibial anterior foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D System, EUA). Para isto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µl de anticorpo monoclonal para TNF- a (anti-TNF-a). O anti-TNF-a foi diluído em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). As placas foram incubadas (4 °C) por 18 horas. Para o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 4 vezes e depois preenchidas com 300µl/poço de solução de bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma) à 37 °C por 3 horas e submetidas a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100µl das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas por 18 horas em temperatura de 4 °C. Após lavagem, 100µl do anticorpo biotilado específico de detecção para a citocina foi acrescentado e deixado por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100µl de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por 1 hora em temperatura



ambiente (22 °C) seguida de novas lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100µl/poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50µl/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max Plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm com correção de 570nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para TNF-a foi de 1,95 pg/ml.

### ***3.7.3 Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR)***

A expressão gênica da enzima miostatina foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O músculo tibial anterior direito, depois de removido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e permaneceu a -80°C até o processamento. O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Gibco BRL, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com DNase, a síntese dos cDNAs foram processadas pelo método da transcriptase reversa empregando a enzima SuperScript (Invitrogen) a partir de 2 µg de RNA total e na presença de mistura de primers randômicos e oligo dT. Os experimentos de Real-Time PCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 minutos a 95 °C, e 40 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95 °C e 1 minutos de anelamento e extensão a 60 °C); as sequências dos primers são as mesmas utilizadas por Wang et al. (2004). Os resultados foram interpretados usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Ct: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo - background) que relaciona a expressão do gene de interesse comparado aquela do gene controle  $\beta$ -actina.

### **3.8 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  EPM e submetidos ao teste t-Student não pareado ou análise de variância (ANOVA) seguida da aplicação do teste *Tukey* para múltiplas comparações. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Glicemia

No gráfico 01 podemos observar os dados relativos aos níveis glicêmicos dos grupos controle e diabético. A glicemia basal após 4 horas de privação alimentar foi significativamente elevada nos ratos **diabéticos (490 ± 31)** quando comparados aos animais do grupo **controle (110 ± 2,8)** com ★ $p < 0,0001$ .

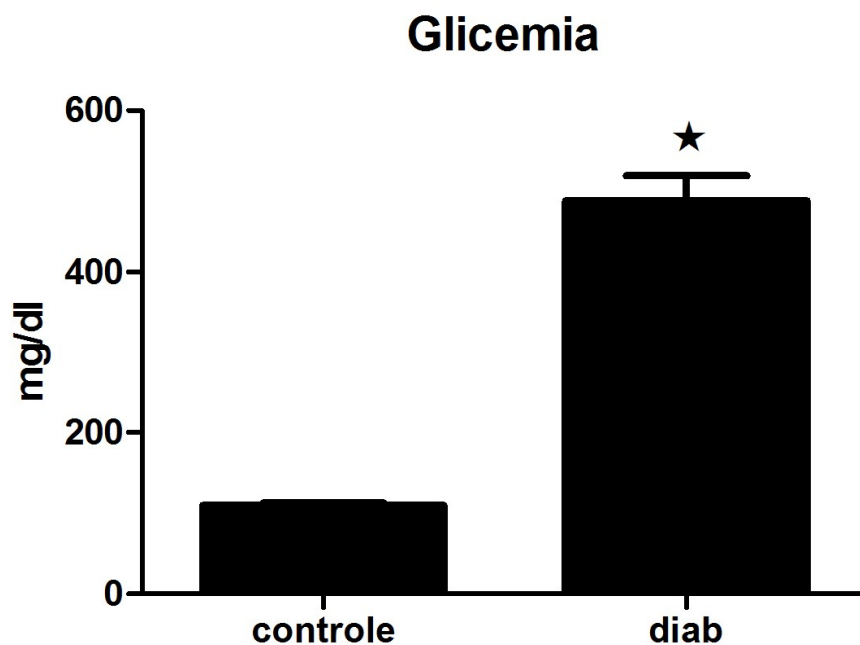


Gráfico 1. Glicemia basal 10 dias após a injeção de aloxana nos ratos diabéticos e injeção de salina nos ratos controle. Os dados representam a média ±EPM, n=5 (teste t-Student não pareado, ★ $p < 0,0001$  vs. controle).

## 4.2 Variação de Peso

O gráfico 2 demonstra a variação de peso corporal nos ratos controle, dez dias após injeção de salina, e nos ratos diabéticos, dez dias após a injeção de aloxana. Podemos observar que os animais **diabéticos (-20 ± 5,2)** apresentaram perda significativa de peso corporal quando comparados aos animais do grupo **controle (49 ± 4,5)** com ★ $p < 0,0001$ .

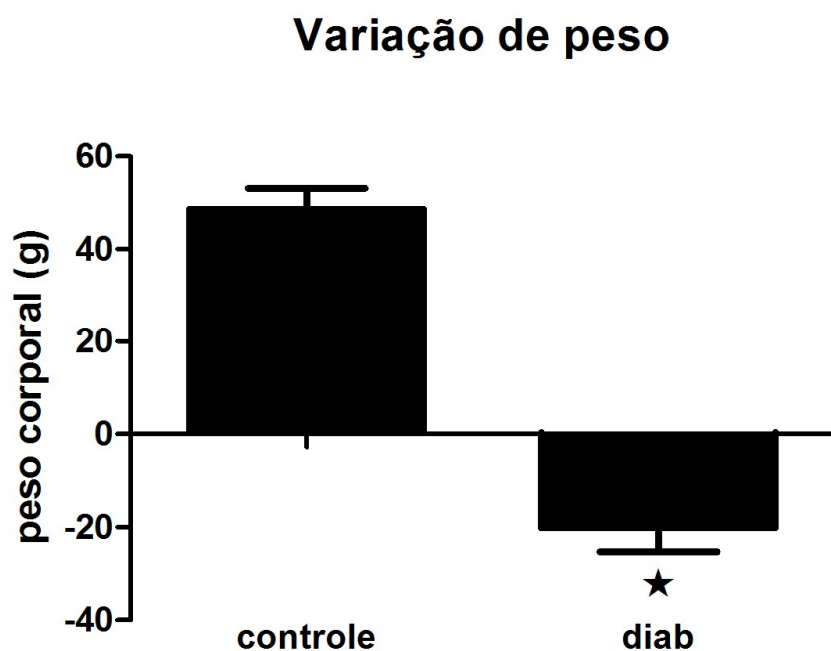


Gráfico 2. Variação de peso 10 dias após a injeção de aloxana nos ratos diabéticos e injeção de salina nos ratos controle. Os dados representam a média ±EPM, n=10 (teste t-Student não pareado, ★ $p < 0,0001$  vs. controle).

### 4.3 Extravasamento Plasmático por Azul de Evans

O Gráfico 3 demonstra o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, diabético, lesão e lesão + diabético) no período de 2 horas após protocolo de alongamento passivo. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de extravasamento de Azul de Evans.

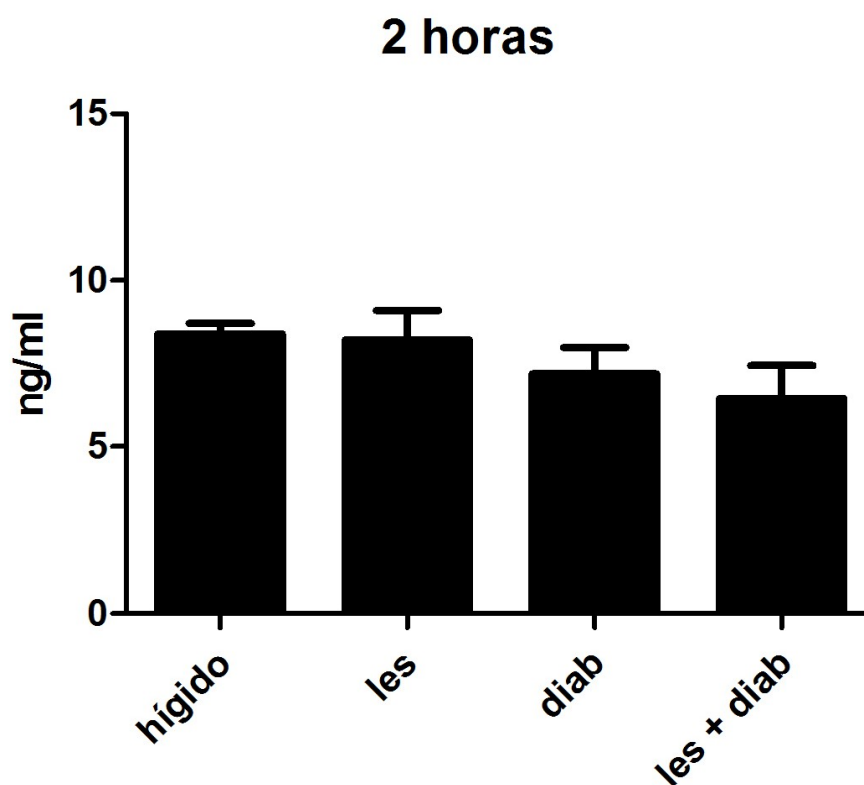


Gráfico 3. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 2 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

O Gráfico 4 demonstra o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, diabético, lesão e lesão + diabético) no período de 6 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos um aumento significativo do extravasamento do grupo **lesão** ( $12 \pm 0,30$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $8,4 \pm 0,31$ ) com  $**p < 0,01$  e também do grupo **lesão** ( $12 \pm 0,30$ ) comparado ao grupo **diabético** ( $8,5 \pm 0,75$ ) com  $##p < 0,01$ .

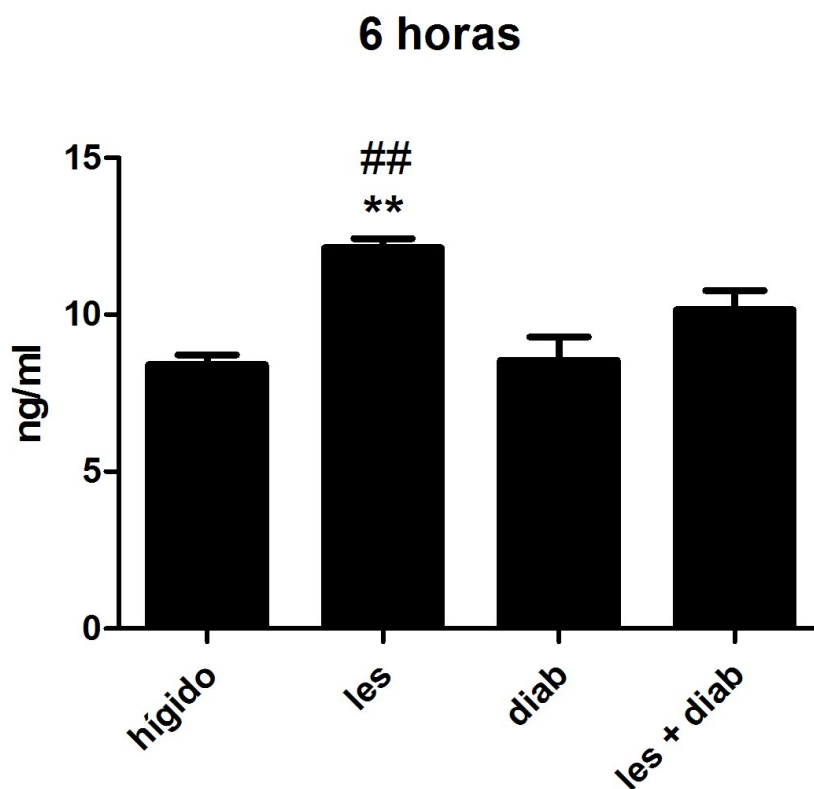


Gráfico 4. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 6 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $**p < 0,01$  vs. hígido,  $##p < 0,01$  vs. diab.).

O Gráfico 5 demonstra o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, diabético, lesão e lesão + diabético) no período de 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos um aumento significativo do extravasamento do grupo **lesão** ( $9,3 \pm 1$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $4,9 \pm 0,86$ ) com  $**p < 0,01$  e também do grupo **lesão + diabético** ( $8,5 \pm 0,43$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $4,9 \pm 0,86$ ) com  $*p < 0,05$ .

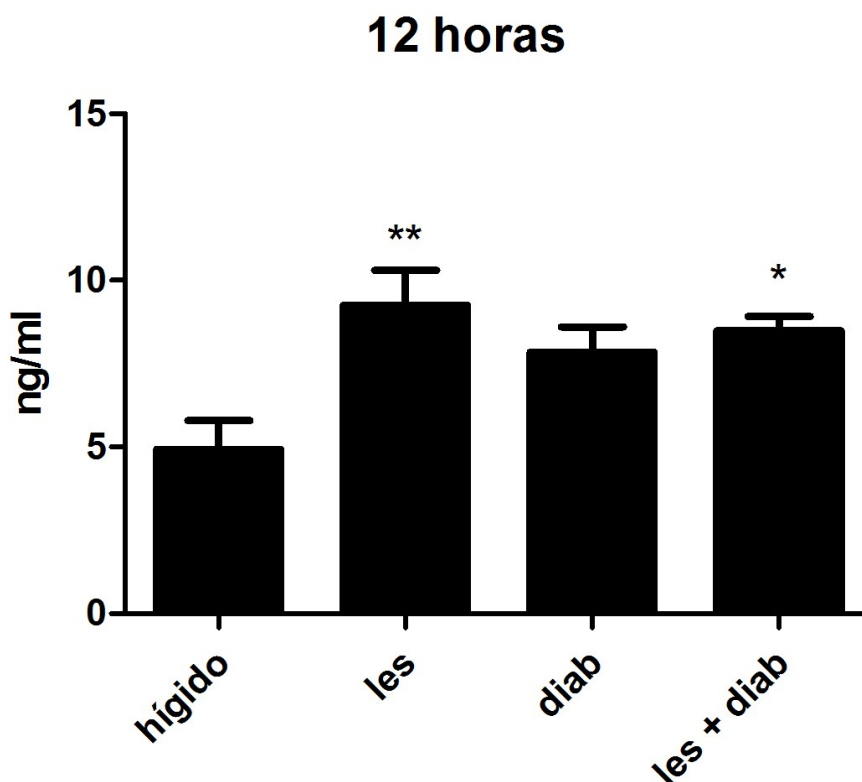


Gráfico 5. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p < 0,05$  vs. hígido,  $**p < 0,01$  vs. hígido).

O Gráfico 6 demonstra o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, diabético, lesão e lesão + diabético) no período de 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de extravasamento de Azul de Evans.

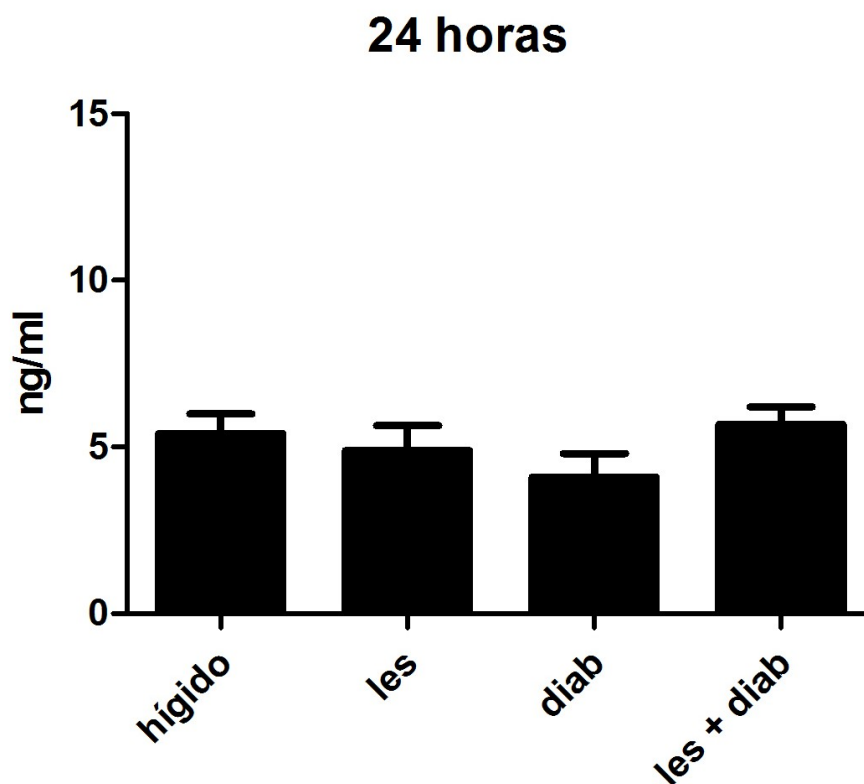


Gráfico 6. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 24 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

O Gráfico 7 demonstra o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, diabético, lesão e lesão + diabético) no período de 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de extravasamento de Azul de Evans.

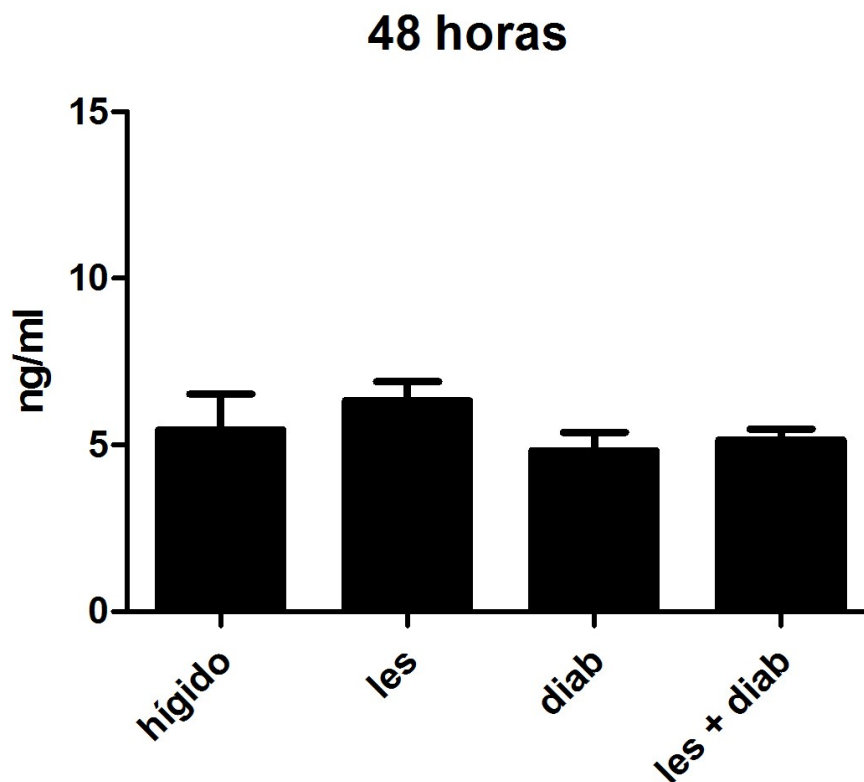


Gráfico 7. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 48 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).



O Gráfico 8 demonstra o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, diabético, lesão e lesão + diabético) no período de 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de extravasamento de Azul de Evans.

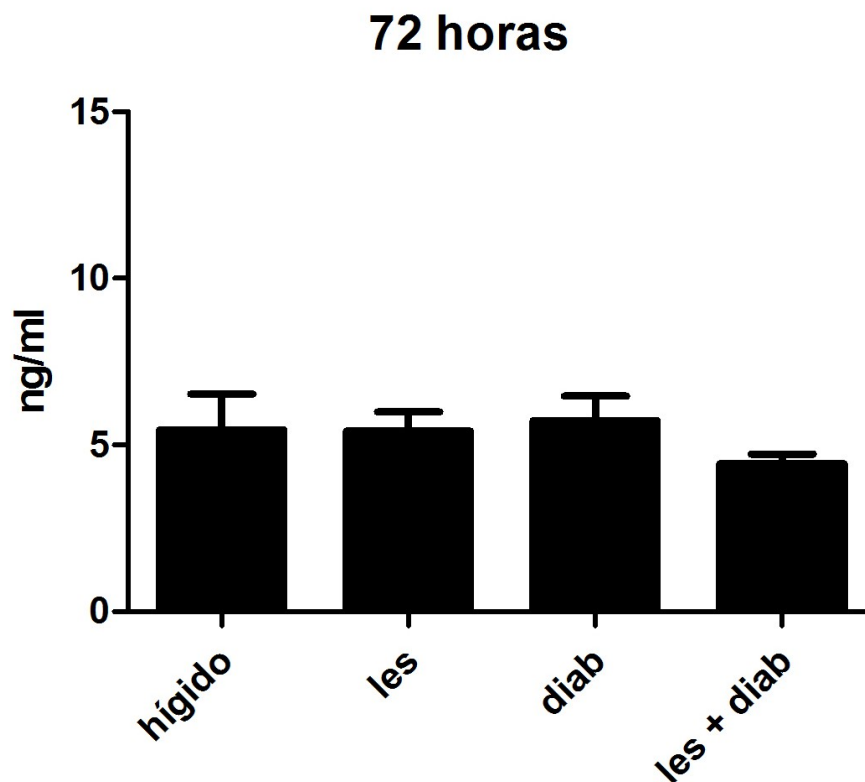


Gráfico 8. Extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 72 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

#### 4.4 Análise dos níveis de TNF-a no músculo tibial anterior de ratos após protocolo de estiramento muscular

O Gráfico 9 demonstra os níveis de TNF-a no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, lesão, diabético e lesão+diabético) 12 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de TNF-a nos grupos **lesão (720 ± 38)**, **diabético (819 ± 41)** e **lesão + diabético (800 ± 33)** quando comparados com o grupo **hígido (190 ± 39)** com \*\*\*p<0,001.

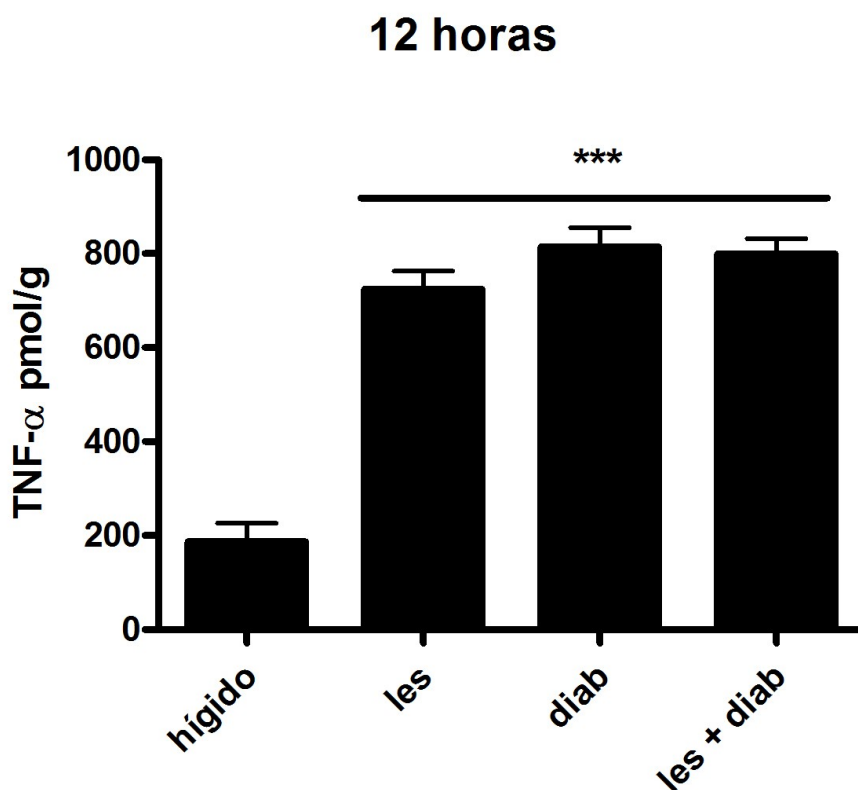


Gráfico 9. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, \*\*\*p<0,001 vs. hígido).

O Gráfico 10 demonstra um aumento nos níveis de TNF-a, 24 horas após o protocolo de alongamento passivo no músculo tibial anterior de ratos nos grupos **lesão** ( $660 \pm 56$ ), **diabético** ( $520 \pm 50$ ) e **lesão+diabético** ( $590 \pm 76$ ) quando comparados ao grupo **hígido** ( $190 \pm 39$ ) com  $***p<0,001$ ,  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  respectivamente.

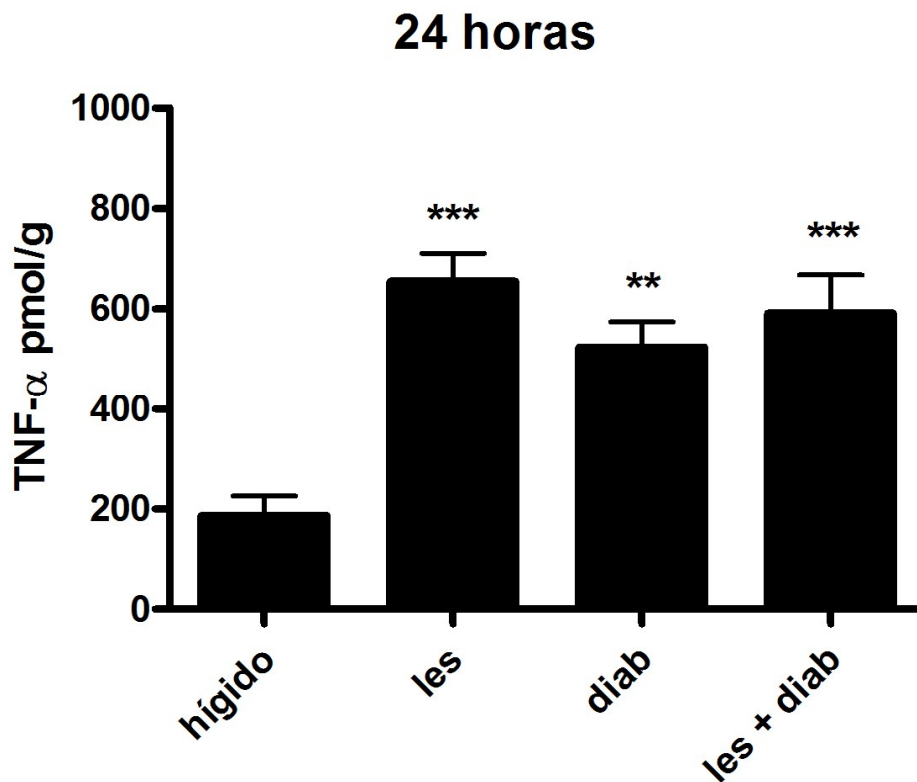


Gráfico 10. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 24 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $***p<0,001$  vs. hígido,  $**p<0,01$  vs. hígido).

O Gráfico 11 demonstra os níveis de TNF-a no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, lesão, diabético e lesão+diabético) 48 horas após o protocolo de alongamento passivo. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos níveis de TNF-a nos grupos **lesão (550 ± 32)**, **diabético (490 ± 46)** e **lesão+diabético (430 ± 55)** quando comparados ao grupo **hígido (190 ± 39)** com \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,01$  respectivamente.

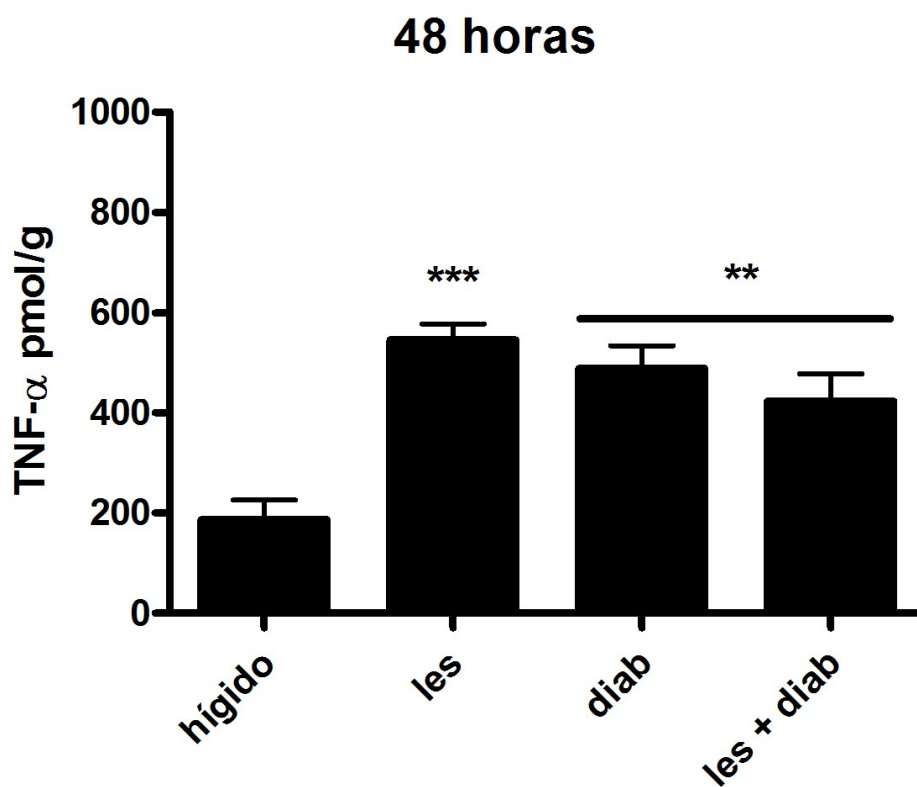


Gráfico 11. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 48 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, \*\*\* $p < 0,001$  vs. hígido, \*\* $p < 0,01$  vs. hígido).

O Gráfico12 demonstra um aumento nos níveis de TNF-a, 72 horas após o protocolo de alongamento passivo no músculo tibial anterior de ratos nos grupos **lesão (600 ± 120)**, **diabético (470 ± 28)** e **lesão+diabético (510 ± 36)** quando comparados ao grupo **hígido (190 ± 39)** com **\*\*\*p<0,001**, **\*\*p<0,01** e **\*\*p<0,01** respectivamente.

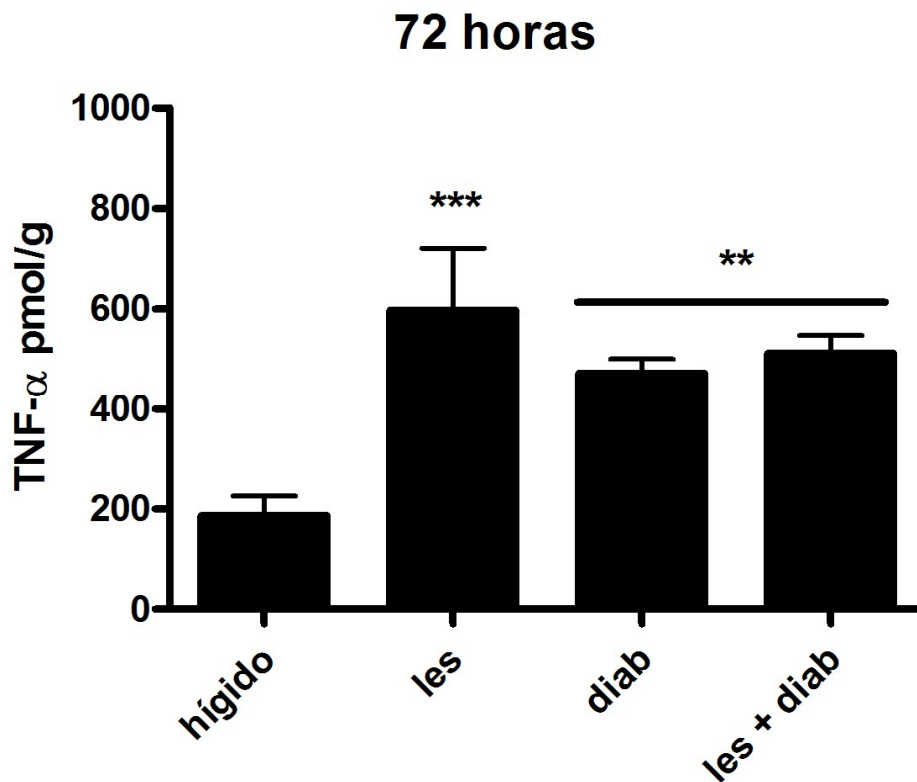


Gráfico 12. Níveis de TNF-a em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 72 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, \*\*\*p<0,001 vs. hígido, \*\*p<0,01 vs. hígido).

#### 4.5 Quantificação da expressão gênica de miostatina pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (Real Time RT-PCR)

O gráfico 13 demonstra a expressão gênica de miostatina no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, lesão, diabético e lesão + diabético) no período de 12 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de expressão gênica da miostatina.

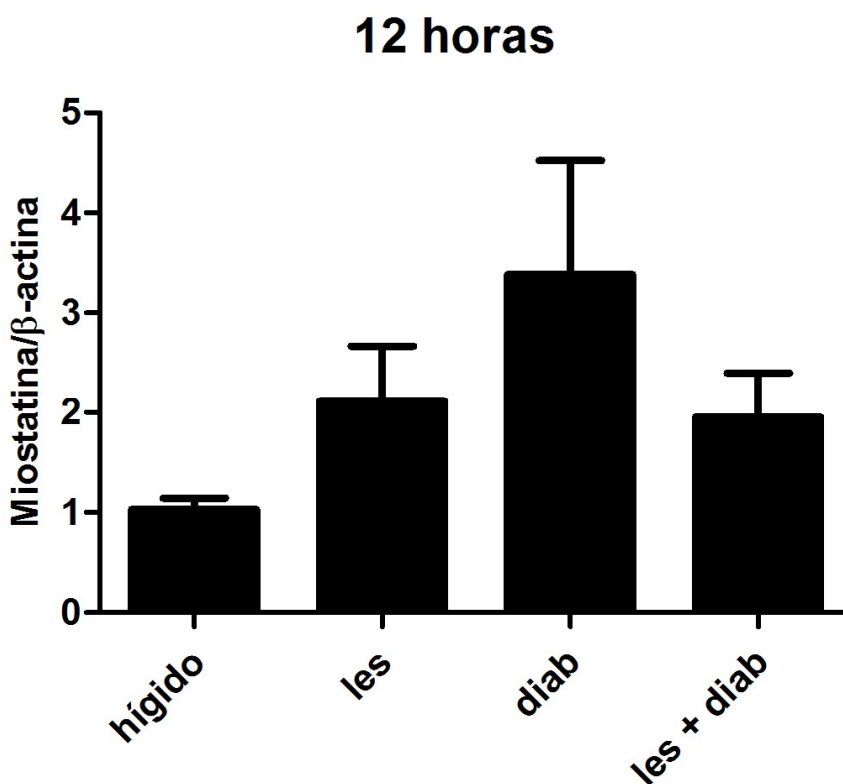


Gráfico 13. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

O gráfico 14 demonstra a expressão gênica de miostatina no músculo tibial anterior de ratos no período de 24 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento. Observamos um aumento estatisticamente significativo na expressão gênica de miostatina no grupo **diabético (2,8 ± 0,26)** e **lesão + diabético (3,2 ± 0,56)** comparados ao grupo **hígido (1,0 ± 0,11)** com **\*\*p<0,01**.

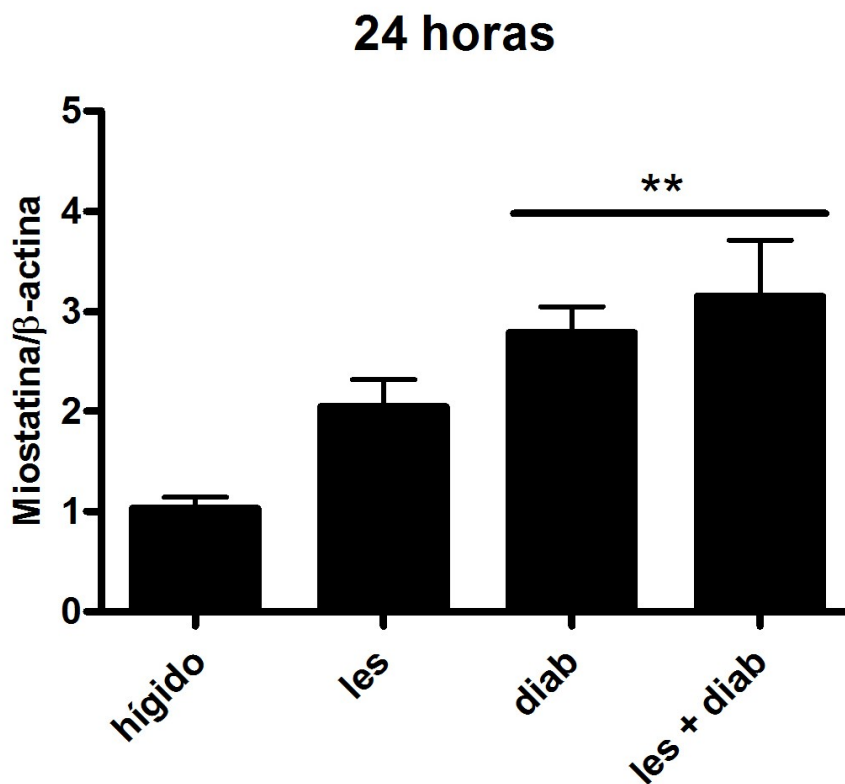


Gráfico 14. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 24 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média ±EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, \*\*p<0,05 vs. hígido).

O gráfico 15 demonstra a expressão gênica de miostatina no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, lesão, diabético e lesão + diabético) no período de 48 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de expressão gênica da miostatina.

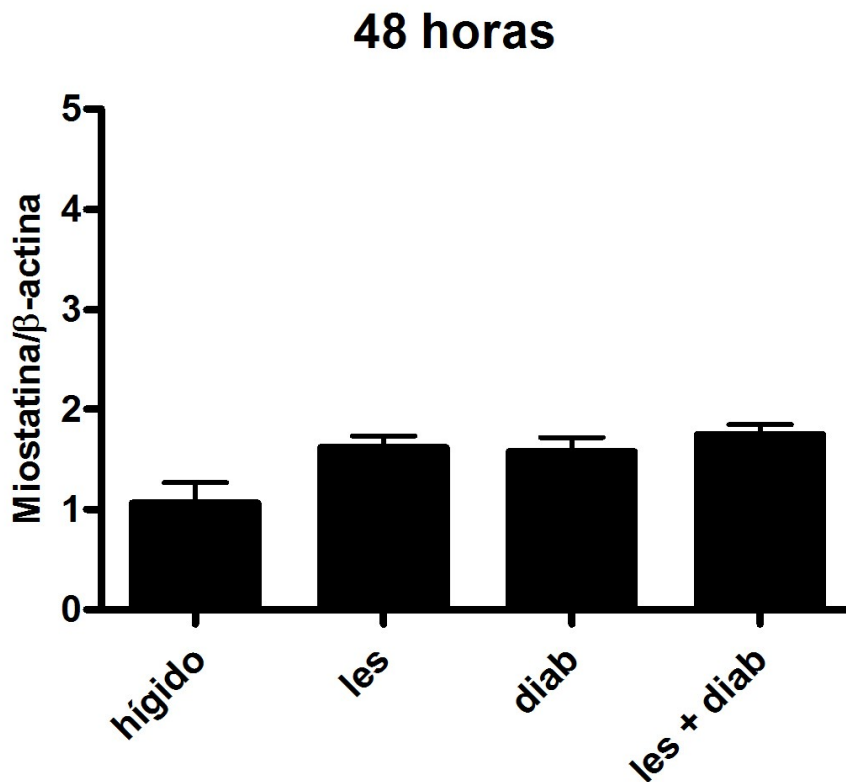


Gráfico 15. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 48 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).



O gráfico 16 demonstra a expressão gênica de miostatina no músculo tibial anterior de ratos nos diferentes grupos (hígido, lesão, diabético e lesão + diabético) no período de 72 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de expressão gênica da miostatina.

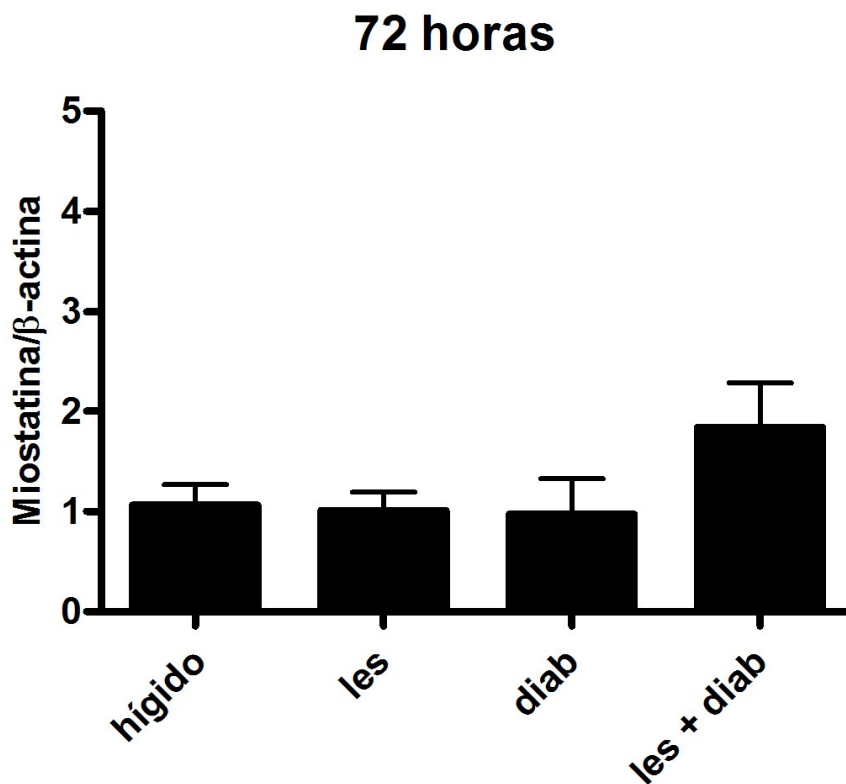


Gráfico 16. Quantificação da expressão gênica de miostatina em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 72 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

#### 4.6 Avaliação Funcional

O Gráfico 17 demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (hígido, diabético, lesão e lesão diabético), no período de 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos que o índice funcional apresentou um aumento estatisticamente significativo na dificuldade de deambulação dos animais do grupo **lesão** ( $7,2 \pm 0,75$ ) quando comparados ao grupo **hígido** ( $0,16 \pm 0,88$ ) com  $***p < 0,001$  e também do grupo **lesão + diabético** ( $5,6 \pm 1,3$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $0,16 \pm 0,88$ ) com  $**p < 0,01$ . Tanto o grupo **lesão** ( $7,2 \pm 0,75$ ) quanto o grupo **lesão + diabético** ( $5,6 \pm 1,3$ ) apresentou o índice funcional com um aumento significativo na dificuldade de deambulação comparado ao grupo **diabético** ( $0,77 \pm 0,58$ ) com  $###p < 0,001$  e  $##p < 0,01$  respectivamente.

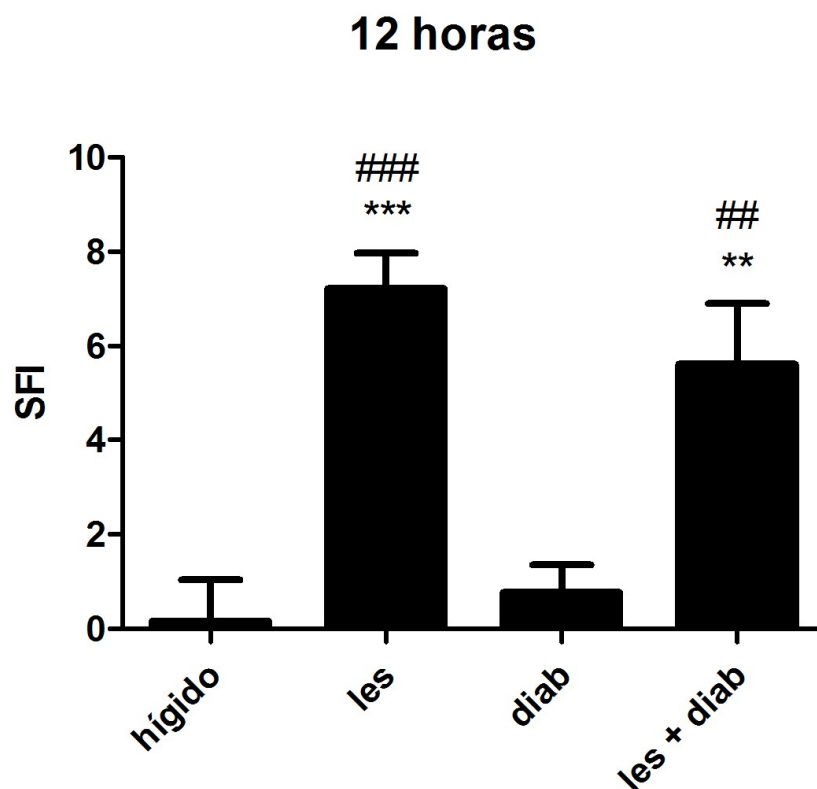


Gráfico 17. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track*. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey,  $***p < 0,001$  vs. hígido,  $**p < 0,01$  vs. hígido,  $###p < 0,001$  vs. diabético e  $##p < 0,01$  vs. diabético).

O Gráfico 18 demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (hígido, diabético, lesão e lesão diabético), no período de 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos que o índice funcional apresentou um aumento estatisticamente significativo na dificuldade de deambulação dos animais do grupo **lesão + diabético** ( $4,1 \pm 0,8$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $0,06 \pm 0,81$ ) com  $**p < 0,01$ .

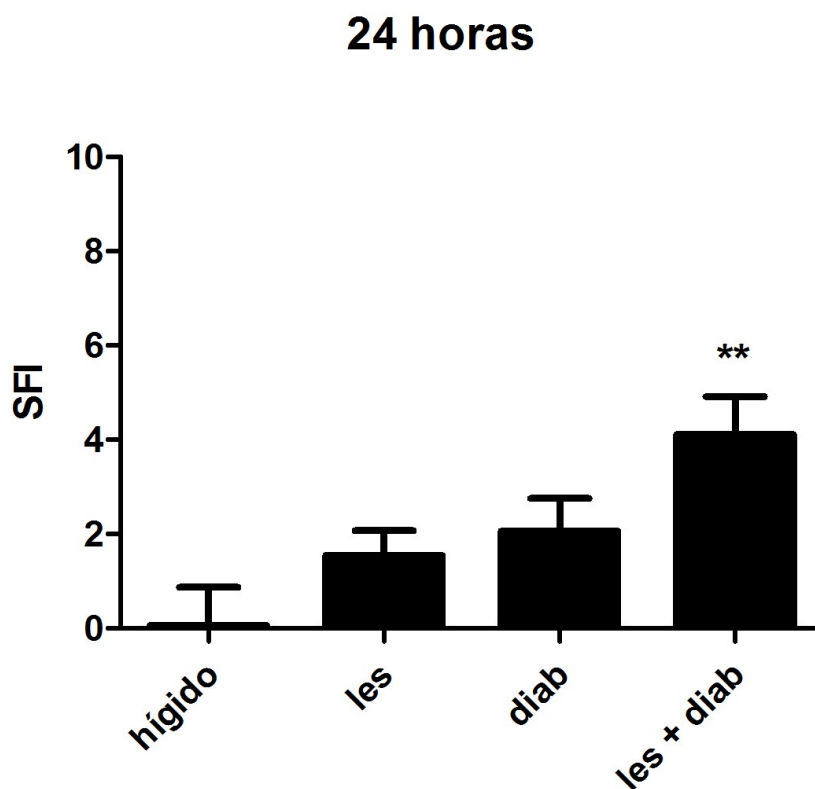


Gráfico 18. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track*. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey,  $**p < 0,01$  vs. hígido).

O Gráfico 19 demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (hígido, diabético, lesão e lesão diabético) no período de 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos no índice funcional.

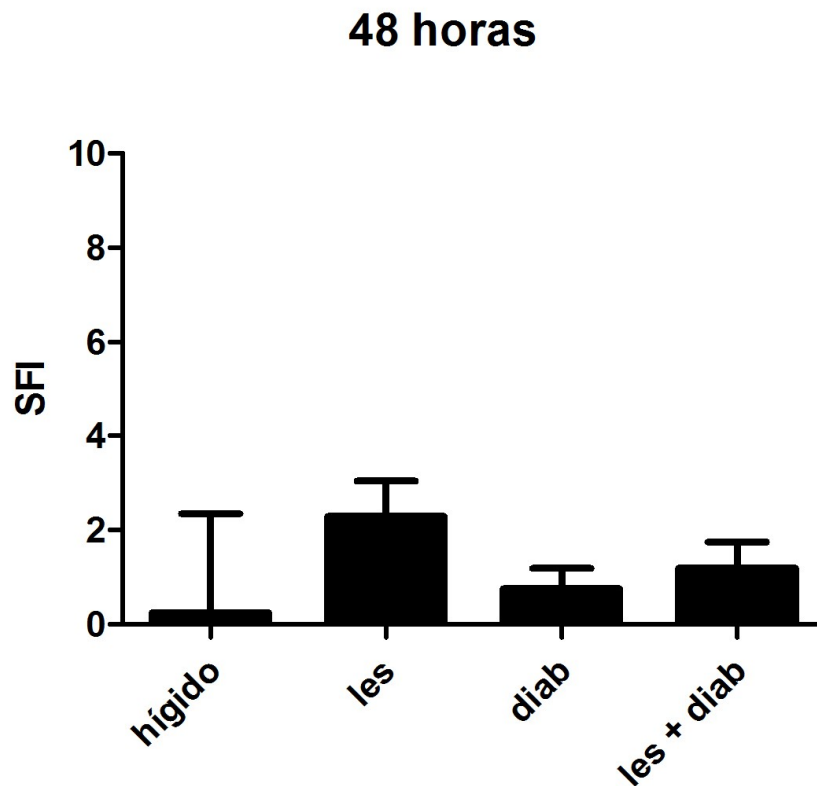


Gráfico 19. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track*. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

O Gráfico 20 demonstra o comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track* nos grupos (hígido, diabético, lesão e lesão diabético) no período de 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos no índice funcional.

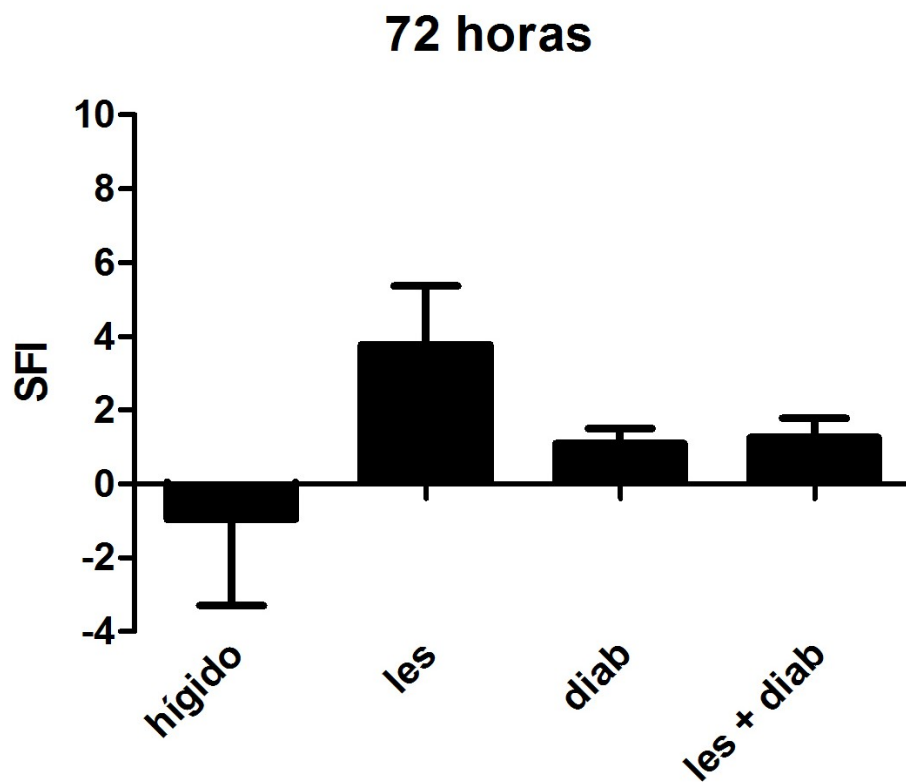


Gráfico 20. Comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track*. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

#### 4.7 Eletroestimulação Indireta do Músculo Tibial Anterior

A contração tetânica foi induzida através do aumento da frequência de 0,2Hz para 60Hz (LOPES-MARTINS et al., 2006).

O Gráfico 21 demonstra o tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania nos grupos (hígido, lesão, diabético e lesão + diabético) no período de 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos uma redução significativa do tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima no grupo **diabético** ( $39,07 \pm 7,72$ ) e no grupo **lesão + diabético** ( $54,43 \pm 7,61$ ) quando comparados ao grupo **hígido** ( $100 \pm 0$ ) com  $**p<0,01$  e  $*p<0,05$  respectivamente.

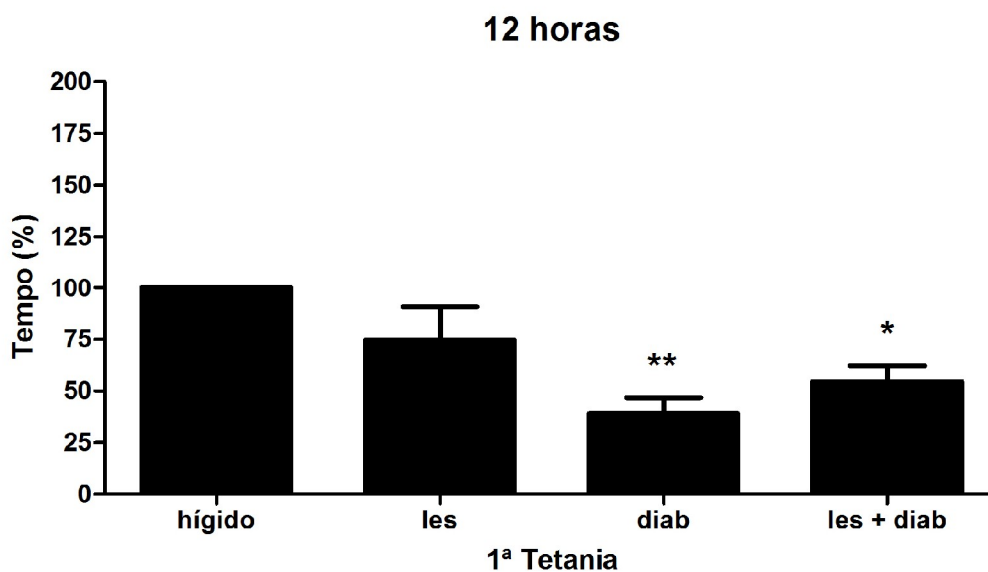


Gráfico 21. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p<0,05$  vs. hígido,  $**p<0,01$  vs. hígido).

O Gráfico 22 demonstra uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania nos grupos **lesão + diabético** ( $54,43 \pm 7,61$ ) e **diabético** ( $39,07 \pm 7,72$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $100 \pm 0$ ) com  $*p<0,05$  e  $**p<0,01$  respectivamente. Na segunda tetania foi observado uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **lesão + diabético** ( $71,66 \pm 11,77$ ) e **diabético** ( $42,83 \pm 8,38$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $144,51 \pm 15,91$ ) com  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  respectivamente. Houve também uma redução significativa deste parâmetro no grupo **diabético** ( $42,83 \pm 8,38$ ) comparado ao grupo **lesão** ( $99,52 \pm 11,92$ ) com  $\#p<0,05$ . Na terceira tetania também observamos uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **lesão** ( $85,99 \pm 13,87$ ), **lesão + diabético** ( $70,61 \pm 7,41$ ) e **diabético** ( $45,19 \pm 6,58$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $149,33 \pm 17,36$ ) com  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  respectivamente.

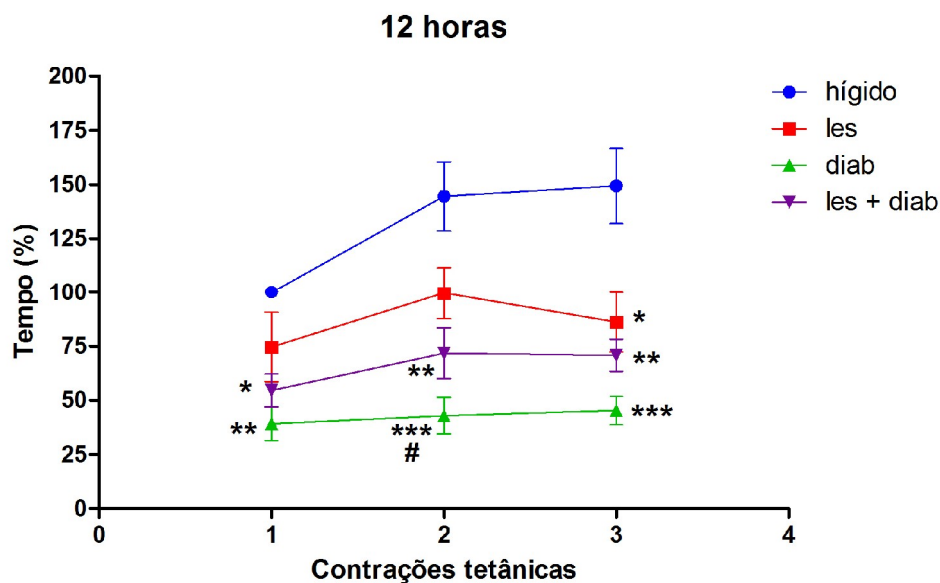


Gráfico 22. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p<0,05$  vs. hígido,  $**p<0,01$  vs. hígido,  $***p<0,001$  vs. hígido,  $\#p<0,05$  vs. lesão).

O Gráfico 23 demonstra o tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania nos grupos (hígido, lesão, diabético e lesão + diabético) no período de 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos uma redução significativa do tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima no grupo **lesão (47,61 ± 6,35)** e no grupo **lesão + diabético (39,93 ± 7,24)** quando comparados ao grupo **hígido (100 ± 0)** com \* $p < 0,05$ .

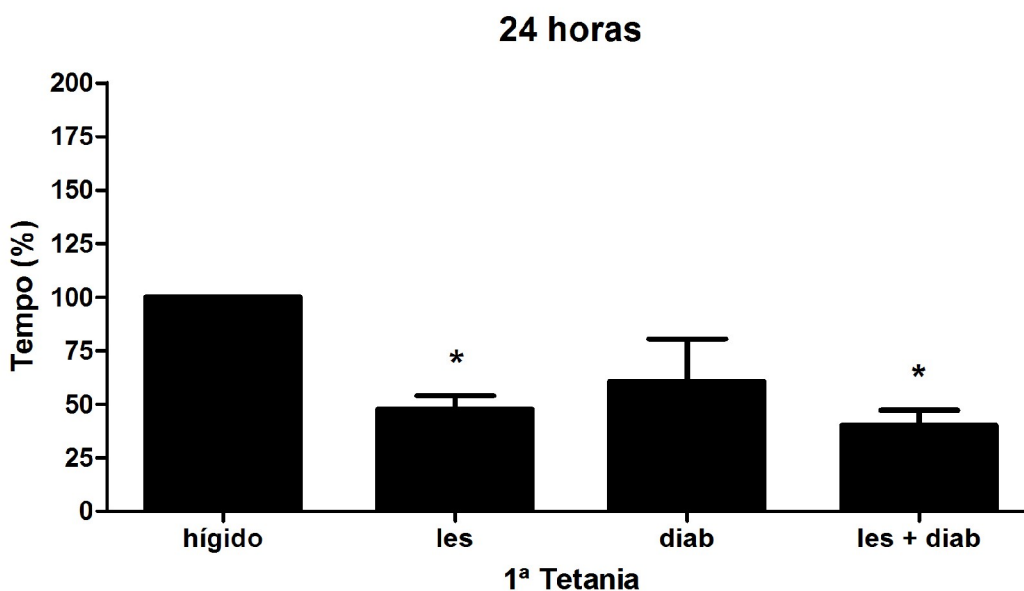


Gráfico 23. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey, \* $p < 0,05$  vs. hígido).



O Gráfico 24 demonstra uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania nos grupos **lesão** ( $47,61 \pm 6,35$ ) e **lesão + diabético** ( $39,93 \pm 7,24$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $100 \pm 0$ ) com  $*p < 0,05$ . Na segunda tetania foi observado uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **diabético** ( $73,06 \pm 16,74$ ), **lesão** ( $59,05 \pm 7,07$ ) e **lesão + diabético** ( $52,35 \pm 13,04$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $144,51 \pm 15,91$ ) com  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $**p < 0,01$  respectivamente. Na terceira tetania também observamos uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **diabético** ( $72,85 \pm 18,82$ ) e **lesão + diabético** ( $54,90 \pm 14,60$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $149,33 \pm 17,36$ ) com  $*p < 0,05$ .

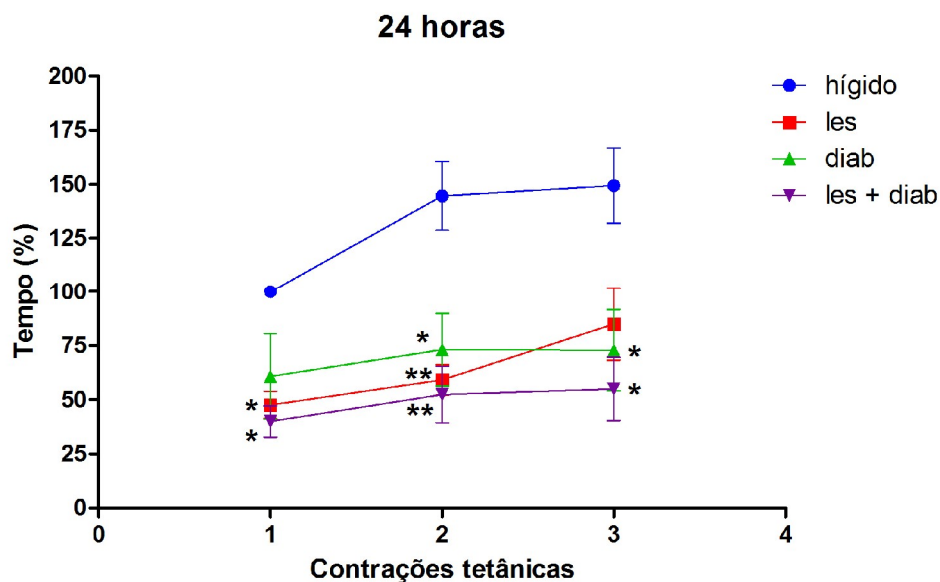


Gráfico 24. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p < 0,05$  vs. hígido,  $**p < 0,01$  vs. hígido).

O Gráfico 25 demonstra o tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania nos grupos (hígido, lesão, diabético e lesão + diabético) no período de 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos uma redução significativa do tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima no grupo **diabético** ( $41,53 \pm 5,65$ ) quando comparado ao grupo **hígido** ( $100 \pm 0$ ) com  $***p < 0,001$ .

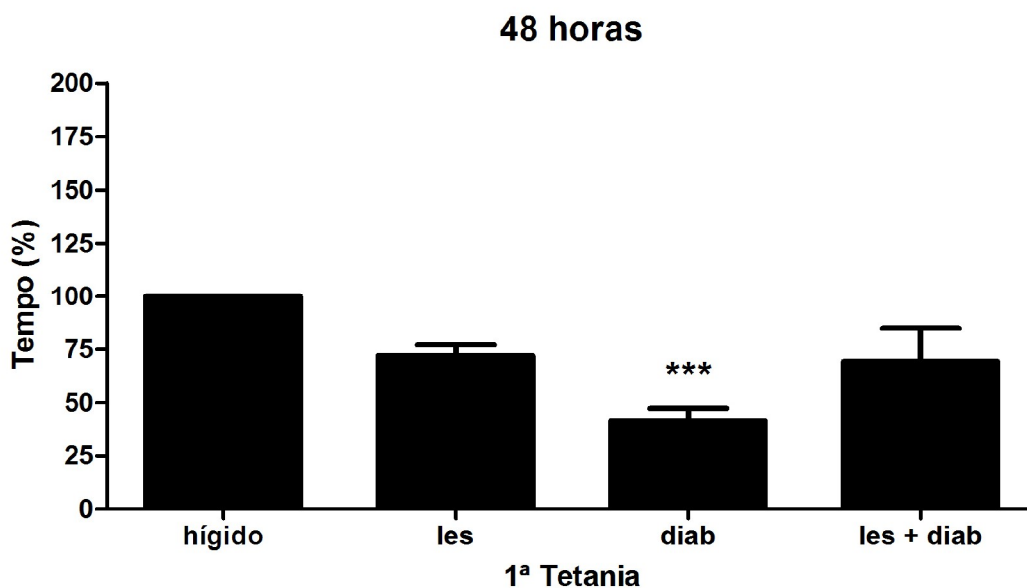


Gráfico 25. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey,  $***p < 0,001$  vs. hígido).

O Gráfico 26 demonstra uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania nos grupos **diabético** ( $41,53 \pm 5,65$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $100 \pm 0$ ) com  $***p < 0,001$ . Na segunda tetania foi observado uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **lesão + diabético** ( $77,54 \pm 15,9$ ) e **diabético** ( $48,9 \pm 5,61$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $144,51 \pm 15,91$ ) com  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  respectivamente. Houve também uma redução significativa deste parâmetro no grupo **diabético** ( $48,9 \pm 5,61$ ) comparado ao grupo **lesão** ( $96,18 \pm 8,37$ ) com  $\#p < 0,05$ . Na terceira tetania também observamos uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **lesão** ( $57,09 \pm 12,81$ ) e **diabético** ( $52,31 \pm 7,04$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $149,33 \pm 17,36$ ) com  $**p < 0,01$ .

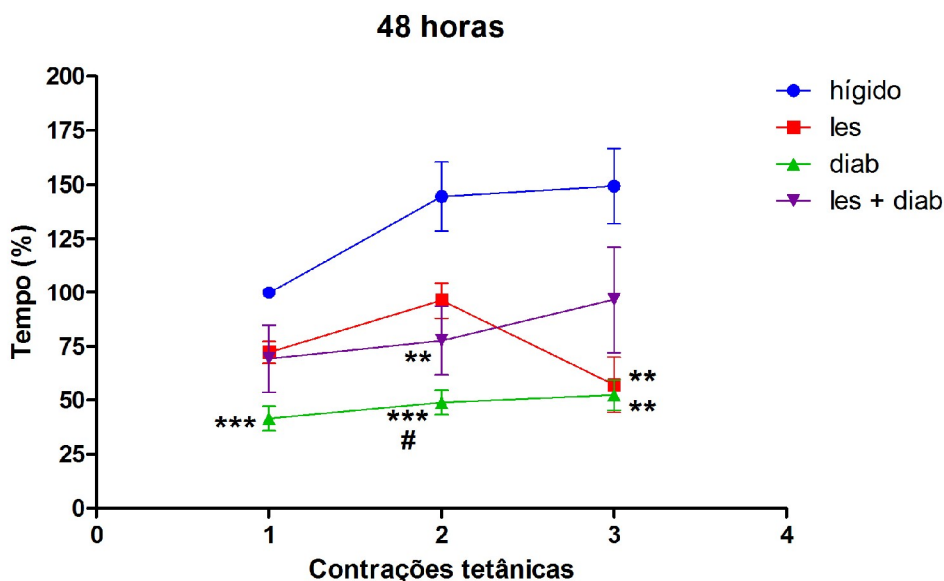


Gráfico 26. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $**p < 0,01$  vs. hígido,  $***p < 0,001$  vs. hígido,  $\#p < 0,05$  vs. lesão).

O Gráfico 27 demonstra o tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania nos grupos (hígido, lesão, diabético e lesão + diabético) no período de 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos uma redução significativa do tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima no grupo **lesão (56,36 ± 10,62)** quando comparado ao grupo **hígido (100 ± 0)** com  $*p < 0,05$ .

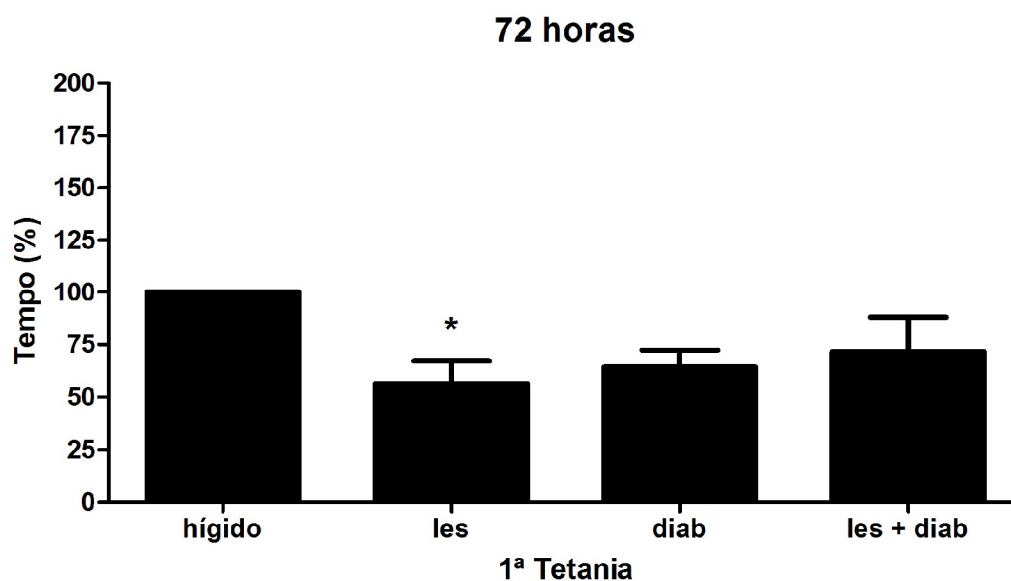


Gráfico 27. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p < 0,05$  vs. hígido).

O Gráfico 28 demonstra uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima durante a primeira tetania no grupo **lesão** ( $56,36 \pm 10,62$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $100 \pm 0$ ) com  $*p < 0,05$ . Na segunda tetania foi observado uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **diabético** ( $71,51 \pm 10,99$ ) e **lesão** ( $65,76 \pm 13,11$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $144,51 \pm 15,91$ ) com  $*p < 0,05$ . Na terceira tetania também observamos uma redução significativa no tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima nos grupos **lesão + diabético** ( $86,53 \pm 15,18$ ), **diabético** ( $66,93 \pm 9,74$ ) e **lesão + diabético** ( $86,53 \pm 15,18$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $149,33 \pm 17,36$ ) com  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $**p < 0,01$  respectivamente.

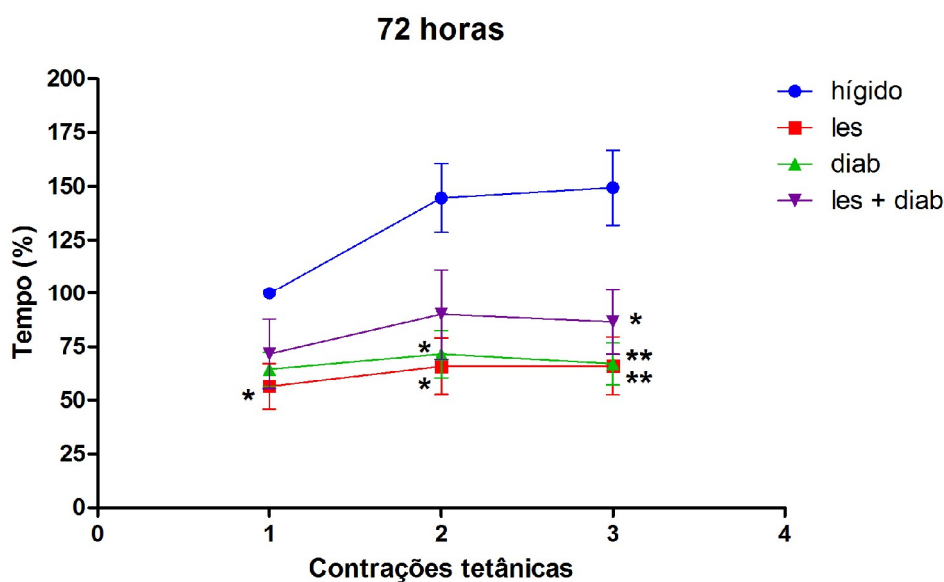


Gráfico 28. Tempo gasto para que a força muscular decaísse 50% de sua amplitude máxima, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p < 0,05$  vs. hígido,  $**p < 0,01$  vs. hígido).

O Gráfico 29 demonstra a área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima na primeira tetania no período de 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos uma redução estatisticamente significativa da área sob a curva no grupo **diabético (47,63 ± 6,16)** comparado ao grupo **hígido (100 ± 0)** com **\*\*p<0,01**.

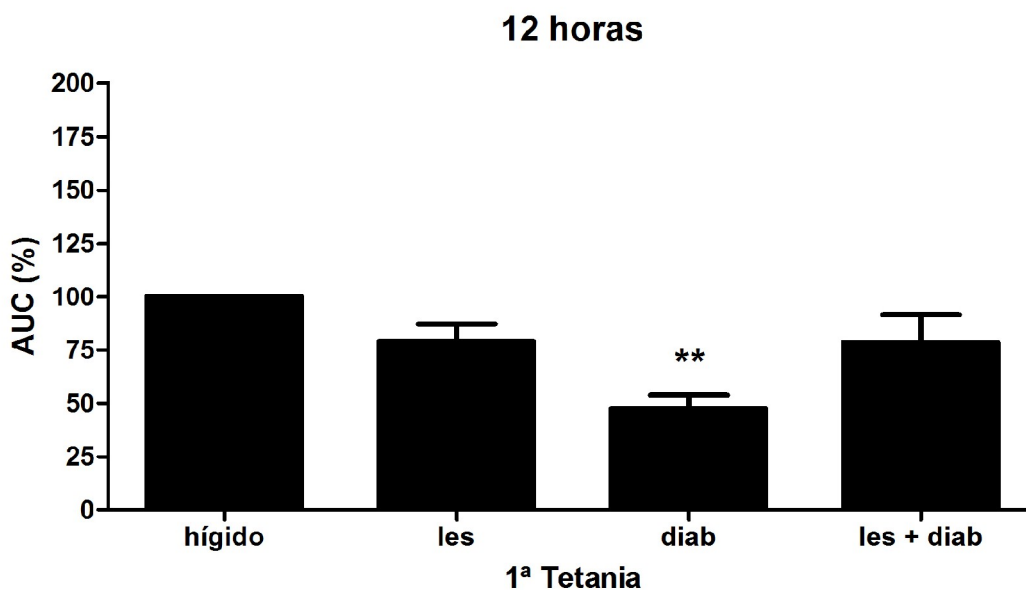


Gráfico 29. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, **\*\*p<0,01** vs. hígido).

O Gráfico 30 demonstra uma redução da área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima durante a primeira tetania no grupo **diabético** ( $47,63 \pm 6,16$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $100 \pm 0$ ) com  $**p < 0,01$ . Na segunda tetania também observamos uma redução da área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima no grupo **diabético** ( $55 \pm 7,78$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $133,19 \pm 11,98$ ) com  $**p < 0,01$ . Na terceira tetania observamos uma redução deste parâmetro no grupo **diabético** ( $59,46 \pm 8$ ) comparado ao grupo **hígido** ( $125,87 \pm 14,46$ ) com  $*p < 0,05$ .

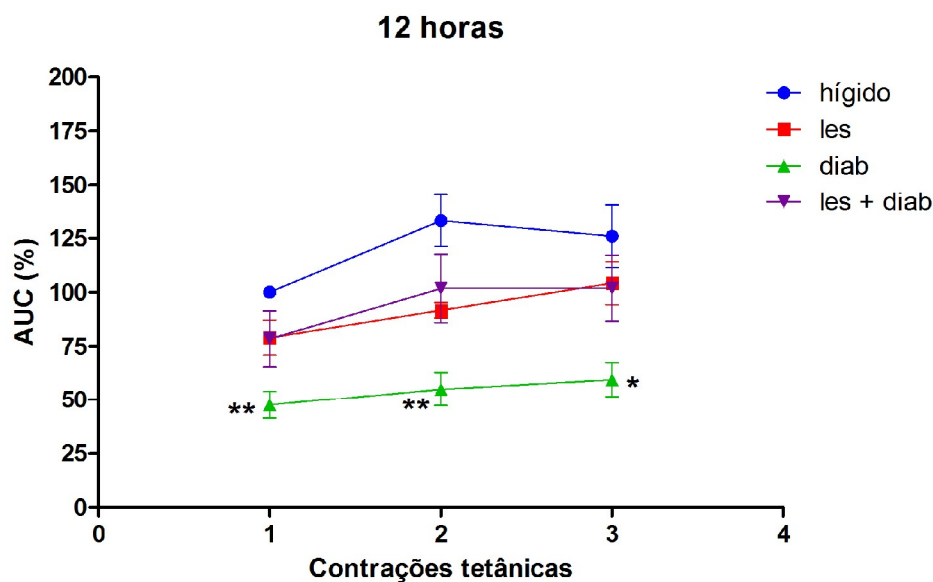


Gráfico 30. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 12 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p < 0,05$  vs. hígido,  $**p < 0,01$  vs. hígido,  $***p < 0,001$  vs. hígido).

O Gráfico 31 demonstra a área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima na primeira tetania no período de 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos uma redução estatisticamente significativa da área sob a curva no grupo **lesão + diabético (32,97 ± 8,94)** comparado ao grupo **hígido (100 ± 0)** com  $*p < 0,05$ .

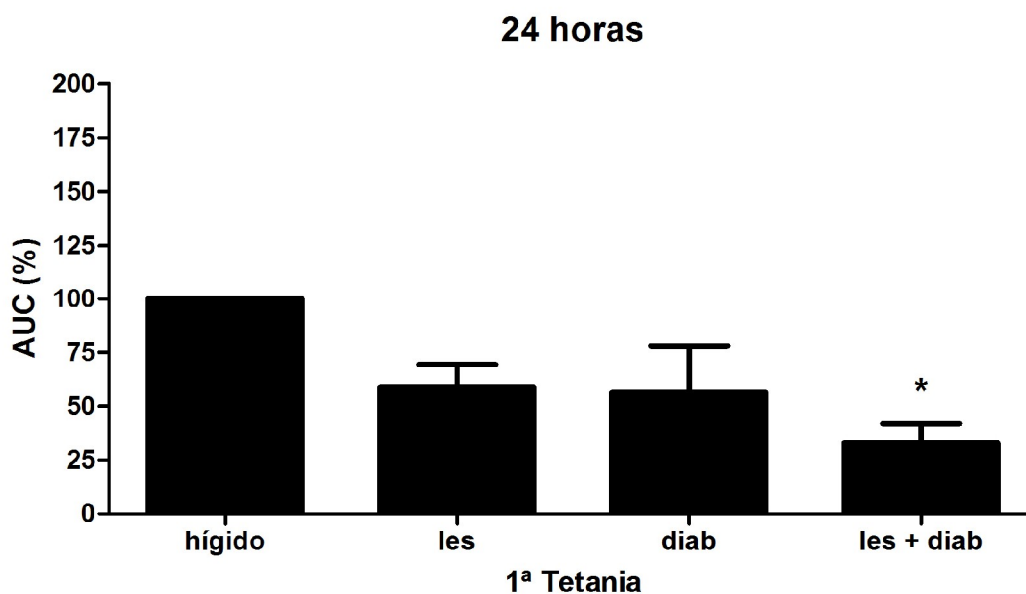


Gráfico 31. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p < 0,05$  vs. hígido).



O Gráfico 32 demonstra uma redução da área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima durante a primeira tetania no grupo **lesão + diabético (32,97 ± 8,94)** comparado ao grupo **hígido (100 ± 0)** com \*p<0,05. Na segunda tetania também observamos uma redução da área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima no grupo **lesão (69,48 ± 12,11)**, **diabético (65,31 ± 17,91)** e **lesão + diabético (43,74 ± 10,86)** comparado ao grupo **hígido (133,19 ± 11,98)** com \*p<0,05, \*p<0,05 e \*\*p<0,01 respectivamente. Na terceira tetania observamos uma redução deste parâmetro no grupo **lesão + diabético (41,99 ± 10,58)** comparado ao grupo **hígido (125,87 ± 14,46)** com \*p<0,05.

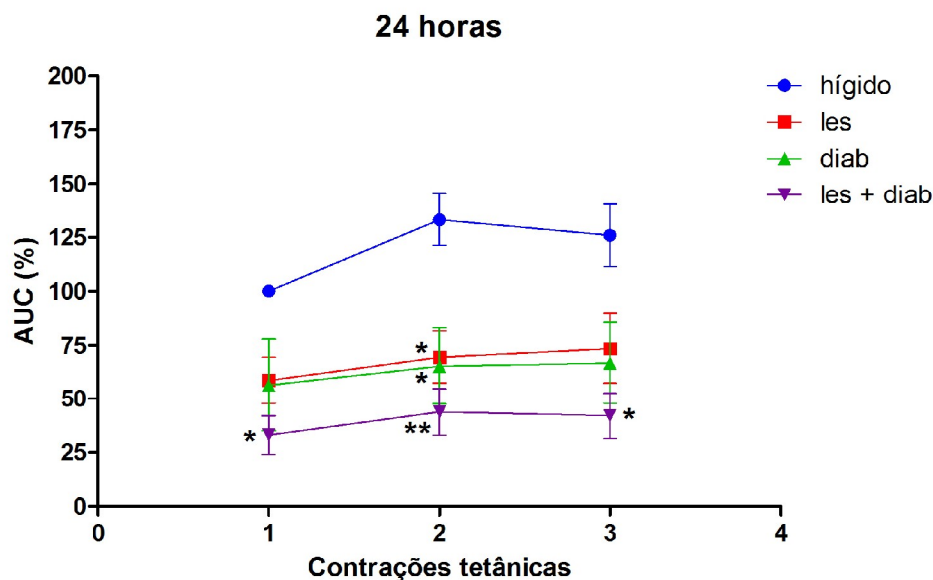


Gráfico 32. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 24 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média ±EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, \*p<0,05 vs. hígido, \*\*p<0,01 vs. hígido).

O Gráfico 33 demonstra a área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima na primeira tetania no período de 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Observamos uma redução estatisticamente significativa da área sob a curva no grupo **diabético** ( $43,03 \pm 8,58$ ) comparado ao grupo **lesão + diabético** ( $127,17 \pm 27,62$ ) com  $##p < 0,01$ .

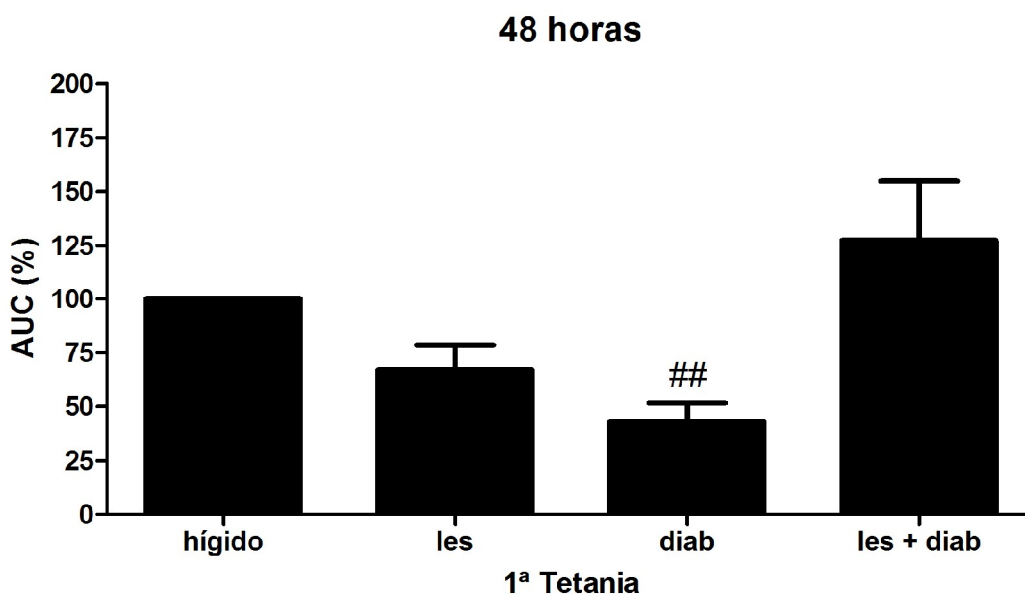


Gráfico 33. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $##p < 0,01$  vs. lesão + diabético).

O Gráfico 34 demonstra uma redução da área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima durante a primeira tetania no grupo **diabético** ( $43,03 \pm 11,52$ ) comparado ao grupo **lesão + diabético** ( $127,17 \pm 27,62$ ) com  $++p < 0,01$ . Na segunda tetania observamos uma redução da área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima nos grupos **lesão** ( $47,80 \pm 7,8$ ) e **diabético** ( $45,51 \pm 5,48$ ) comparados ao grupo **hígido** ( $133,19 \pm 11,98$ ) com  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$  respectivamente; e também dos grupos **lesão** ( $47,80 \pm 7,8$ ) e **diabético** ( $45,51 \pm 5,48$ ) comparados ao grupo **lesão + diabético** ( $144,53 \pm 30,62$ ) com  $++p < 0,01$ . Na terceira tetania observamos uma redução deste parâmetro nos grupos **diabético** ( $53,69 \pm 9,04$ ) e **lesão** ( $39,02 \pm 6,11$ ) comparado ao grupo **lesão + diabético** ( $171,53 \pm 47,21$ ) com  $+p < 0,05$  e  $++p < 0,01$  respectivamente.

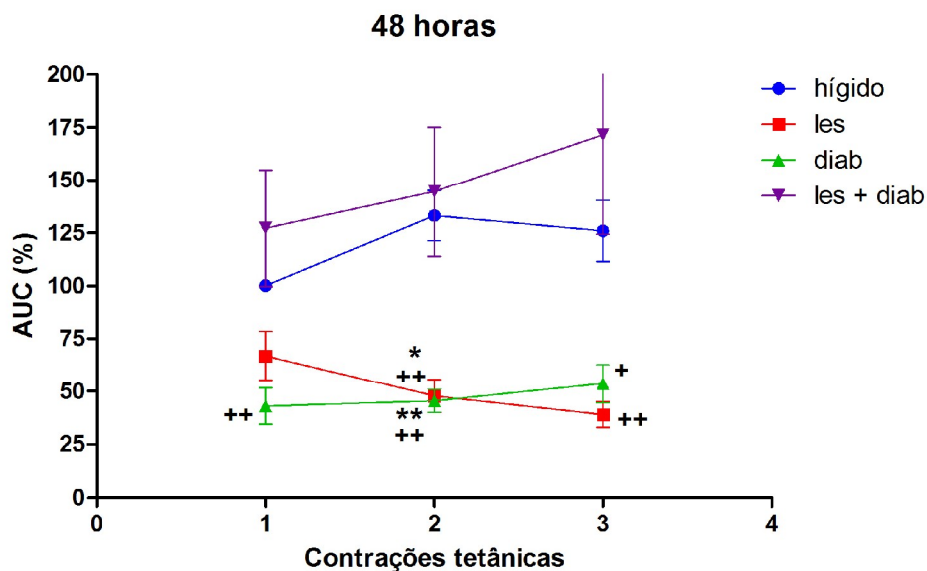


Gráfico 34. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 48 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média  $\pm$ EPM,  $n=5$  (ANOVA seguido do teste Tukey,  $*p < 0,05$  vs. hígido,  $**p < 0,01$  vs. hígido,  $+p < 0,05$  vs. lesão + diabético,  $++p < 0,01$  vs. lesão + diabético).

O Gráfico 35 demonstra a área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima na primeira tetania no período de 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

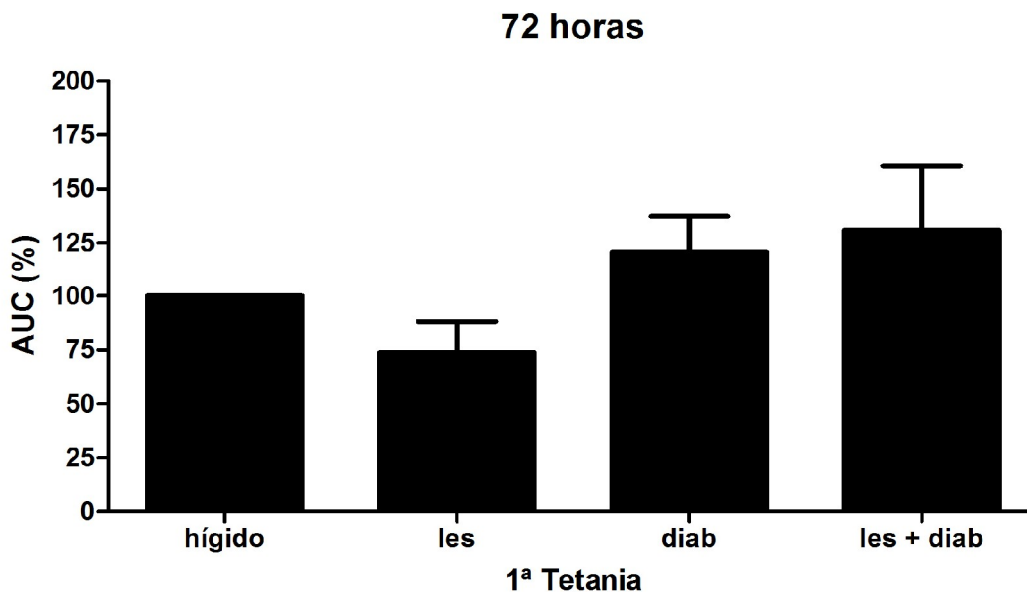


Gráfico 35. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

O Gráfico 36 demonstra a área sobre a curva de fadiga muscular após contração tetânica e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima durante as 3 tetanias. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

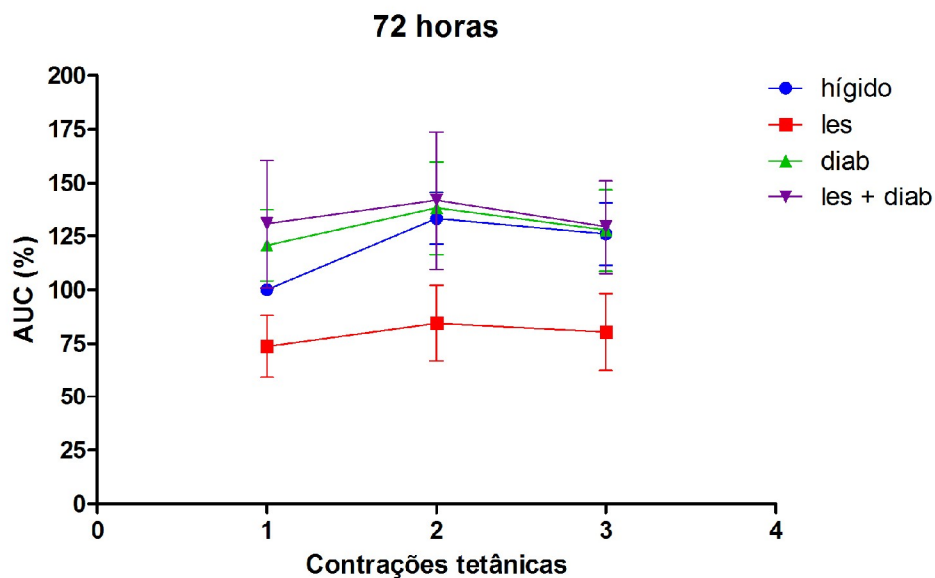


Gráfico 36. Área sob a curva de fadiga muscular após contração tetânica, 72 horas após protocolo de alongamento passivo. Relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima. Os dados representam a média  $\pm$ EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus tipo 1 experimental pode ser induzido em ratos através da injeção de aloxana - substância que promove a destruição seletiva das células beta pancreáticas - sendo um dos produtos mais comumente utilizados para indução desta doença em ratos (SZKUDELSKI, 2001; FORTES et al., 1983; FORTES et al., 1984; SPADELLA et al., 2010). No presente trabalho a injeção de aloxana (40mg/kg) via intravenosa em ratos de 8 a 10 semanas, provocou um aumento da glicemia e uma redução do peso corporal, 10 dias após a indução do diabetes. Estes dois achados confirmam o estado diabético dos animais e caracterizam a doença, que acarreta hiperglicemia crônica (BROWNLEE, 2001), impedindo a captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina, aumentando a degradação e reduzindo a síntese de proteínas e levando à perda do peso corporal (SMITH et al., 1989).

Neste trabalho realizamos análises de parâmetros funcionais e bioquímicos em ratos normais e diabéticos, após terem sido submetidos a um modelo de lesão muscular por estiramento controlado em músculo tibial anterior.

O aumento do extravasamento de azul de Evans encontrado no grupo lesão no protocolo de 6 horas e nos grupos lesão e lesão+diabético no protocolo de 12 horas são resultado das mudanças vasculares que ocorrem quando há algum tipo de injúria tissular aguda. Nestas condições ocorrem alterações do fluxo vascular, calibre e também na permeabilidade dos vasos sanguíneos. A quantidade de albumina que extravasa para os tecidos não é significativa em condições fisiológicas normais, no entanto, o extravasamento é importante na vigência de processo inflamatório (YASUDA et al., 2008).

As alterações de permeabilidade vascular normalmente ocorrem devido à liberação inicial de substâncias como histamina, serotonina e bradicinina que, além de causar dilatação arteriolar, tem como ação principal a indução do aumento de permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas protéicas do plasma para o interstício. A atividade edematogênica dos mediadores citados anteriormente pode ser potencializada pela ação concomitante de prostaglandinas vasodilatadoras (RÁKOS et al., 2007).

No protocolo de 2 horas após a lesão não houve diferença no extravasamento de azul de Evans entre os grupos. Devido ao protocolo ser muito

agudo, o processo inflamatório dos grupos lesão e lesão+diabético possivelmente encontrava-se em um estágio inicial, desta forma, não alterando a permeabilidade vascular. Já nos protocolos de 24, 48 e 72 horas foi observado o retorno ao nível basal da permeabilidade vascular nos grupos lesão e lesão+diabético.

Não foi observado diferença entre o extravasamento plasmático dos animais diabéticos que não foram submetidos a nenhum procedimento e dos animais diabéticos que sofreram o protocolo de lesão muscular (grupo diabético e grupo lesão + diabético respectivamente). De acordo com esses resultados, podemos inferir que no diabetes mellitus há uma resposta deficiente dos microvasos à histamina e à bradicinina, que encontram-se em níveis elevados após uma lesão tecidual e estão entre as primeiras substâncias a serem liberadas no processo inflamatório (TIDBALL, 1995). Esta resposta deficiente dos microvasos é consequência das alterações endoteliais provocadas pela ausência de insulina (FORTES et al., 1983). Além disto, estes achados podem também refletir o retardo e/ou redução na resposta inflamatória presente no diabetes mellitus. Esta alteração é decorrente da baixa produção de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), IGF-1 e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), da diminuição do depósito de colágeno e de uma redução na síntese de óxido nítrico (BITAR e LABBAD, 1996; LERMAN et al., 2003; LOBMANN et al., 2002; SCHAFFER et al., 1997; WETZLER et al., 2000).

Sabe-se que alterações funcionais e estruturais na macro e micro-circulação estão entre as complicações de maior prevalência em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. A principal causa dessas complicações é a hiperglicemia persistente, que acarreta anormalidades bioquímicas e estruturais de olhos, rins, coração, vasos sanguíneos e nervos periféricos (AGUIAR et al., 2007; TOOKE, 1995). Diversos pesquisadores afirmam que dentre as disfunções que ocorrem nos microvasos estão déficits funcionais, tais como alterações do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular (AGUIAR et al., 2007; TOOKE, 1995). Este aumento de permeabilidade vascular já foi encontrado em tecido periodontal (SIMA et al., 2010), pele, pâncreas, duodeno, rins (CHAKIR et al., 1995), dentre outros.

Já em dois trabalhos de Sexton et al. realizados com tecido muscular de ratos diabéticos, houve uma diminuição da permeabilidade vascular (SEXTON, 1994; SEXTON et al., 1994). Estes dois estudos tiveram suas análises de extravasamento vascular realizadas nos animais em 6 a 8 semanas e 17 a 20

semanas após a indução do diabetes mellitus respectivamente. No presente estudo, o período entre a indução do diabetes e as análises de extravasamento de azul de Evans foi de 10 a 13 dias. Nos resultados obtidos, não foram observadas diferenças entre os grupos diabéticos comparados aos grupos hígidos em relação à permeabilidade vascular, provavelmente devido ao DM encontrar-se em estágio inicial.

Nossos resultados demonstram um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  nos grupos lesão, diabético e lesão + diabético em todos os tempos analisados. Esses achados denotam o estado inflamatório nos três grupos citados e corroboram com achados anteriores como o de Bunn et al. (2004). Eles realizaram um estudo analisando o comportamento das citocinas utilizando como modelo experimental a lesão músculo-esquelética por queda de massa. No grupo exposto a uma contusão leve (queda de 130 milímetros de uma massa de 100g), o nível de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  teve pico no músculo em 4 dias após a lesão. No grupo exposto a uma contusão grave (queda de 130 milímetros de uma massa de 200g) os níveis de IL-1 $\beta$  e de TNF- $\alpha$  aumentaram de forma mais gradual e contínua até o dia 8 pós-lesão. Além do estudo citado anteriormente, nossos resultados também corroboram com um estudo de Mesquita-Ferrari et al. (2010) que avaliaram os níveis de TNF- $\alpha$  no mRNA de ratos submetidos a lesão muscular de tibial anterior por congelamento. A retirada do material para análise foi realizada no dia 7 e 14 após a lesão. No 7º dia pós-lesão foi encontrado um aumento significativo no nível de TNF- $\alpha$  no mRNA dos animais lesionados. Coletivamente, estes achados mostram que a maneira como as citocinas se apresentam, pode diferir dependendo do local, gravidade, tipo e estágio da lesão muscular, visto que nossos resultados demonstram padrões semelhantes, porém com picos de expressão diferentes dos citados anteriormente.

Apesar de termos encontrado em nosso trabalho um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  nos ratos diabéticos (lesionados e não-lesionados), em um estudo de Ohno et al. (1993) com pacientes diabéticos tipo 1, diabéticos tipo 2 e indivíduos saudáveis, não houve diferença na expressão de TNF- $\alpha$  no sangue periférico de pacientes diabéticos tipo 1 em relação aos controles sadios. Entretanto, Kulseng et al. (1996) em um estudo com diferentes grupos de pacientes diabéticos tipo 1, encontraram uma maior expressão de TNF- $\alpha$  em pacientes com diagnóstico recente, após a estimulação com lipopolissacarídeo, comparados ao grupo controle. Hussain et al. (1998) também encontraram uma elevada expressão de TNF- $\alpha$  tanto em



crianças com diabetes tipo 1 como em seus parentes de primeiro grau não-diabéticos.

Em um trabalho onde foi realizada a infusão de glicose, aumentando agudamente seu nível no plasma, e também o bloqueio da secreção de insulina endógena por ocreotide (uma substância que mimetiza a ação da somatostatina endógena, a qual inibe a secreção de insulina e também de glucagon) detectou-se aumento das citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  em voluntários saudáveis e também em pacientes hiperglicêmicos (ESPOSITO et al., 2002). Além disso, a glicose induz um aumento das EROs e reduz a disponibilidade de óxido nítrico, e conseqüentemente criam um ambiente de estresse oxidativo, inflamação, constrição vascular e hiperagregabilidade plaquetária. Esse círculo vicioso é propagado diminuindo a liberação de insulina por células beta e bloqueando a resposta inflamatória (YANG et al., 2004; COLLIER et al., 2008).

A hiperglicemia também tem efeitos específicos sobre a defesa do hospedeiro. A curto prazo a hiperglicemia afeta todos os principais componentes da resposta imune inata (TURINA et al., 2005). A atividade de neutrófilos é reduzida, levando a quimiotaxia diminuída, diminuição da fagocitose, diminuição da morte bacteriana e excesso de radicais livres (BAGDADE et al., 1974). Além de mudanças na função celular, outros componentes da resposta imune inata contribuem para o estado pró-inflamatório na hiperglicemia. In vitro, os monócitos humanos mostram um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 dependente da glicose (HÂNCU et al., 1998; MOROHOSHI et al., 1996). Então, apesar de a hiperglicemia ser globalmente pró-inflamatória, ela tem efeitos específicos que bloqueiam o sistema imune inato (COLLIER et al., 2008). Isto provavelmente contribuiu para os resultados encontrados em nosso estudo em relação aos animais diabéticos, onde o protocolo de lesão muscular por estiramento não provocou aumento na expressão de TNF- $\alpha$  no grupo lesão + diabético quando comparado ao grupo diabético.

O aumento na expressão gênica de miostatina nos animais do grupo diabético e lesão + diabético no protocolo de 24 horas reforça o que se sabe atualmente sobre a miostatina, que é um dos mais potentes inibidores do crescimento muscular. A inibição de miostatina aumenta dramaticamente a massa muscular em humanos (SCHUELKE et al., 2004; WILLIAMS, 2004) e em várias espécies de animais (McPHERRON et al., 1997; MCPHERRON e LEE, 1997; SHELTON e ENGVALL, 2007; CLOP et al., 2006).

Nossos resultados também corroboram com o trabalho de Chen et al. (2009), que analisaram a expressão gênica de miostatina no músculo gastrocnêmio de camundongos com diabetes tipo 1 induzida por streptozotocina. As análises foram realizadas em uma, duas, três, quatro e oito semanas após a indução do DM. A expressão gênica de miostatina elevou-se gradualmente nestes animais nas primeiras duas semanas, tendo como pico o décimo quinto dia. A partir da terceira semana começou a ocorrer uma diminuição da expressão gênica de miostatina, com os valores retornando ao nível dos animais controle na oitava semana. Já Barazzoni et al. (2004) demonstraram que não houve alteração nos níveis de miostatina no mRNA do músculo gastrocnêmio lateral e sóleo de ratos com DM tipo 1 a longo prazo. Porém, neste último estudo, os animais foram analisados somente 8 semanas após a indução do DM, já em um estado tardio.

O presente estudo avaliou a função motora, através da análise de marcha nos grupos estudados por meio das médias do Índice Funcional do Ciático (SFI). A lesão muscular frequentemente produz déficits motores que são observados durante a locomoção (FILIFE et al., 2006; VAREJÃO et al., 2002). Esses déficits tornaram-se nítidos em nosso protocolo de 12 e 24 horas pós a indução da lesão. No protocolo de 12 horas, os dois grupos (lesão e lesão+diabético) que sofreram o estiramento muscular passivo, demonstraram uma perda da função motora com conseqüente alteração no padrão de marcha. Nossos resultados corroboram com os achados de Ramos (2010) no qual os animais foram submetidos à mesma lesão muscular utilizada em nosso trabalho e apresentaram uma alteração no padrão de marcha até 48 horas após a lesão muscular. Outro trabalho que também utilizou o SFI foi o de Gigo-Benato et al. (2010). Porém neste estudo, os animais sofreram uma lesão por esmagamento do nervo ciático, os quais também apresentaram dificuldade de deambulação durante todo o período de experimento, que foi de 14 dias.

A dificuldade de deambulação persistiu no grupo lesão+diabético ainda no protocolo de 24 horas após a lesão, retratando provavelmente a persistência de dor nestes grupos, produzida por uma variedade de agentes pró-inflamatórios (SCOTT et al., 2004). Sabe-se que no diabetes mellitus ocorre retardo da resposta inflamatória, reduzida formação do tecido de granulação e conseqüente prejuízo na cicatrização (BITAR e LABBAD, 1996; DARBY et al., 1997; LERMAN et al., 2003 LIU et al., 2004; LOBMANN et al., 2002). Entretanto até o momento, não foram encontrados estudos que fizeram uso do SFI em animais diabéticos.

Através do estudo eletromiográfico visamos avaliar outros parâmetros funcionais como força muscular e resistência à fadiga muscular. Analisando as 3 tetanias em relação ao tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima, observamos uma redução deste parâmetro nos grupos lesão, diabético e lesão + diabético em todos os protocolos, o que denota uma reduzida resistência à fadiga destes grupos comparados ao grupo hígido. Nossos dados confirmam achados anteriores, como em um trabalho realizado em nosso laboratório utilizando o estudo eletromiográfico após lesão muscular por estiramento. Foram realizadas análises até 96 horas após a lesão, sendo que em todos os protocolos houve um déficit motor nos animais lesionados (RAMOS, 2010).

Nossos resultados também demonstraram uma redução da área sob a curva e da relação da intensidade de contração muscular com o tempo para que a força decaísse 50% da amplitude máxima, nos grupos lesão, diabético e lesão + diabético na segunda tetania do protocolo de 24 horas, comparados ao grupo hígido. Isto também foi visto no grupo diabético nas 3 tetanias do protocolo de 12 horas e na segunda tetania do protocolo de 48 horas nos grupos lesão e diabético.

Sabe-se que a lesão do músculo-esquelético é caracterizada por uma perda imediata da capacidade de produzir força. A causa desta perda de força tem sido atribuída a fatores como um defeito no acoplamento excitação-contração (WARREN et al., 2001) e/ou a uma ruptura ou perda das estruturas geradoras de força como a actina e a miosina (THOMPSON et al., 1999). Crisco et al. (1994) demonstraram um déficit na força de tetania máxima imediatamente após lesão por contusão sendo que a recuperação a níveis normais ocorreu somente após 24 dias. Uchiyama et al. (2001) também apontaram uma redução na força de tetania em ratos após lesão por estiramento. O déficit funcional persistiu por 3 semanas nos animais analisados. Existem várias definições para a fadiga muscular, e uma delas é a incapacidade de manter a força de contração muscular por um período de tempo, como podemos observar em nosso trabalho. As principais características da fadiga muscular são: diminuição da força muscular e controle motor prejudicado com subsequente dor muscular. Para elucidar o processo e mecanismos envolvidos, diversos estudos têm investigado como a fadiga se desenvolve durante os diferentes tipos de exercício (LOPES-MARTINS et al., 2006).

Nos ratos que foram submetidos à lesão muscular (lesão e lesão + diabético), era esperado este prejuízo no desempenho motor com uma maior

suscetibilidade à fadiga, porém isto também foi encontrado nos animais do grupo diabético não submetido à lesão. Diversos pesquisadores têm demonstrado alterações nas propriedades estruturais, biomecânicas, elétricas e contráteis do músculo-esquelético de animais diabéticos (COTTER et al., 1993; FAHIM et al., 1998; McGUIRE e MacDERMOTT, 1999). Similarmente aos nossos resultados, Cotter et al. (1993) demonstraram um prejuízo na resistência à fadiga no músculo sóleo de ratos diabéticos induzidos por streptozotocina e avaliados 4 meses após a indução. Ainda corroborando com nossos achados, Ljubisavljevic et al. (2010) também demonstraram uma redução na resistência à fadiga nos músculos sóleo e gastrocnêmio medial de ratos diabéticos.

Embora seja provável que os efeitos sobre os músculos esqueléticos no diabetes ocorram como resultado da hiperglicemia, é possível que outros mecanismos, tais como a função vascular prejudicada e a diminuição da síntese proteica, podem ser limitantes do desempenho muscular em pacientes com diabetes. As mudanças vasculares, comuns no paciente diabético, causam deficiência hemodinâmica capilar e uma oferta reduzida de oxigênio e nutrientes para os músculos esqueléticos (KINDIG et al., 1998). O diabetes também pode causar o comprometimento neuromuscular em ambos os sítios, pré e pós-sináptico que podem representar fatores causais no retardo da velocidade de condução dos potenciais de ação (DOCKERY e SHARMA, 1990). É provável que estes fatores agiram conjuntamente para provocar o déficit motor encontrado em nosso estudo nos animais diabéticos. Juntamente com estas possíveis causas, a miostatina também pode ter agido para promover um prejuízo na resistência à fadiga muscular, visto que altos níveis de miostatina no mRNA em animais diabéticos tipo 1, pode indicar uma alta taxa de catabolismo proteico (CHEN et al., 2009).

## 6 CONCLUSÃO

O modelo de lesão muscular por estiramento utilizado no presente trabalho, foi capaz de reproduzir algumas das características encontradas em outros modelos de lesão muscular, como o aumento da permeabilidade vascular, expressão aumentada de citocinas e déficit motor.

Os resultados do presente estudo sugerem que o diabetes mellitus é um estado pró-inflamatório, com persistente expressão de citocinas como o TNF- $\alpha$ . Além disto, podemos observar uma elevada expressão de miostatina nos animais diabéticos, podendo ser uma das possíveis responsáveis pelo maior comprometimento muscular encontrado nos animais diabéticos.

Com base nos resultados obtidos no teste de caminhada (*walking track analysis*), podemos observar que a recuperação funcional apresenta-se retardada no animal diabético. Além disso, observou-se menor resistência muscular localizada à fadiga em ambos os grupos diabéticos, com e sem lesão muscular.

## REFERÊNCIAS\*

AGUIAR, L. G.; VILLELA, N. R.; BOUSKELA, E. A microcirculação do Diabetes: Implicações das complicações crônicas e tratamento da doença. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 51, n. 2, p. 204-211, 2007.

ALBRIGHT, A.; FRANZ, M.; HORNSBY, G.; KRISKA, A.; MARRERO, D.; ULLRICH, I.; VERITY, L. S. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 32, n. 7, p. 1345-1360, 2000.

ANDERSEN, H.; GADEBERG, P. C.; BROCK, B.; JAKOBSEN, J. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. **Diabetologia**, v. 40, n. 9, p. 1062-1069, 1997.

ANDERSEN, H.; POULSEN, P. L.; MOGENSEN, C. E.; JAKOBSEN, J. Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. **Diabetes**, v. 45, n. 4, p. 440-445, 1996.

ANDERSEN, H. Muscular endurance in long-term IDDM patients. **Diabetes Care**, v. 21, n. 4, p. 604-609, 1998.

ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R. O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. **Am. J. Anat.**, v. 171, n. 3, p. 259-272, 1984.

BAGDADE, J. D.; ROOT, R. K.; BULGER, R. J. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, v. 23, n. 1, p. 9-15, 1974.

BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 45, n. 2, p. 175-180, 1999.

BARAZZONI, R.; ZANETTI, M.; BOSUTTI, A.; STEBEL, M.; CATTIN, L.; BIOLO, G.; GUARNIERI, G. Myostatin expression is not altered by insulin deficiency and replacement in streptozotocin-diabetic rat skeletal muscles. **Clin. Nutr.**, v. 23, n. 6, p. 1413-1417, 2004.

\*De acordo com:

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

BITAR, M. S.; LABBAD, Z. N. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. **J. Surg. Res.**, v. 61, n. 1, p. 113-119, 1996.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6965, p. 813-821, 2001.

BUNN, J. R.; CANNING, J.; BURKE, G.; MUSHIPE, M.; MARSH, D. R.; LI, G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle-a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. **J. Orthop. Res.**, v. 22, n. 6, p. 1336-1344, 2004.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; ROBERTSON, S. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents development of muscle and nerve dysfunction and stimulates angiogenesis in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 35, n. 1, p. 12-18, 1992.

CHAKIR, M.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; PLANTE, G. E. Neutral endopeptidase inhibition, a new approach in the exploration of diabetic vasculopathy in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 285, n. 1, p. 11-18, 1995.

CHAKRAVARTHY, M. V.; DAVIS, B. S.; BOOTH, F. W. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 89, n. 4, p. 1365-1379, 2000.

CHEN, Y.; CAO, L.; YE, J.; ZHU, D. Upregulation of myostatin gene expression in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice is attenuated by insulin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 388, n. 1, p. 112-116, 2009.

CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H.; PIROTTIN, D.; TORDOIR, X.; BIBÉ, B.; BOUIX, J.; CAIMENT, F.; ELSEN, J. M.; EYCHENNE, F.; LARZUL, C.; LAVILLE, E.; MEISH, F.; MILENKOVIC, D.; TOBIN, J.; CHARLIER, C.; GEORGES, M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nat. Genet.**, v. 38, n. 7, p. 813-818, 2006.

COLLIER, B.; DOSSETT, L. A.; MAY, A. K.; DIAZ, J. J. Glucose control and the inflammatory response. **Nutr. Clin. Pract.**, v. 23, n. 1, p. 3-15, 2008.

COTTER, M. A.; CAMERON, N. E.; ROBERTSON, S.; EWING, I. Polyol pathway-related skeletal muscle contractile and morphological abnormalities in diabetic rats. **Exp. Physiol.**, v. 78, n. 2, p. 139-155, 1993.

CRISCO, J. J.; JOKL, P.; HEINEN, G. T.; CONNELL, M. D.; PANJABI, M. M. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **Am. J. Sports. Med.**, v. 22, n. 5, p. 720-710, 1994.

DANDONA, P.; CHAUDHURI, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 99, n. 4A, p. 15B-26B, 2007.

DARBY, I. A.; BISUCCI, T.; HEWITSON, T. D.; MACLELLAN, D. G. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 29, n. 1, p. 191-200, 1997.

DE MEDINACELLI, L.; FREED, K. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp. Neurol.**, v. 77, n. 3, p. 634-643, 1982.

DOCKERY, P.; SHARMA, A. K. Ultrastructural abnormalities of myelinated fibres in the tibial nerve of streptozotocin-diabetic rats. **J. Neurol. Sci.**, v. 98, n. 2-3, p. 327-345, 1990.

EIZIRIK, D. L.; PIPELEERS, D. G.; LING, Z.; WELSH, N.; HELLERSTRÖM, C.; ANDERSSON, A. Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, n. 20, p. 9253-9256, 1994.

ELIAKIM, A.; MOROMISATO, M.; MOROMISATO, D.; BRASEL, J. A.; ROBERTS Jr., C.; COOPER, D. M. Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 4, pt. 2, p. R1557-R1561, 1997.

ESPOSITO, K.; NAPPO, F.; MARFELLA, R.; GIUGLIANO, G.; GIUGLIANO, F.; CIOTOLA, M.; QUAGLIARO, L.; CERIELLO, A.; GIUGLIANO, D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. **Circulation**, v. 106, n. 16, p. 2067-2072, 2002.

FAHIM, M. A.; EL-SABBAN, F.; DAVIDSON, N. Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice. **Anat. Rec.**, v. 251, n. 2, p. 240-244, 1998.

FEDELE, M. J.; LANG, C. H.; FARRELL, P. A. Immunization against IGF-I prevents increases in protein synthesis in diabetic rats after resistance exercise. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, n. 6, p. E877-E885, 2001.



FORTES, Z. B.; GARCIA LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: possible role of insulin on the endothelial cell. **Br. J. Pharmacol.**, v. 83, n. 3, p. 635-643, 1984.

FORTES, Z. B.; LEME, J. G.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cell. **Br. J. Pharmacol.**, v. 79, n. 3, p. 771-781, 1983.

FILIFE, V. M.; PEREIRA, J. E.; COSTA, L. M.; MAURÍCIO, A. C.; COUTO, P. A.; MELO-PINTO, P.; VAREJÃO, A. S. Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. **J. Neurosci. Methods.**, v. 153, n. 1, p. 55-61, 2006.

FOSTER, W.; LI, Y.; USAS, A.; SOMOGYI, G.; HUARD, J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. **J. Orthop. Res.**, v. 21, n. 5, p. 798-804, 2003.

GARRETT Jr., W. E. Muscle strain injuries. **Am. J. Sports Med.**, v. 24, n. 6, p. S2-S8, 1996. Suppl.

GARRETT Jr., W. E. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 22, n. 4, p. 436-443, 1990.

GIGO-BENATO, D.; RUSSO, T. L.; GEUNA, S.; DOMINGUES, N. R.; SALVINI, T. F.; PARIZOTTO, N. A. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. **Muscle Nerve.**, v. 41, n. 5, p. 685-693, 2010.

GORUS, F. K.; MALAISSE, W. J.; PIPELEERS, D. G. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. **Biochem. J.**, v. 208, n. 2, p. 513-515, 1982.

GRECO, A.; McNAMARA, M. T.; ESCHER, R. M.; TRIFILIO, G.; PARIENTI, J. Spin-echo and STIR MR imaging of sports-related muscle injuries at 1.5 T. **J. Comput. Assist. Tomogr.**, v. 15, n. 6, p. 994-999, 1991.

GREENHALGH, D. G. Wound healing and diabetes mellitus. **Clin. Plast. Surg.**, v. 30, n. 1, p. 37-45, 2003.

GUTE, D.; FRAGA, C.; LAUGHLIN, M. H.; AMANN, J. F. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 81, n. 2, p. 619-626, 1996.

HÂNCU, N.; NETEA, M. G.; BACIU, I. High glucose concentrations increase the tumor necrosis factor-alpha production capacity by human peripheral blood mononuclear cells. **Rom. J. Physiol.**, v. 35, n. 3-4, p. 325-330, 1998.

HONG, E. G. et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2525-2535, 2009.

HURME, T.; KALIMO, H.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 23, n. 7, p. 801-810, 1991.

HURME, T.; KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 24, n. 2, p. 197-205, 1992.

HUSSAIN, M. J.; MAHER, J.; WARNOCK, T.; VATS, A.; PEAKMAN, M.; VERGANI, D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. **Diabetologia**, v. 41, n. 3, p. 343-349, 1998.

JANEWAY, C. A.; TRAVIS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. 6th ed. New York, NY: Garland Science; 2007.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, T. L.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am. J. Sports Med.**, v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

KAWABATA, Y.; IKEGAMI, H.; AWATA, T.; IMAGAWA, A.; MARUYAMA, T.; KAWASAKI, E.; TANAKA, S.; SHIMADA, A.; OSAWA, H.; KOBAYASHI, T.; HANAFUSA, T.; TOKUNAGA, K.; MAKINO, H.; Committee on Type 1 Diabetes, Japan Diabetes Society. Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset. **Diabetologia**, v. 52, n. 12, p. 2513-2521, 2009.

KEE, A. J.; TAYLOR, A. J.; CARLSSON, A. R.; SEVETTE, A.; SMITH, R. C.; THOMPSON, M. W. IGF-I has no effect on postexercise suppression of the ubiquitin-proteasome system in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 92, n. 6, p. 2277-2284, 2002.

KINDIG, C. A.; SEXTON, W. L.; FEDDE, M. R.; POOLE, D. C. Skeletal muscle microcirculatory structure and hemodynamics in diabetes. **Respir. Physiol.**, v. 111, n. 2, p. 163-175, 1998.

KIRKENDALL, D. T.; GARRETT Jr., W. E. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n. 403, p. 81-89, 2002. Suppl.

KUJALA, U. M.; ORAVA, S.; JÄRVINEN, M. Hamstring injuries. Current trends in treatment and prevention. **Sports Med.**, v. 23, n. 6, p. 397-404, 1997.

KULSENG, B.; SKJÅK-BRAEK, G.; FØLLING, I.; ESPEVIK, T. TNF production from peripheral blood mononuclear cells in diabetic patients after stimulation with alginate and lipopolysaccharide. **Scand. J. Immunol.**, v. 43, n. 3, p. 335-340, 1996.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am. J. Pathol.**, v. 78, n. 1, p. 71-100, 1975.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LERMAN, O. Z.; GALIANO, R. D.; ARMOUR, M.; LEVINE, J. P.; GURTNER, G. C. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. **Am. J. Pathol.**, v. 162, n. 1, p. 303-312, 2003.

LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.**, v. 31, n. 2, p. 391-410, vii-viii, 2002.

LIU, R.; DESTA, T.; HE, H.; GRAVES, D. T. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2997-3003, 2004.

LJUBISAVLJEVIC, M.; QURESHI, A.; NAGELKERKE, N. The effects of neuropeptide Y on skeletal muscle contractile properties in streptozotocin diabetic rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 333, n. 1-2, p. 27-32, 2010.

LOBMANN, R.; AMBROSCH, A.; SCHULTZ, G.; WALDMANN, K.; SCHIWECK, S.; LEHNERT, H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. **Diabetologia**, v. 45, n. 7, p. 1011-1016, 2002.

LOPES-MARTINS, R. A. B.; AIMBIRE, F. S. C.; LABAT, R. L.; PRIANTI, J. R. A. C.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; LIMA, M. O.; SOUZA, F. B. Effect of Low Power Ga-Al-As Laser Radiation (650 nm) on the skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **Lasers In Medical Science**, v. 17, n. 4, p. A35-A35, 2002.

LOPES-MARTINS, R. A.; MARCOS, R. L.; LEONARDO, P. S.; PRIANTI, A. C. Jr.; MUSCARÁ, M. N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 101, n. 1, p. 283-288, 2006.

MARTIN, P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

McGUIRE, M.; MacDERMOTT, M. The influence of streptozotocin diabetes and metformin on erythrocyte volume and on the membrane potential and the contractile characteristics of the extensor digitorum longus and soleus muscles in rats. **Exp. Physiol.**, v. 84, n. 6, p. 1051-1058, 1999.

McPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 83-90, 1997.

McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double musculing in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, 1997.

MERRICK, M. A. Secondary Injury After Musculoskeletal Trauma: A Review and Update. **J. Athl. Train.**, v. 37, n. 2, p. 209-217, 2002.

MESQUITA-FERRARI, R. A.; MARTINS, M. D.; SILVA, J. A. Jr.; da SILVA, T. D.; PIOVESAN, R. F.; PAVESI, V. C.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med. Sci.**, 2010. In press.

MOITRA, J.; SAMMANI, S.; GARCIA, J. G. Re-evaluation of Evans Blue dye as a marker of albumin clearance in murine models of acute lung injury. **Transl. Res.**, v. 150, n. 4, p. 253-265, 2007.

MOROHOSHI, M.; FUJISAWA, K.; UCHIMURA, I.; NUMANO, F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. **Diabetes**, v. 45, n. 7, p. 954-959, 1996.

MORRAN, M. P.; OMENN, G. S.; PIETROPAOLO, M. Immunology and genetics of type 1 diabetes. **Mt. Sinai J. Med.**, v. 75, n. 4, p. 314-327, 2008.

NIKOLAOU, P. K.; MacDONALD, B. L.; GLISSON, R. R.; SEABER, A. V.; GARRET, W. E. Jr. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 15, n. 1, p. 9-14, 1987.

OHNO, Y.; AOKI, N.; NISHIMURA, A. In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 77, n. 4, p. 1072-1077, 1993.

PORTH, C. M. **Pathophysiology Concepts of Altered Health States**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

RAMOS, L. **Efeito do laser de baixa potência no processo inflamatório induzido por estiramento muscular em ratos**. 2009. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RÁKOS, G.; KIS, Z.; NAGY, D.; LÜR, G.; FARKAS, T.; HORTOBÁGYI, T.; VÉCSEI, L.; TOLDI, J. Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain. **Acta Neurobiol. Exp. (Wars)**, v. 67, n. 2, p. 149-154, 2007.

ROSSINI, A. A. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 267-275, 2004.

SCHAFFER, M. R.; TANTRY, U.; EFRON, P. A.; AHRENDT, G. M.; THORNTON, F. J.; BARBUL, A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. **Surgery**, v. 121, n. 5, p. 513-519, 1997.

SCHUELKE, M.; WAGNER, K. R.; STOLZ, L. E.; HÜBNER, C.; RIEBEL, T.; KÖMEN, W.; BRAUN, T.; TOBIN, J. F.; LEE, S. J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 26, p. 2682-2688, 2004.

SCOTT, A.; KHAN, K. M.; ROBERTS, C. R.; COOK, J. L.; DURONIO, V. What do we mean by the term "inflammation"? A contemporary basic science update for sports medicine. **Br. J. Sports Med.**, v. 38, n. 3, p. 372-380, 2004.

SEXTON, W. L. Skeletal muscle vascular transport capacity in diabetic rats. **Diabetes**, v. 43, n. 2, p. 225-231, 1994.

SEXTON, W. L.; POOLE, D. C.; MATHIEU-COSTELLO, O. Microcirculatory structure-function relationships in skeletal muscle of diabetic rats. **Am. J. Physiol.**, v. 266, n. 4, pt. 2, p. H1502-H1511, 1994.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. **Neuromuscul. Disord.**, v. 17, n. 9-10, p. 721-722, 2007.

SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. Immune responses to inflammation and trauma: a physical training model. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 76, n. 5, p. 469-472, 1998.

SIMA, C.; RHOUIDA, K.; VAN DYKE, T. E.; GYURKO, R. Type 1 diabetes predisposes to enhanced gingival leukocyte margination and macromolecule extravasation in vivo. **J. Periodontal. Res.**, 2010. In press.

SINGH, J.; KAKKAR, P. Antihyperglycemic and antioxidant effect of Berberis aristata root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 123, n. 1, p. 22-26, 2009.

SINGH, R.; SHAW, J.; ZIMMET, P. Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world. **Pediatr. Diabetes**, v. 5, n. 3, p. 154-168, 2004.

SMITH, O. L.; WONG, C. Y.; GELFAND, R. A. Skeletal muscle proteolysis in rats with acute streptozocin-induced diabetes. **Diabetes**, v. 38, n. 9, p. 1117-1122, 1989.

SOSKOLNE, W. A.; KLINGER, A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: An overview. **Ann. Periodontol.**, v. 6, n. 1, p. 91-98, 2001.

SPADELLA, C. T.; SUAREZ, O. A.; LUCCHESI, A. N.; MARQUES, S. F.; CATANEO, A. J. Effects of pancreas transplantation on oxidative stress in pulmonary tissue from alloxan-induced diabetic rats. **Transplant. Proc.**, v. 42, n. 6, p. 2087-2091, 2010.

SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K.; OKULICZ, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiol. Res.**, v. 47, n. 5, p. 343-346, 1998.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

THOMPSON, J. L.; BALOG, E. M.; FITTS, R. H.; RILEY, D. A. Five myofibrillar lesion types in eccentrically challenged, unloaded rat adductor longus muscle - a test model. **Anat. Rec.**, v. 254, n. 1, p. 39-52, 1999.

TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 27, n. 7, p. 1022-1032, 1995.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. **J. Physiol.**, v. 578, pt. 1, p. 327-336, 2007.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, n. 2, p. R345-R353, 2005.

TIPTON, K. D.; WOLFE, R. R. Exercise-induced changes in protein metabolism. **Acta Physiol. Scand.**, v. 162, n. 3, p. 377-387, 1998.

TOLEDO, D. P.; AKAMINE, E.; NIGRO, D.; PASSAGLIA, R. C.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Microvascular reactivity in experimental diabetes: responses of male and female rats. **Inflamm. Res.**, v. 52, n. 5, p. 191-198, 2003.

TOOKE, J. E. Microvascular function in human diabetes: a physiological perspective. **Diabetes**, v. 44, n. 7, p. 721-726, 1995.

TURINA, M.; FRY, D. E.; POLK, H. C. Jr. Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects. **Crit. Care. Med.**, v. 33, n. 7, p. 1624-1633, 2005.

UCHIYAMA, Y.; TAMAKI, T.; FUKUDA, H. Relationship between functional deficit and severity of experimental fast-strain injury of rat skeletal muscle. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 85, n. 1-2, p. 1-9, 2001.

VAREJÃO, A. S.; CABRITA, A. M.; MEEK, M. F.; BULAS-CRUZ, J.; GABRIEL, R. C.; FILIPE, V. M.; MELO-PINTO, P.; WINTER, D. A. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. **Muscle Nerve**, v. 26, n. 5, p. 630-635, 2002.

VAREJÃO, A. S.; MEEK, M. F.; FERREIRA, A. J.; PATRÍCIO, J. A.; CABRITA, A. M. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **J. Neurosci. Methods.**, v. 108, n. 1, p. 1-9, 2001.

WANG, X.; LIANG, J.; KOIKE, T.; SUN, H.; ICHIKAWA, T.; KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M.; SHIKAMA, H.; WATANABE, T.; SASAGURI, Y.; FAN, J. Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits. **Am. J. Pathol.**, v. 165, n. 4, p. 1375-1383, 2004.

WARREN, G. L.; INGALLS, C. P.; LOWE, D. A.; ARMSTRONG, R. B. Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 82-87, 2001.

WETZLER, C.; KAMPFER, H.; STALLMEYER, B.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **J. Invest. Dermatol.**, v. 115, n. 2, p. 245-253, 2000.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS, M. S. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 10, p. 1030-1031, 2004.

WILLIAMSON, J. R.; HOFFMANN, P. L.; KOHRT, W. M.; SPINA, R. J.; COGGAN, A. R.; HOLLOSZY, O. Endurance exercise training decreases capillary basement membrane width in older nondiabetic and diabetic adults. **J. Appl. Physiol.**, v. 80, n. 3, p. 747-753, 1996.

YANG, Z.; CHEN, M.; CARTER, J. D.; ELLETT, J. D.; SMITH, K. M.; NADLER, J. L. Inflammation blockade improves pancreatic islet function. **Transplant. Proc.**, v. 36, n. 9, p. 2864-2865, 2004.

YASUDA, S.; IKUTA, K.; UWATOKU, T.; OI, K.; ABE, K.; HYODO, F.; YOSHIMITSU, K.; SUGIMURA, K.; UTSUMI, H.; KATAYAMA, Y.; SHIMOKAWA, H. In vivo magnetic resonance imaging of atherosclerotic lesions with a newly developed Evans blue-DTPA-gadolinium contrast medium in apolipoprotein-E-deficient mice. **J. Vasc. Res.**, v. 45, n. 2, p. 123-128, 2008.