Shaiane da Silva Tomazoni

**Efeito da sinvastatina na lesão muscular induzida por
estiramento passivo em ratos**

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

São Paulo

2011

Shaiane da Silva Tomazoni

**Efeito da sinvastatina na lesão muscular induzida por
estiramento passivo em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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 Álvaro Brandão Lopes Martins.

Versão original

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

Tomazoni, Shaiane da Silva.

Efeito da sinvastatina na lesão muscular induzida por estiramento passivo em ratos / Shaiane da Silva Tomazoni. -- 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: Effect of simvastatin in passive strain-induced skeletal muscle injury in rats

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

ICB/SBIB0192/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Shaiane da Silva Tomazoni.

Título da Dissertação: Efeito da sinvastatina na lesão muscular induzida por estiramento passivo em ratos.

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 completo:
Instituição:

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

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
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 **063** nas fls. **88** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rodrigo Alvaro Brandão Lopes Martins, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Análise do efeito da estatina na lesão muscular induzida por estiramento passivo em ratos** do qual participam o(s) alunos **Shaiane da Silva Tomazoni, Rafael Paolo Rossi, Maria Carla Petrellis, Rodrigo Leal de Paiva Carvalho, Luciano Ramos**, 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 **21.06.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 05 de agosto de 2010.

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

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

Aos meus pais Ivo e Ionira, que desde sempre são responsáveis por tornar meus projetos, desejos e sonhos possíveis. Que nunca mediram esforços para proporcionar o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu irmão Anderson, pela paciência e ensinamentos ao longo da nossa vida, que com certeza contribuíram de forma expressiva para que me tornasse o que sou hoje.

A todos os meus familiares e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e dedicando um pouco do seu tempo para torcer e acreditar no meu sucesso.

Ao Ernesto, Meu Amor,
Meu Parceiro, Meu Compaheiro.
Que permaneceu ao meu lado, demonstrando apoio, incentivo, compreensão, amizade e que acima de tudo, sempre acreditou na minha capacidade e vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar os meus sonhos possíveis e nunca me abandonar, mesmo nos momentos mais difíceis, me dando forças para nunca desistir.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, por ter proporcionado a chance de eu estar aqui e concluir esse projeto de vida. Por ter depositado confiança no meu trabalho, permitido o meu crescimento profissional. Além de ter oferecido muitos ensinamentos e conhecimentos para além da vida acadêmica.

Ao Professor Doutor Ernesto Cesar Pinto Leal Junior, os meus mais sinceros e profundos agradecimentos, por ter acreditado em mim e no meu trabalho desde o início, por ter me proporcionado inúmeras oportunidades e a quem eu devo a maioria das minhas conquistas profissionais. O qual além de me apresentar e introduzir na carreira acadêmica, me deu uma direção na vida.

Ao Professor Doutor Lúcio Frigo, pelo auxílio e paciência, além da contribuição com conhecimentos e ensinamentos.

Às técnicas Patrícia de Almeida Silva, Simone Aparecida Teixeira e Rosângela Eichler, por toda paciência, dedicação e ajuda prestada.

Aos meus colegas de laboratório Maria Carla Petrellis, Rafael Paolo Rossi, Rodney Capp Pallotta, Rodrigo Labat Marcos, Rodrigo Leal de Paiva Carvalho e Vanessa de Godoi, que sempre com muita paciência e dedicação caminharam comigo durante este projeto e que além de colegas de trabalho, se tornaram amigos.

Às secretárias do departamento de farmacologia, Selma Regina Malagueta Rigonati, Julieta Aparecida Gomes dos Santos e Camila Gonçalves Trindade, por todo auxílio com questões burocráticas.

À todas as pessoas que de uma forma ou outra estiveram ao meu lado, família, amigos e pessoas especiais, me auxiliando de qualquer forma, acreditando e torcendo pela minha vitória e pelo meu sucesso, entendendo a importância e dedicação desse momento, os meus mais sinceros agradecimentos.

“ Dá de ti o quanto puderes...

O **talento**, a **energia**, tudo enfim.

Até o **coração!**”

Mahatma Gandhi

RESUMO

TOMAZONI, S. S. **Efeito da sinvastatina na lesão muscular induzida por estiramento passivo em ratos.** 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Introdução: Os inibidores de HMG-CoA redutase (estatinas) são os fármacos prescritos com maior frequência para tratar desequilíbrios lipídicos, entretanto são responsáveis por provocar efeitos adversos como as miopatias. Neste estudo avaliamos o efeito da administração de sinvastatina no processo inflamatório induzido por lesão muscular esquelética. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo o primeiro grupo o controle (não recebeu nenhum tipo de intervenção), o segundo grupo recebeu tratamento com sinvastatina (20 mg/kg) durante 15 dias consecutivos, um terceiro grupo recebeu o mesmo tratamento com sinvastatina e foi submetido a um protocolo de lesão muscular por estiramento passivo do músculo tibial anterior, enquanto o último grupo apenas foi submetido ao protocolo de lesão muscular sem qualquer tratamento. Realizamos análise histológica, atividade de creatino-quinase (CK), extravasamento protéico, proteína c-reativa, expressão gênica através de RT-PCR de COX-1, COX-2 e TNF- α , níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e níveis de PGE₂, através do método de ELISA. As análises foram realizadas 6, 12 e 24 horas após o protocolo de lesão. **Resultados e discussão:** Os animais tratados com sinvastatina apresentaram danos morfológicos e estruturais do músculo esquelético mais significativos que os animais controles e que aqueles lesados sem tratamento, confirmados pela análise histológica e atividade elevada de CK. Entretanto não foram observadas alterações nos níveis de citocinas inflamatórias e outros marcadores do processo inflamatório, sugerindo um possível efeito-antiinflamatório do fármaco.

Palavras-chave: Sinvastatina. Estiramento passivo. Lesão muscular esquelética. Inflamação. Ratos.

ABSTRACT

TOMAZONI, S. S. **Effect of simvastatin in passive strain-induced skeletal muscle injury in rats**. 2012. 96 p. [Master thesis (Pharmacology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Introduction: The HMG-CoA reductase inhibitors (statins) are more frequent prescript drugs to treat lipid unbalance, however it is responsible to side effects such as myopathies. In this study we evaluated the effect of simvastatin administration in inflammatory process induced by skeletal muscle injury. **Materials and Methods:** Male Wistar rats were divided into four experimental groups, the first one was control group (does not received any intervention), the second group was treated with simvastatin (20 mg/kg) for 15 consecutive days, the third group was also treated at same way with simvastatin and animals were submitted to passive strain-induced skeletal muscle injury of anterior tibialis, and the fourth group was just submitted to passive strain-induced skeletal muscle injury protocol without any treatment. We performed histological analysis, creatine kinase (CK) activity, protein extravasation, CRP, gene expression of COX-1, COX-2 and TNF- α by RT-PCR, inflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and PGE₂ levels through ELISA method. Analyses were performed at 6, 12 and 24 hours after injury protocol. **Results and discussion:** Animals treated with simvastatin presented morphological and structural damages in skeletal muscle, significant higher than animals of control group and injured animals without treatment, which was confirmed by histological analysis and enhanced CK activity. However, it was not observed changes in inflammatory cytokine levels and other inflammatory markers, which suggests a possible anti-inflammatory effect of this drug.

Keywords: Simvastatin. Passive strain. Skeletal muscle injury. Inflammation. Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Dislipidemias	14
1.2 Estatinas	15
1.3 Lesão Muscular	18
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Tratamento com sinvastatina	24
3.3 Grupos experimentais	24
3.4 Modelo de lesão muscular por estiramento	25
3.5 Análise histológica por microscopia de luz (óptica)	26
3.6 Análises bioquímicas	27
3.6.1 Creatino-quinase	27
3.6.2. Análise de extravasamento protéico (técnica de azul de Evans)	28
3.6.3 Proteína C-reativa	29
3.6.4 Análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR)	29
3.6.5 Avaliação dos níveis de citocinas no músculo esquelético através do método de ELISA	30
3.6.6 Análise dos níveis de PGE ₂ no plasma sanguíneo através do método de ELISA	31
3.7 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Caracterização histológica do músculo tibial anterior por coloração HE e score dos achados histológicos	33
4.2 Creatino-quinase	42
4.3 Extravasamento protéico	45
4.4 Proteína C-reativa	48
4.5 Quantificação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)	51
4.5.1 Quantificação da expressão gênica de COX-1 pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)	51

4.5.2 Quantificação da expressão gênica de COX-2 pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)	54
4.5.3 Quantificação da expressão gênica de TNF- α pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)	57
4.6 Análise dos níveis de citocinas inflamatórias	60
4.6.1 Análise dos níveis de TNF- α no músculo tibial anterior	60
4.6.2 Análise dos níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior	63
4.6.3 Análise dos níveis IL-6 no músculo tibial anterior	66
4.7 Análise dos níveis de PGE₂ no plasma sanguíneo	69
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

O termo doenças cardiovasculares compreende um conjunto diverso de afecções do sistema circulatório. O risco cardiovascular aumenta à medida que há elevação dos níveis séricos de colesterol, potencializando outros fatores de risco. Neste contexto, podemos inferir que, a redução do colesterol sérico diminui a mortalidade cardiovascular (BUNOUT e ESCOBAR, 2000).

As dislipidemias normalmente caracterizam-se pelo aumento das concentrações em jejum de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos. Esses desequilíbrios lipídicos são tratados mais comumente com terapia farmacológica, sendo os inibidores de HMG-CoA redutase (estatinas) prescritos com maior frequência (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2002).

Os inibidores de HMG-CoA redutase, também conhecidos como estatinas, inibem especificamente a HMG-CoA no fígado (EVANS e REES, 2002), fazendo com que haja diminuição da síntese de colesterol nos hepatócitos (HOBBS et al., 1992), estimulação da expressão de receptores de LDL e aumento da remoção de LDL-C da circulação (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001). As estatinas são os fármacos de escolha para o tratamento de hipercolesterolemia devido a sua comprovada eficácia (SCHACHTER, 2005).

Além da utilização de fármacos, no tratamento da hipercolesterolemia são prescritas modificações no estilo de vida dos pacientes, sendo recomendada a diminuição de ingestão de gorduras, havendo ou não aumento da atividade física diária (FAHLMAN et al., 2002; KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Em geral as estatinas são uma família de fármacos relativamente segura (OMAR et al., 2001), no entanto um número importante de interações medicamentosas tem sido descritas, o que pode aumentar o risco de efeitos adversos, tendo sido especialmente relatados aqueles relacionados aos músculos esqueléticos (WORZ e BOTTORFF, 2001), como as miopatias (MOHAUPT et al., 2009).

Os mecanismos responsáveis pelo aparecimento das miopatias induzidas por estatinas ainda são pouco conhecidos, e muito menos se sabe a respeito do desenvolvimento de lesões musculares em presença, ou na vigência de tratamentos com esses fármacos. No entanto, algumas teorias têm sido propostas baseadas na inibição da via de biossíntese do colesterol pelas estatinas (HERMAN, 1999).

Além disso, em pacientes que fazem uso de drogas como as estatinas, as intervenções no estilo de vida são difíceis. Isso se dá pela preocupação de que esses fármacos possam ter efeitos adversos sobre a capacidade muscular em responder ao esforço físico. Ademais, existem relatos na literatura de que a terapia com estatinas pode induzir dano ao músculo esquelético, com ou sem aumento dos níveis séricos de creatino-quinase (MASCITELLI e PEZZETTA, 2009).

A prescrição de mudança de estilo de vida associada com a realização de atividade física faz com que os pacientes com hipercolesterolemia e muitas vezes em tratamento medicamentoso com estatinas, estejam sujeitos a sofrer lesões no músculo esquelético, acompanhadas de processo inflamatório no local.

A lesão muscular pode ocorrer por uma diversidade de mecanismos, desde deformação mecânica (como estiramentos, lacerações e contusões) até causas indiretas (como isquemia e dano neurológico) (LI et al., 2001). Embora exista mais de um tipo de lesão muscular, normalmente o dano provocado e o processo de reparo são similares na maioria dos casos (HURME, 1991).

Contudo, até o momento, ainda não existem estudos que analisem os efeitos das estatinas sobre o processo inflamatório e de reparação tecidual após lesão do músculo esquelético.

1.1 Dislipidemias

Entre as doenças cardiovasculares, as que merecem maior destaque são: a cardiopatia isquêmica, a doença hipertensiva, as enfermidades reumáticas crônicas (BUNOUT e ESCOBAR, 2000) e as doenças cerebrovasculares, principalmente o acidente vascular cerebral que é a maior causa de morbidade e mortalidade em mulheres e homens idosos (THOM e EPSTEIN, 1994).

Estudos clínicos têm indicado que as dislipidemias são o fator de risco modificável mais importante para doenças coronarianas (FERDINAND, 2004; WATKINS, 2004).

As dislipidemias normalmente caracterizam-se pelo aumento das concentrações em jejum de colesterol total, de colesterol LDL e triglicerídeos, enquanto há uma diminuição nas concentrações de colesterol HDL. Esses desequilíbrios lipídicos são tratados mais comumente com terapia farmacológica. Os agentes farmacológicos prescritos com maior frequência são: inibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima

A (HMG-CoA) redutase (estatinas), sequestradores de ácidos biliares, ácido nicotínico, ácidos fibrícos, inibidores da absorção do colesterol e ezetimibe (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2002).

Para o tratamento de hipercolesterolemia, além da utilização de fármacos, são prescritas modificações no estilo de vida dos pacientes, sendo recomendada a diminuição de ingestão de gorduras, principalmente gorduras saturadas, havendo ou não aumento da atividade física diária (FAHLMAN et al., 2002; KRIS-ETHERTON et al., 2002).

A seleção da terapia com fármacos para diminuição do colesterol leva em conta alguns efeitos adversos que podem ocorrer com determinadas drogas, incluindo efeitos adversos sobre o controle da pressão arterial. Os sequestradores de ácidos biliares podem diminuir a absorção de diuréticos. Já o ácido nicotínico pode aumentar a queda da pressão arterial devido aos vasodilatadores anti-hipertensivos. Os ácidos fibrícos são propensos a causar miopatia em pessoas com falência renal, portanto a dosagem deve ser cuidadosamente monitorada. A lista do FDA não especifica interações entre estatinas e agentes anti-hipertensivos, no entanto pacientes com algumas formas de doenças renais podem apresentar maior risco de miopatia associada à terapia com estatina (SACKS, 1994; BESTEHORN, 1997).

1.2 Estatinas

Os inibidores (competitivos) de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) redutase, mais comumente conhecidos como estatinas, são os fármacos mais prescritos nas terapias para redução de colesterol, por serem atualmente os mais efetivos (DIRKS e JONES, 2006). A HMG-CoA redutase catalisa a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico, que é a etapa limitante na síntese de colesterol (HOBBS et al., 1992) no fígado e em outros tecidos (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001). As estatinas inibem especificamente a HMG-CoA redutase no fígado (EVANS e REES, 2002), fazendo com que haja diminuição da síntese de colesterol nos hepatócitos (HOBBS et al., 1992), estimulando a expressão de receptores de LDL e o aumento da remoção de LDL-C da circulação (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001). Adicionalmente, esses fármacos também têm efeitos benéficos em outros parâmetros lipídicos, incluindo aumento da concentração de lipoproteínas de alta

densidade (HDL) e diminuição da concentração de triglicerídeos (MARON et al., 2000).

As estatinas são os fármacos de escolha para o tratamento de hipercolesterolemia devido a sua comprovada eficácia (SCHACHTER, 2005). Estudos clínicos demonstraram que as estatinas reduzem a mortalidade e a morbidade em pacientes com doenças cardiovasculares da artéria coronariana e doenças cerebrovasculares (HEBERT, 1997; CLARK, 2003).

As estatinas compreendem uma família de fármacos, sendo composta por estatinas de primeira geração (lovastatina, pravastatina e sinvastatina) e as de segunda geração (fluvastatina, cerivastatina e atorvastatina). Esses fármacos diferem entre si em sua absorção, ligação às proteínas plasmáticas, excreção e solubilidade, além de haver variação na eficiência em reduzir LDL-C (IGEL et al., 2003).

Além disso, existem evidências crescentes provenientes de estudos clínicos, de que as estatinas possuem propriedades anti-inflamatórias não relacionadas a sua atividade hipolipemiante. Essas propriedades estariam relacionadas à redução de alguns parâmetros inflamatórios, tais como Proteína C-Reativa (PCR) e citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) em pacientes com hipercolesterolemia (DEVARAJ et al., 2006).

Em geral as estatinas são uma família de fármacos relativamente segura (OMAR et al., 2001), todavia um número importante de interações medicamentosas tem sido descritas (WORZ e BOTTORFF, 2001). No entanto, efeitos adversos iniciais têm sido observados quando há uso concomitante de estatinas com outras drogas, devido a inibição do citocromo P450 (CYP P450) (OMAR et al., 2001; MARTIN e KRUM, 2003), que em sua isoforma CYP 3A4 serve como a maior via para o metabolismo de lovastatina, sinvastatina, atorvastatina e cerivastatina. A inibição da atividade deste citocromo pode aumentar os níveis séricos do fármaco, aumentando a possibilidade de efeitos adversos (WORZ e BOTTORFF, 2001). Os sistemas hepático, renal e muscular raramente são afetados durante a terapia com estatinas, entretanto, as reações adversas mais comumente encontradas são as que envolvem o músculo-esquelético, variando desde mialgia, miopatia leve, miosite e ocasionalmente rabdomiólise, até a morte (EVANS e REES, 2002). Os riscos de

miopatia com o uso de estatinas é baixo, aumentando com a administração concomitante de agentes como a ciclosporina e genfibrozil, os quais elevam a exposição da droga no plasma (GRAHAM et al., 2004).

Com o uso das estatinas tem sido relatada toxicidade muscular em cerca de 3-5% dos indivíduos que as utilizam (UCAR et al., 2000; OMAR e WILSON, 2002). A mialgia é o efeito adverso mais comum em pacientes que fazem uso de estatina, sendo caracterizada por dor muscular difusa, tensão e fraqueza, que normalmente afetam grupos musculares proximais. Os níveis de creatino-quinase (CK) podem estar normais ou ligeiramente elevados nesses pacientes. Já a miopatia é definida por dor, tensão e fraqueza muscular associada à elevação anormal dos níveis de CK (10 vezes maior que o limite) (EVANS e REES, 2002). Entretanto, têm sido descrito que pacientes que apresentam miopatia associada à estatina podem ter níveis plasmáticos de CK normais. Além disso, a miopatia associada à estatina pode causar infiltração de células inflamatórias e atividade de células imunológicas no tecido muscular (PHILLIPS et al., 2002). Por fim, a miosite é caracterizada por fraqueza muscular com ou sem elevação dos níveis de CK, enquanto a rabdomiólise é caracterizada por destruição severa do músculo esquelético, com níveis elevados de CK (EVANS e REES, 2002). Um possível mecanismo que pode contribuir para miotoxicidade induzida pela administração de estatina é a quebra da homeostase de cálcio no músculo esquelético (HERBERT et al., 1997; THOMPSON, 2003). No entanto, os mecanismos pelos quais as estatinas induzem miopatia não são bem entendidos (MEADOR e HUEY, 2010). A inibição da HMG-CoA redutase pode ser um dos vários mecanismos que contribuem para a patogênese das lesões musculares induzidas pela administração de estatinas. O dano na síntese protéica é um fator crucial para o desenvolvimento de esteróides, contribuindo para os efeitos miotóxicos da estatina (OWCZAREK et al., 2005).

Algumas teorias têm proposto que os efeitos sobre o músculo esquelético acontecem devido à depleção de mediadores na via de biossíntese de colesterol (LAAKSONEN et al., 1995). A redução dos níveis de isoprenóides como a ubiquinona (coenzima Q10), por exemplo, ou proteínas regulatórias seriam responsáveis pela lesão muscular (FLINT et al., 1997). Provavelmente essas lesões resultariam do bloqueio na produção de farnesil pirofosfato, geranyl geranyl pirofosfato e seus metabólitos e não da inibição do e vias de síntese do colesterol

(OWCZAREK et al., 2005). A depleção de colesterol na membrana do miócito poderia afetar a estabilidade dessa membrana e predispor à miopatia (THOMPSON et al., 2003).

Em modelos experimentais, tem sido relatado que as estatinas afetam a fluidez da membrana do músculo esquelético através de alterações no teor de colesterol, interagindo com propriedades elétricas da membrana e bomba de Na^+/K^+ (BAKER e TARNOPOLSKY, 2001; WORTMANN, 2002).

1.3 Lesão Muscular

Conforme mencionado anteriormente, modificações no estilo de vida de pacientes com hipercolesterolemia podem ser prescritas, sendo as recomendações mais comuns o decréscimo no consumo de gordura, principalmente as gorduras saturadas e o aumento da atividade física diária (LEON e SANCHEZ, 2001).

A prescrição de atividade física para pacientes com doenças cardiovasculares consiste em exercícios com intensidade moderada (70 a 80% da frequência cardíaca máxima) de 3 a 5 vezes por semana (KOKKINOS e FERNHALL, 1999). No entanto, em pacientes que fazem uso de drogas, particularmente as estatinas, as intervenções no estilo de vida são difíceis. Isso se dá pela preocupação de que as estatinas possam ter efeitos adversos sobre a capacidade de o músculo responder ao esforço físico (MASCITELLI e PEZZETTA, 2009). Exercícios que requerem muito esforço físico ou realizados por pessoas não-treinadas podem causar lesões no músculo esquelético. Essas lesões induzidas pelo exercício normalmente acontecem em pequenos grupos musculares, envolvendo um processo localizado no músculo esquelético (McCULLY, 1986).

A lesão muscular representa um desafiador problema traumatológico. A lesão pode ocorrer por uma diversidade de mecanismos, desde deformação mecânica (como estiramentos, lacerações e contusões) até causas indiretas (como isquemia e dano neurológico) (LI et al., 2001).

Nas lesões musculares por estiramento, o músculo é submetido a uma excessiva força tênsil que provoca uma sobrecarga sobre as miofibras e conseqüentemente, ruptura na junção miotendínea. Já nas lesões musculares por contusão, o músculo é submetido à súbita e forte compressão, como um golpe direto

(JÄRVINEN et al., 2007). O músculo lesionado normalmente sofre um processo de degeneração e regeneração (LI et al., 2001).

Essas condições patológicas provocam variação nos níveis séricos de enzimas que servem como marcadores do estado funcional do tecido músculo-esquelético. Um aumento dessas enzimas pode representar um índice de necrose celular e dano tecidual decorrente de lesões musculares agudas e crônicas (SZUMILAK et al., 1998). Uma dessas enzimas é a CK que usualmente é utilizada como marcador sérico de lesão muscular (BRANCACCIO et al., 2010), já que seus valores elevados indicam dano tecidual (BRANCACCIO et al., 2007). Ademais, o acompanhamento dos níveis de CK e a caracterização de suas isoenzimas normalmente são utilizados para diagnosticar miopatias, cardiomiopatias e encefalopatias (HINA et al., 1997).

As lesões músculo-esqueléticas além de provocarem alterações bioquímicas, causam mudanças estruturais no músculo. Independentemente do tipo e do mecanismo de lesão, as alterações morfológicas e metabólicas que a seguem são semelhantes (SATO et al., 2003), ou seja, o dano geral causado nas estruturas musculares e o processo de reparação nesses casos são similares.

O músculo esquelético é altamente vascularizado, conseqüentemente lesões musculares provocam hemorragia dos vasos sanguíneos, resultando na formação de hematomas (HURME, 1991). Além disso, o evento patológico inicialmente observado após uma lesão muscular é a destruição mecânica das fibras musculares provocando dano à integridade do sarcolema das miofibras, ocasionando a entrada de cálcio extracelular na fibra muscular. Adicionalmente, ocorrem desarranjos e rompimento de miofilamentos, linha Z e sarcômeros, bem como, rompimento da arquitetura estrutural, desorganização das organelas, acentuando a atividade lisossomal (GARRETT JR., 1996). Em seguida, as fibras lesionadas são submetidas a um processo de necrose pelas proteases intrínsecas (JÄRVINEN e LEHTO, 1993). A massa necrótica produzida, macrófagos e linfócitos-T, se movem em direção aos vasos sanguíneos e se infiltram na área lesionada. Simultaneamente, a ativação dos linfócitos além de debridar o dano tecidual, secretam uma variedade de componentes bioativos que induzem a resposta inflamatória local (LI et al., 2001). A presença de alguns marcadores bioquímicos, como por exemplo, a Proteína C Reativa (PCR) pode ser considerada um indicativo de resposta inflamatória aguda. As propriedades da PCR sugerem que este seja um marcador sensível para

inflamações agudas e crônicas de diversas causas (DU CLOS, 2003). A mesma é utilizada como um marcador de infecção e inflamação, participando na defesa do organismo contra o hospedeiro (DU CLOS e MOLD, 2001).

Adicionalmente, as prostaglandinas têm sido identificadas e relacionadas como um dos maiores componentes envolvidos na inflamação tecidual (VANE, 1971). A enzima ciclooxigenase em suas diferentes isoformas é capaz de catalizar a conversão de ácido araquidônico em diversas prostaglandinas (MURAKAMI et al., 2000). Três isoformas da enzima ciclooxigenase têm sido bem descritas. A ciclooxigenase-1 (COX-1) é produzida de forma constitutiva, sintetizando prostaglandinas importantes para homeostase (TILLEY et al., 2001). Enquanto a ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma isoforma induzível que desempenha um papel importante na mediação da dor e inflamação após uma lesão, sendo que a elevação de seus produtos, como a PGE_2 , sensibiliza os nociceptores, fazendo com que haja um aumento da hipersensibilidade à dor (HEDENBERG-MAGNUSSON et al., 2002). E por fim, a ciclooxigenase-3 (COX-3) que não apresenta envolvimento significativo na inflamação tecidual (BOTTING, 2000).

A inflamação é composta por uma série de eventos bem descritos que em alguns casos tem início em uma lesão tecidual e termina com o reparo desse tecido. No entanto, nem sempre o processo inflamatório garante o reparo da lesão e a restauração da função tecidual (MALM, 2001). A resposta inflamatória coincide com o reparo, regeneração e crescimento muscular, os quais envolvem ativação e proliferação de células satélites (TIDBALL, 2005).

Após uma lesão muscular inicia-se uma sequencial e rápida invasão de células inflamatórias que pode persistir durante dias e até semanas. A resposta inflamatória normalmente é estereotipada, com invasão de leucócitos no local da lesão (TIDBALL, 2005). Há invasão de neutrófilos após algumas horas permanecendo durante 24 horas após a lesão. A presença de macrófagos ocorre em 24 horas e prossegue durante 14 dias após lesão muscular (BEATON, 2002). Neutrófilos e macrófagos contribuem para a degradação tecidual através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NGUYEN e TIDBALL, 2003) e também para produção de citocinas pró-inflamatórias (CANNON e ST PIERRE, 1998). Essas citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL)-1 β e fator de necrose tumoral (TNF- α) estão expressas no músculo-esquelético até 5 dias após a lesão (HAMADA et al., 2005) e desempenham um papel no início da degradação do

tecido muscular lesionado (CANNON e ST PIERRE, 1998). Outras citocinas como a IL-6, fator transformador de crescimento (TGF)- β 1, antígenos inflamatórios, como fator inibidor de leucemia (LIF) e fator induzível por hipóxia (HIF)-1 β também são expressos no músculo esquelético dias após lesão muscular (HAMADA et al., 2005). Portanto, a resposta inflamatória após lesão muscular é predominantemente pró-inflamatória. Entretanto, pouco se sabe a respeito da expressão de citocinas anti-inflamatórias como, antagonista do receptor IL-1 (IL-1ra), IL-4 e IL-10 no músculo após dano muscular (MALM et al., 2000).

A regeneração é o próximo passo após a lesão e a inflamação. Este processo é iniciado quando as células satélites em repouso, que estão localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares, são ativadas por vários fatores de crescimento liberados por infiltração de células mononucleares e plaquetas associadas com o hematoma recém formado (FIELDING et al., 1993).

As fibras musculares submetidas à regeneração, normalmente sofrem com a formação de tecido cicatricial. A matriz extracelular é o ponto subjacente de formação de cicatriz, fazendo parte de uma rede de tecido conjuntivo encontrado no músculo esquelético, composta por células fibroblásticas e uma malha complexa de alguns tipos de colágenos, glicoproteínas e proteoglicanos (MUTSAERS et al., 1997).

A cicatrização de um músculo lesionado normalmente segue um padrão constante, independente da causa (contusão, estiramento ou laceração) (JÄRVINEN et al., 2005). Neste processo, três fases têm sido bem identificadas: 1. Fase de destruição: ruptura e necrose das miofibras, formação de hematoma e reação de células inflamatórias; 2. Fase de reparo: fagocitose do tecido necrosado, regeneração das miofibras, produção de tecido conjuntivo e revascularização através dos capilares na área da lesão; 3. Fase de remodelação: regeneração das miofibras, retração e reorganização do tecido conjuntivo e recuperação da capacidade funcional do músculo (HURME et al., 1991).

O reparo bem sucedido da lesão muscular envolve um equilíbrio delicado entre regeneração das fibras musculares e crescimento de tecido conjuntivo (MUTSAERS et al., 1997). A formação de fibrose normalmente leva à cicatrização inadequada, fazendo com que haja perda na recuperação funcional completa do músculo. A prevenção da formação de tecido fibrótico e a estimulação da

regeneração adequada são de grande importância para melhorar a cicatrização muscular após lesão (LI et al., 2001).

A magnitude da resposta inflamatória e possivelmente a interação específica entre músculo e células inflamatórias tem efeitos sobre os benefícios e prejuízos do processo inflamatório após lesão muscular (TIDBALL, 2005).

Entretanto, ainda não existem estudos que tenham analisado os efeitos das estatinas sobre o processo inflamatório e de reparação tecidual após lesão do músculo esquelético.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é analisar o efeito da administração de sinvastatina no processo inflamatório induzido por lesão muscular resultante de estiramento passivo do músculo tibial anterior em ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos pesando entre 250 - 300g, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP. Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura (22 a 24°C), umidade relativa (40 a 60%), ciclo de 12 horas claro-escuro com água e ração *ad libitum*. Os ratos foram randomizados e divididos em grupos de 5 animais. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), sob o nº 063, folhas 88, do livro 02.

3.2 Tratamento com sinvastatina

Os animais receberam tratamento com sinvastatina por via oral através de gavagem na dose de 20 mg/kg dissolvida em água destilada. O tratamento foi realizado durante 15 dias consecutivos no período da manhã. A dose de sinvastatina utilizada foi obtida a partir de dados da literatura científica.

3.3 Grupos Experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos de cinco animais como descrito 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 sinvastatina (sinv)– animais tratados com sinvastatina durante quinze dias consecutivos e não submetidos ao protocolo de lesão por estiramento.

Grupo sinvastatina submetido à lesão (sinv + lesão) – os animais foram submetidos ao protocolo de lesão muscular por estiramento após quinze dias consecutivos de tratamento com sinvastatina.

A retirada do músculo tibial anterior para análise foi realizada nos períodos de 6, 12 e 24 horas após a lesão muscular, seguida de eutanásia por dose excessiva do anestésico inalatório Halotano.

3.4 Modelo de Lesão Muscular por Estiramento

O modelo experimental de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior utilizado no presente estudo foi adaptado a partir do protocolo empregado no estudo de Nikolaou et al. (1987). Neste protocolo original, o alongamento foi realizado diretamente no tendão distal do músculo tibial anterior. Para isso foi realizada uma avulsão, a fim de separar o músculo tibial anterior do tecido subcutâneo juntamente com a pele. Para tal procedimento adentrou-se em um pequeno corte 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 foi separado de sua inserção. Ao término do alongamento, a incisão foi fechada e o animal recebeu uma única dose de antibiótico.

Em nosso laboratório foi desenvolvido e padronizado um novo protocolo de lesão muscular por estiramento baseado no protocolo de Nikolaou et al. (1987). Entretanto, em nosso modelo experimental o alongamento/estiramento muscular foi realizado 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 sinvastatina submetido à lesão foram anestesiados com uma mistura de Ketamina 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 uma cortiça acoplada ao sistema de alongamento (figura 1). O membro posterior direito ficou firmemente preso com uma linha passando por uma roldana e se prendendo a uma pisseta com volume de água correspondente a 150% da massa 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. O

protocolo foi realizado uma única vez sendo que o animal recebeu o alongamento durante 40 minutos.

Figura 1 - Sistema utilizado para o alongamento do músculo tibial anterior.

3.5 Análise Histológica por Microscopia de luz (óptica)

As amostras de tecido muscular foram fixadas em formol a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas e submetidas a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50% e progredindo até o álcool absoluto 100% (SYNTH). Em seguida, os músculos foram diafanizados com Xilol por 4 horas (SYNTH) para impregnação e inclusão em Paraplast[®] das amostras. Após este processo, as amostras foram colocadas em recipientes de alumínio adequados com Paraplast[®] fundido por 4 horas. Posteriormente à impregnação, as amostras foram colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina fundida e deixadas para endurecer, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes com 5 µm de espessura em micrótomo (LEICA RM 2125 RT) e foram lavados e colocados em banho-maria. Uma vez

precedido o preparo das amostras, os cortes foram colocados em lâminas para serem corados com o corante hematoxilina e eosina (HE). Após a coloração, os cortes foram montados em lâminas permanentes para posterior análise com o microscópio óptico da marca Nikon®, modelo Eclipse E-200. Posteriormente, os cortes foram fotografados através de uma câmera de microfotografia marca Dino-Lite Digital Microscope®, modelo DinoEye AM423X conectada a um microcomputador. Foram obtidas fotos de todos os grupos utilizando os aumentos de 100x. As imagens foram apresentadas com um padrão fotográfico similar. Após a análise das lâminas, foi elaborada uma tabela de *score* (tabela 1) baseada na microfotografia das lâminas histológicas. Os aspectos avaliados foram: infiltrados celulares, desorganização das fibras musculares, desorganização dos núcleos celulares, hemorragia e acidofilia irregular. O processo de análise do material foi realizado de forma cega, sendo que a identificação das lâminas foi revelada apenas após a elaboração do *score*. O *score* dos achados foi classificado em quatro níveis diferentes conforme a tabela abaixo:

Tabela 1 - Classificação dos achados através do *score*.

Símbolo Representativo	Quantidade do Achado
-	Ausente
+	Leve
++	Moderado
+++	Intenso

3.6 Análises bioquímicas

3.6.1 Creatino Quinase

Para análise de Creatino-Quinase (CK) foram coletados 3 ml de sangue do animal através de punção cardíaca imediatamente antes da eutanásia. Após a coleta sanguínea, o material foi centrifugado e apenas o conteúdo sobrenadante decorrente da centrifugação foi armazenado em freezer a -80 °C na forma de soro

até o momento da análise. A CK foi determinada de acordo com o kit comercial da Labtest[®]. Foi pipetado 1,0 mL do Reagente de Trabalho (reagente do kit). Em seguida, foi adicionado 0,02 mL de amostra de soro que foi homogeneizada e transferida imediatamente para uma cubeta termostatzada a 37 °C, permanecendo durante 2 minutos. Após, foi feita a leitura da absorbância inicial através do teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial.

3.6.2 Análise de 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[®] artigo 3169, foi preparada em solução salina e posteriormente filtrada em membrana esterilizante (0,22µm; MILLIPORE[®]).

Após anestesia com Ketamina 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 5 ml 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[®] modelo AT 56) e finalmente 200 µl do corante extraído pela formamida foram transferidos para microplacas 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.

3.6.3 Proteína C-Reativa

Para análise de Proteína C-Reativa (PCR) foram coletados 3 ml de sangue do animal através de punção cardíaca imediatamente antes da eutanásia. Após a coleta sanguínea, o material foi centrifugado e apenas o conteúdo sobrenadante decorrente da centrifugação foi armazenado em freezer a -80 °C na forma de soro até o momento da análise. A PCR foi determinada de acordo com o kit comercial da Wiener Lab (Argentina). O teste para a determinação rápida de PCR é semi-quantitativo e foi realizado através da aglutinação em lâmina em amostras diluídas de soro, pela reação com anticorpos específicos absorvidos sobre um suporte inerte de látex. Quando havia presença de PCR na amostra, ocorria uma reação com a suspensão de látex e uma aglutinação visível era formada em 2 minutos.

Para essa determinação semi-quantitativa as amostras de soro foram diluídas de maneira progressiva com solução salina (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.). A última diluição com resultado positivo (aglutinação) foi usada para calcular a concentração de PCR na amostra.

A concentração aproximada de PCR na amostra foi calculada com a seguinte fórmula: $\text{PCR (mg/l)} = \text{título} \times \text{sensibilidade de reação (6 mg/l)}$, onde o título é a inversa da máxima diluição na que se produzirá aglutinação visível macroscopicamente.

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

O músculo tibial anterior dos animais foi coletado após eutanásia e imediatamente colocado em contato com nitrogênio líquido, para promover o seu congelamento. Após, todas as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento da análise. A expressão gênica da enzima COX-1, COX-2 e TNF- α foram quantificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. 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 min a 95 °C e 40 ciclos de amplificação (30 seg de desnaturação a 95 °C e 1 min de anelamento e extensão a 60 °C); as sequências dos primers foram 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 à expressão do gene controle β -actina.

3.6.5 Avaliação dos níveis de citocinas no músculo esquelético através do método de ELISA

O músculo tibial anterior dos animais foi coletado após eutanásia e imediatamente colocado em contato com nitrogênio líquido, para promover o seu congelamento. Após, todas as amostras foram armazenadas em freezer a - 80°C até o momento da análise. As dosagens das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 nas amostras do 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 100 μ l de anticorpo monoclonal para cada citocina: anti IL-1 β e IL-6 foram diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), enquanto TNF- α foram diluídos em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). As placas foram incubadas a 4 °C durante 18h. Para o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 4 vezes e depois preenchidas com 300 μ l/poço de solução bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma) a 37 °C durante 3 horas e submetidas a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100 μ l das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionadas à placa e deixadas durante 18 horas em temperatura de 4 °C. Após lavagem, 100 μ l dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina foram acrescentados e deixados por 1h em temperatura ambiente (22 °C). Após lavagem das placas, o volume de 100 μ l de estreptavidina- peroxidase foi adicionado e deixado por 1h em temperatura ambiente (22 °C), seguido por novas lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100 μ l/poço da solução de 3,3´5,5´tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50 μ l/poço de ácido sulfúrico (2N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max plus 384

(Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção a 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1 β e TNF- α foi de 1.95 pg/ml, enquanto para IL-6 foi de 15.6 pg/ml.

3.6.6 Análise dos níveis de PGE₂ no plasma sanguíneo através do método de ELISA

Para análise de prostaglandina E₂ (PGE₂) foram coletados 3 ml de sangue do animal através de punção cardíaca imediatamente antes da eutanásia. Para coleta sanguínea, foi utilizado uma seringa contendo heparina. Após a coleta, o material foi centrifugado e apenas o conteúdo sobrenadante decorrente da centrifugação foi armazenado em freezer a -80 °C na forma de plasma até o momento da análise. A quantificação dos níveis de PGE₂ foi feita através do *kit* – R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) contendo anticorpo anti-PGE₂ aderido à placa. Inicialmente foi adicionado 150 μ l de solução contendo antígeno PGE₂ em diferentes concentrações para a confecção da curva padrão. Posteriormente foi adicionado 100 μ l de amostra nos poços da placa de leitura, juntamente com 50 μ l do anticorpo primário e 50 μ l do conjugado de PGE₂. A placa foi incubada durante 12 a 16 horas em uma temperatura de 4 °C. Em seguida, foi realizada a lavagem da placa com 200 μ l de solução tampão (wash buffer) por 4 vezes. A seguir, adicionamos à placa uma solução de substrato (solução A + solução B, em proporções iguais) proveniente do *kit*. Após o tempo estabelecido na bula do *kit* (60 a 90 minutos), adicionamos 50 μ l/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção a 570 nm.

No intuito de facilitar o entendimento do desenho experimental, apresentamos na figura 2 o fluxograma do estudo.

Figura 2 - Desenho experimental.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) e analisados através da análise de variância (ANOVA) com *post hoc* de *Student-Newman-Keuls* para múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização histológica do músculo tibial anterior por coloração HE e score dos achados histológicos

A figura 3 representa um corte longitudinal do músculo tibial anterior do grupo hígido. Podemos observar relativa desorganização nas fibras musculares, com áreas de agrupamento desregular de núcleos na periferia e núcleos celulares localizados na periferia da fibra muscular.

Grupo hígido

Figura 3 - Fotomicrografia - Desorganização das fibras musculares (A), núcleos na periferia da fibra muscular (B), área de agrupamento de núcleos na periferia da fibra muscular (C). 100x.

Na tabela 2 observamos o *score* dos achados histológicos do grupo hígido.

Tabela 2 - *Score* dos achados histológicos do grupo hígido.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	++
Desorganização dos núcleos celulares	+
Hemorragia	-
Acidofilia irregular	-

A figura 4 representa um corte longitudinal do músculo tibial anterior do grupo sinvastatina. Podemos observar organização das fibras musculares, com aumento e agrupamento de núcleos celulares na periferia das fibras musculares, havendo áreas de disposição irregular dos núcleos celulares e uma grande área de hemorragia nas fibras musculares.

Grupo sinvastatina

Figura 4 - Fotomicrografia – Organização das fibras musculares (A), agrupamento de núcleos celulares na periferia da fibra muscular (B), disposição irregular dos núcleos celulares (C), área de hemorragia (D), 100 x.

Na tabela 3 observamos o score dos achados histológicos do grupo sinvastatina.

Tabela 3 - Score dos achados histológicos do grupo sinvastatina.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	-
Desorganização dos núcleos celulares	++
Hemorragia	+++
Acidofilia irregular	-

A figura 5 representa um corte longitudinal do músculo tibial anterior no grupo lesão após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento. Podemos observar que há organização das fibras musculares, presença de núcleos celulares na periferia, com aumento do número e seu agrupamento nas fibras musculares, além disso, observamos áreas muito discretas de acidofilia irregular no interior das fibras, indicando rompimento de miofibrilas.

Grupo lesão 6 horas

Figura 5 - Fotomicrografia – Fibras musculares organizadas (A), núcleos celulares na periferia (B), agrupamento de núcleos celulares (C), discreta acidofilia (D). 100 x.

Na tabela 4 observamos o *score* dos achados histológicos do grupo lesão 6 horas.

Tabela 4 - *Score* dos achados histológicos do grupo lesão 6 horas.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	-
Desorganização dos núcleos celulares	++
Hemorragia	-
Acidofilia irregular	+

A figura 6 representa um corte longitudinal do músculo tibial anterior do grupo lesão 12 horas após o protocolo de lesão muscular por estiramento. Podemos observar desorganização das fibras musculares, núcleos celulares em sua maioria localizados na periferia, porém em algumas regiões deslocados para o centro das fibras musculares, ademais havendo áreas com disposição irregular dos núcleos celulares. Além disso, podemos observar uma pequena área de hemorragia.

Grupo lesão 12 horas

Figura 6 - Fotomicrografia – Desorganização das fibras musculares (A), núcleos celulares na periferia (B), núcleos celulares deslocados para o centro (C), disposição irregular dos núcleos celulares (D), área de hemorragia (E). 100x.

Na tabela 5 observamos o score dos achados histológicos do grupo lesão 12 horas.

Tabela 5 - Score dos achados histológicos do grupo lesão 12.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	+++
Desorganização dos núcleos celulares	++
Hemorragia	+
Acidofilia irregular	+

A figura 7 representa um corte longitudinal do músculo tibial anterior do grupo lesão 24 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento. Observamos desorganização das fibras musculares, com deslocamento dos núcleos celulares para o centro das fibras e áreas discretas de acidofilia irregular, indicando rompimento de miofibrilas.

Grupo lesão 24 horas

Figura 7 - Fotomicrografia – Desorganização das fibras musculares (A), núcleos celulares deslocados para o centro (B), acidofilia irregular (C). 100 x.

Na tabela 6 observamos o *score* dos achados histológicos do grupo lesão 24.

Tabela 6 - *Score* dos achados histológicos do grupo lesão 24 horas.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	+
Desorganização dos núcleos celulares	+
Hemorragia	-
Acidofilia irregular	+

A figura 8 representa um corte longitudinal do músculo tibial anterior do grupo sinvastatina + lesão após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento. Podemos observar desorganização das fibras musculares, núcleos celulares na periferia e agrupados em disposição irregular no centro da fibra muscular. Além disso, observamos uma área de hemorragia e áreas de acidofilia irregular, indicando rompimento de miofibrilas.

Grupo sinvastatina + lesão 6 horas

Figura 8 - Fotomicrografia - Desorganização das fibras musculares (A), núcleos celulares na periferia (B), núcleos agrupados no centro da fibra muscular (C), área de hemorragia (D) acidofilia irregular (E). 100 x.

Na tabela 7 observamos o score dos achados histológicos do grupo sinvastatina + lesão 6 horas.

Tabela 7 - Score dos achados histológicos do grupo lesão sinvastatina + lesão 6 horas.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	+++
Desorganização dos núcleos celulares	+++
Hemorragia	++
Acidofilia irregular	+++

A figura 9 representa um corte histológico do músculo tibial anterior do grupo sinvastatina + lesão após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento. Observamos organização das fibras musculares, núcleos celulares agrupados na periferia e áreas de acidofilia irregular, indicando rompimento de miofibrilas.

Grupo sinvastatina + lesão 12 horas

Figura 9 - Fotomicrografia – Organização das fibras (A), núcleos agrupados na periferia (B), acidofilia irregular (C). 100 x.

Na tabela 8 observamos o score dos achados histológicos do grupo sinvastatina + lesão 12 horas.

Tabela 8 - Score dos achados histológicos do grupo lesão sinvastatina + lesão.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	-
Desorganização dos núcleos celulares	+
Hemorragia	-
Acidofilia irregular	+++

A figura 10 representa um corte histológico do músculo tibial anterior do grupo sinvastatina + lesão após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento. Observamos organização das fibras musculares, com a maioria dos núcleos celulares localizados na periferia da fibra, porém apresentando áreas irregulares de disposição dos núcleos deslocados para o centro da fibra muscular. Podemos observar uma pequena área de hemorragia.

Grupo sinvastatina + lesão 24 horas

Figura 10 - Fotomicrografia – Organização das fibras musculares (A), núcleos na periferia (B), núcleos deslocados para o centro (C), área de hemorragia (D). 100 x.

Na tabela 9 observamos o score dos achados histológicos do grupo sinvastatina + lesão 24 horas.

Tabela 9 - Score dos achados histológicos do grupo lesão sinvastatina + lesão 24.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Infiltrados celulares	-
Desorganização das fibras musculares	+
Desorganização dos núcleos celulares	+++
Hemorragia	++
Acidofilia irregular	-

4.2 Creatino-Quinase (CK)

A figura 11 demonstra os níveis de CK no soro sanguíneo dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 6 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. A partir da análise dos resultados observamos que houve elevação estatisticamente significativa dos níveis de CK no soro sanguíneo no grupo sinvastatina + lesão quando comparado aos demais grupos experimentais (hígido, sinvastatina e lesão).

Figura 11 - Aumento estatisticamente significativo dos níveis plasmáticos de CK no grupo sinvastatina + lesão em relação aos grupos hígido, sinvastatina e lesão, com $*p<0,05$, após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

Na figura 12 observamos os níveis de CK no soro sanguíneo dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 12 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de CK entre os grupos experimentais no protocolo de lesão de 12 horas.

Figura 12 - Níveis plasmáticos de CK dos animais após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

A figura 13 demonstra os níveis de CK no soro sanguíneo de todos os animais dos grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 24 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. A análise dos resultados demonstrou aumento estatisticamente significativo dos níveis plasmáticos de CK dos grupos lesão e sinvastatina + lesão quando comparados aos grupos hígido e sinvastatina.

Figura 13 - Elevação estatisticamente significativa dos níveis plasmáticos de CK nos grupos lesão e sinvastatina + lesão quando comparados aos grupos hígidos e sinvastatina, com $*p<0,05$ após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

4.3 Extravasamento Protéico

As figuras 14, 15 e 16 demonstram o extravasamento do azul de Evans no músculo tibial anterior de todos os grupos (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) nos tempos de 6, 12 e 24 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa no extravasamento protéico entre os grupos em todos os tempos analisados.

Figura 14 - Extravasamento protéico do azul de Evans no músculo tibial anterior após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

Figura 15 - Extravasamento protéico do azul de Evans no músculo tibial anterior após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

Figura 16 - Extravasamento protéico do azul de Evans no músculo tibial anterior após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

4.4 Proteína C-Reativa

Na figura 17 observamos os níveis de Proteína C-Reativa presentes no plasma dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 6 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstraram que há um aumento estatisticamente significativo de Proteína C-Reativa no grupo lesão quando comparado aos demais grupos experimentais (hígido, sinvastatina e sinvastatina + lesão).

Figura 17 - Aumento estatisticamente significativo dos níveis de Proteína C-Reativa no grupo lesão quando comparado aos grupos hígido, sinvastatina e sinvastatina + lesão, com $*p < 0,05$ após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

A figura 18 demonstra os resultados da análise dos níveis de Proteína C-Reativa presentes no plasma dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 12 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis plasmáticos de Proteína C-Reativa entre os grupos experimentais após 12 horas do protocolo de lesão.

Figura 18 - Níveis de Proteína C-Reativa no plasma dos animais após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

Proteína C-Reativa - 12 horas

Na figura 19 observam-se os níveis de Proteína C-Reativa presentes no plasma sanguíneo dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 24 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de Proteína C-Reativa entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 24 horas.

Figura 19 - Níveis de Proteína C-Reativa no plasma dos animais após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

Proteína C-Reativa - 24 horas

4.5 Análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)

4.5.1 Quantificação da expressão gênica de COX-1 pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)

A figura 20 demonstra os níveis da expressão gênica de COX-1 de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 6 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão gênica de COX-1 entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 6 horas.

Figura 20 - Níveis de expressão gênica de COX-1 dos animais após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

Na figura 21 observamos os níveis da expressão gênica de COX-1 no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de COX-1 entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 12 horas.

Figura 21 - Níveis de expressão gênica de COX-1 dos animais após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

Na figura 22 podemos observar os níveis da expressão gênica de COX-1 presentes no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. De acordo com o resultados, observamos que não houve alteração estatisticamente significativa nos níveis de COX-1 entre os grupos experimentais, após 24 horas do protocolo de lesão muscular.

Figura 22 - Níveis de expressão gênica de COX-1 dos animais após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

4.5.2 Quantificação da expressão gênica de COX-2 pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)

A figura 23 demonstra os níveis da expressão gênica de COX-2 presentes no músculo tibial anterior de todos os animais dos grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de COX-2 no grupo lesão quando comparado aos demais grupos experimentais (hígido, sinvastatina e sinvastatina + lesão).

Figura 23 - Níveis de expressão gênica de COX-2 dos animais após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

Na figura 24 observamos os níveis da expressão gênica de COX-2 no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de COX-2 entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 12 horas.

Figura 24 - Níveis de expressão gênica de COX-2 dos animais após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

A figura 25 demonstra os níveis da expressão gênica de COX-2 de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 24 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de COX-2 entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 24 horas.

Figura 25 - Níveis de expressão gênica de COX-2 dos animais após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

4.5.3 Quantificação da expressão gênica de TNF- α pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)

Na figura 26 podemos observar os níveis da expressão gênica de TNF- α presentes no músculo tibial anterior de todos os animais dos grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis da expressão gênica de TNF α entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 6 horas.

Figura 26 - Níveis de expressão gênica de TNF- α dos animais após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

A figura 27 demonstra os níveis da expressão gênica de TNF- α presentes no músculo tibial anterior de todos os animais dos grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 12 horas.

Figura 27 - Níveis de expressão gênica de TNF- α dos animais após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

Na figura 28 observamos os níveis da expressão gênica de TNF- α no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 24 horas

Figura 28 - Níveis de expressão gênica de TNF- α dos animais após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

4.6 Análise dos níveis de citocinas inflamatórias

4.6.1 Análise dos níveis de TNF- α no músculo tibial anterior

A figura 29 demonstra os níveis de TNF- α no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 6 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 6 horas.

Figura 29 - Níveis de TNF- α no músculo tibial anterior após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

Na figura 30 observamos os níveis de TNF- α no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 12 horas.

Figura 30 - Níveis de TNF- α no músculo tibial anterior após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

A figura 31 demonstra os níveis de TNF- α no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 24 horas.

Figura 31 - Níveis de TNF- α no músculo tibial anterior após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

4.6.2 Análise dos níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior

Na figura 32 observamos os níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 6 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-1 β entre os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 6 horas.

Figura 32 - Níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

A figura 33 retrata os níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior de todos os animais dos grupos experimentais desse estudo (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) no tempo de 12 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-1 β entre todos os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 12 horas.

Figura 33 - Níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

A figura 34 expõe os níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior de todos os grupos experimentais do presente estudo (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-1 β quando comparados todos os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 24 horas.

Figura 34 - Níveis de IL-1 β no músculo tibial anterior após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

4.6.3 Análise dos níveis de IL-6 no músculo tibial anterior

Na figura 35 observamos os níveis de IL-6 no músculo tibial anterior de todos os animais dos grupos experimentais desse estudo (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. A partir da análise dos resultados, observamos que não houve diferença estatisticamente significante nos níveis de IL-6 entre todos os grupos experimentais submetidos ao protocolo de lesão muscular no tempo de 6 horas.

Figura 35 - Níveis de IL-6 no músculo tibial anterior após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

A figura 36 retrata os níveis de IL-6 no músculo tibial anterior dos animais de todos os grupos experimentais do presente estudo (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-6 quando comparamos todos os grupos experimentais do protocolo de lesão muscular no tempo de 12 horas.

Figura 36 - Níveis de IL-6 no músculo tibial anterior 12 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento.

A figura 37 expõe os níveis de IL-6 no músculo tibial anterior de todos os animais dos grupos experimentais desse estudo (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais do protocolo de lesão muscular no tempo de 24 horas.

Figura 37 - Níveis de IL-6 no músculo tibial anterior após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

4.7 Análise dos níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo

Na figura 38 observamos os níveis de PGE_2 presentes no plasma sanguíneo de todos os animais dos grupos experimentais do presente estudo (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. A partir da análise dos resultados, observamos que o grupo lesão apresentou aumento estatisticamente significativo dos níveis de PGE_2 , em relação ao grupo hígido e ao grupo sinvastatina. Entretanto, o grupo lesão não apresentou alteração estatisticamente significativa em relação ao grupo sinvastatina + lesão.

Figura 38 - Aumento estatisticamente significativo dos níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo do grupo lesão quando comparado aos grupos hígido e sinvastatina, com $*p<0,05$, após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior.

A figura 39 demonstra os níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo de todos os animais dos grupos experimentais desse estudo (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de PGE_2 quando comparamos todos os grupos experimentais do protocolo de lesão muscular no tempo de 12 horas.

Figura 39 - Níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo após 12 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

A figura 40 retrata os níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo dos animais de todos os grupos experimentais (hígido, sinvastatina, lesão e sinvastatina + lesão) após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de PGE_2 quando comparamos todos os grupos experimentais do protocolo de lesão muscular no tempo de 24 horas.

Figura 40 - Níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo após 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo procuramos reproduzir uma lesão músculo esquelética por estiramento capaz de produzir dano e induzir um processo inflamatório agudo muscular, para posteriormente avaliar os efeitos da sinvastatina sobre o processo inflamatório.

Sabe-se que as lesões músculo-esqueléticas provocam alterações estruturais no tecido muscular. Independentemente do tipo e do mecanismo de lesão, as alterações morfológicas e metabólicas subsequentes são semelhantes (SATO et al., 2003).

O estudo de Nikolaou et al. (1987) teve como objetivo verificar a cicatrização do músculo tibial anterior de coelhos após lesão muscular por estiramento. Para tal, foi realizada a análise histológica do músculo dos animais em quatro situações distintas: imediatamente após o protocolo de lesão, 24 horas, 48 horas e 7 dias após o protocolo de lesão. Os resultados da análise histológica demonstraram a presença de alterações morfológicas nos animais submetidos ao protocolo de lesão. Os resultados histológicos imediatos ao protocolo de lesão demonstraram limitada ruptura de fibras distais e hemorragia. Após 24 horas do protocolo de lesão foi observada a presença de necrose de fibras musculares, infiltrado de células inflamatórias, edema e hemorragia. Posteriormente a 48 horas do protocolo de lesão, os resultados histológicos demonstraram ruptura completa das fibras musculares e intensa proliferação de células inflamatórias. Por fim, 7 dias após o protocolo de lesão a inflamação havia sido reduzida e havia presença de fibrose em estado avançado composta por colágeno.

O estudo de Ramos (2010), que utilizou o mesmo modelo de lesão muscular empregado no presente estudo e, portanto baseado na metodologia empregada no estudo de Nikolaou et al. (1987), realizou análise histológica do músculo tibial anterior de ratos em cinco diferentes tempos experimentais: 6, 12, 24, 36 e 48 horas após o protocolo de lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior. Os resultados histológicos demonstraram haver sinais de danos estruturais nos grupos lesionados após 6, 12 e 24 horas do protocolo de lesão, havendo sinais de desorganização das fibras musculares, disposição irregular dos núcleos celulares, rompimento de miofibrilas, congestão vascular e pequenos focos hemorrágicos. Por

outro lado, nos demais grupos (36 e 48 horas) foi observado o início de um processo de reparação do dano provocado pela lesão. A partir da caracterização histológica nos diferentes tempos, os resultados demonstraram haver maiores danos estruturais no músculo tibial anterior dos animais após 12 horas do protocolo de lesão.

A partir dos resultados encontrados no estudo de Ramos (2010), em que o período máximo em que foram observados sinais de dano estrutural no músculo lesionado foi de 24 horas após o protocolo de lesão muscular por estiramento, optamos no presente estudo por realizar a caracterização histológica do músculo tibial anterior apenas nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o protocolo de lesão. No entanto, diferindo da literatura supracitada não houveram sinais expressivos de danos estruturais dos músculos lesionados nos grupos lesão 6, 12 e 24 horas após protocolo de lesão nos diferentes tempos em relação ao grupo hígido. Os resultados histológicos demonstraram mudanças discretas na estrutura do tecido muscular, apontando para um processo discreto de lesão. As amostras histológicas apresentaram regiões com alterações sutis de estrutura, no entanto, não apresentaram as fases características decorrentes de uma lesão muscular típica.

A miopatia induzida por estatinas também pode provocar danos estruturais nas fibras musculares. EVANS e REES (2002) observaram, utilizando-se de biópsia muscular, necrose e regeneração de fibras musculares, enquanto a análise imunohistológica pode revelar presença de infiltrado de células inflamatórias e atividade de células imunológicas. Já na miosite induzida por estatinas, pode haver variação no tamanho das fibras, com evidência de necrose e presença de infiltrado inflamatório.

Mohaupt (2009) realizou um estudo com o objetivo de verificar se a miopatia associada ao uso de estatinas poderia provocar dano em estruturas musculares. Para isso, entre outras análises, foi realizado o estudo histológico através de microscopia óptica e eletrônica do tecido muscular de pacientes em uso de estatinas. Esse trabalho observou que apesar de haver dano generalizado nas fibras musculares das amostras que foram analisadas através de biópsia, foi moderado o grau de destruição das fibras individualmente. Os resultados da microscopia óptica demonstraram desacoplamento do aparato contrátil subsarcolemal, adicionalmente, a microscopia eletrônica confirmou esses achados e demonstrou que o sarcolema foi danificado. Além disso, foram identificadas variações no tamanho das fibras musculares dos pacientes com miopatia.

Assim como no estudo supra-mencionado, a análise histológica realizada no presente estudo identificou que os animais que foram submetidos ao tratamento com sinvastatina, apresentaram sinais de dano à estrutura muscular. Neste grupo observamos uma discreta alteração na estrutura das fibras musculares, bem como uma pequena área de hemorragia, sugerindo que o tratamento com o fármaco é capaz de provocar dano à musculatura esquelética. No entanto, foram observadas mudanças acentuadas nas estruturas musculares dos grupos tratados com sinvastatina e submetidos ao protocolo de lesão muscular por estiramento. Dessa forma, os resultados obtidos podem indicar que o tratamento isolado com sinvastatina não é capaz de provocar extensos danos, sendo detectáveis por análise histológica. Todavia, a associação do protocolo de lesão muscular por estiramento utilizado no presente estudo e o uso do fármaco em questão, pode ocasionar alterações morfológicas significativas no músculo esquelético.

Com o intuito de confirmar os resultados encontrados na análise histológica do presente estudo, foi realizada a análise dos níveis plasmáticos de CK, uma vez que o acompanhamento dos níveis dessa enzima em pacientes que utilizam estatinas é uma importante ferramenta para detecção de miopatias induzidas pelo fármaco. Vários graus de miopatia podem ser observados decorrentes da administração do fármaco em questão, variando desde sintomas moderados de mialgia até dano muscular e rabdomiólise, conforme mencionado anteriormente (WU et al., 2009).

Frequentemente o uso de estatinas pode produzir um aumento moderado dos níveis de CK. Normalmente esse aumento não ultrapassa 10 vezes os níveis considerados normais dessa enzima, dessa forma não provocando sintomas. Entretanto, é pouco conhecida a incidência de casos com elevação moderada dos níveis de CK e ausência de sintomas, pois existe escassez de estudos clínicos que reportem essa informação (THOMPSON et al., 2003).

No estudo realizado por Mohaupt (2009), já citado anteriormente, foi investigado se os níveis circulantes de CK refletiam a extensão do dano muscular observado em outras análises. Os resultados desse trabalho demonstraram que o nível médio de CK foi mais elevado em pacientes que apresentaram miopatia decorrente da administração de estatinas em relação aos pacientes que não utilizaram o fármaco.

Assim, como descrito nos trabalhos supracitados, no presente estudo encontramos alterações dos níveis de CK nos grupos em que houve administração de sinvastatina. No entanto, encontramos alterações estatisticamente significantes apenas nos grupos sinvastatina + lesão 6 e 24 horas após protocolo de lesão muscular por estiramento. Os grupos que receberam somente sinvastatina sem a associação de lesão muscular não apresentaram alteração significativa dos níveis de CK, indicando que o uso isolado de sinvastatina não foi capaz de desenvolver miosite a ponto de provocar alterações nos níveis séricos da enzima CK. Podemos sugerir que o efeito de elevação de CK pode estar relacionado ao tipo de estatina utilizado, ou talvez à dose utilizada no presente trabalho. A partir dessa análise, podemos sugerir que o aumento nos níveis de CK dos grupos sinvastatina + lesão após 6 e 24 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento se deu através da associação do tratamento com sinvastatina à lesão muscular por estiramento. Provavelmente a associação desses dois fatores, que de forma independente podem provocar aumento dos níveis de CK, fez com que no presente estudo seus níveis se elevassem, de maneira que fossem estatisticamente significantes em relação ao grupo hígido.

Além disso, os resultados demonstraram que o grupo lesão apenas no tempo experimental de 24 horas apresentou níveis de CK aumentados de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo hígido, indicando que a lesão muscular por estiramento realizada no presente estudo apresenta uma variabilidade inesperada nos resultados, podendo sugerir que por ser um modelo experimental inovador, ainda seja vulnerável à variações metodológicas ou relacionadas ao experimentador. De qualquer maneira, estudos adicionais ainda se fazem necessários para melhor caracterização do modelo utilizado.

De acordo com a literatura, a lesão muscular provoca dano muscular com elevação dos níveis séricos de CK. Entretanto, apenas no tempo experimental de 24 horas o grupo lesão apresentou o resultado esperado. Esse dado pode enfatizar que a associação de sinvastatina com a lesão muscular provocou as alterações dos níveis de CK. E que no presente estudo, ambas isoladamente poderiam não ser capazes de alterar esse marcador.

Além do dano no músculo-esquelético provocado por uma lesão muscular, ocorre também um aumento significativo do extravasamento protéico, resultante de processo inflamatório agudo. Isso acontece porque há alterações do fluxo vascular,

calibre e permeabilidade dos vasos sanguíneos (YASUDA et al., 2008). Dessa forma, pode ocorrer na região afetada, o extravasamento de proteínas circulantes para o espaço intersticial cerca de sete vezes mais do que ocorre em um vaso normal (MOITRA et al., 2007).

Para avaliar o extravasamento protéico em nosso estudo, foi utilizado o corante azul de Evans (frequentemente utilizado no estudo de permeabilidade celular) que combinado com a albumina, sofre deslocamento do espaço intravascular em direção ao extravascular e deposita-se no interstício do tecido. A quantidade de albumina que extravasa nos tecidos não é significativa em condições fisiológicas normais, no entanto, o extravasamento é importante na presença de processo inflamatório (YASUDA et al., 2008).

Em um estudo realizado por Ramos (2010), entre outras análises realizadas, a permeabilidade vascular foi analisada através do extravasamento protéico com o corante azul de Evans. Como resultado, foi encontrado um pico de extravasamento de proteínas no músculo lesionado no tempo de 6 horas após a lesão.

No presente estudo utilizamos o mesmo modelo de lesão muscular, assim como a mesma forma de análise de permeabilidade vascular, contudo, não foi encontrado o mesmo resultado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais em nenhum dos tempos testados. Dessa forma, podemos sugerir que o protocolo de lesão muscular por estiramento aplicado no presente trabalho não desencadeou um processo inflamatório agudo capaz de provocar alterações no extravasamento protéico.

No estudo de Hakim et al. (2009) o corante azul de Evans foi utilizado para avaliar o extravasamento de proteínas no músculo masseter de ratos. Depois da remoção, o tecido muscular foi pesado e colocado em tubos contendo 2 ml de formamida. Os tubos foram incubados a 60°C durante 24 horas. Após esse período o sobrenadante foi coletado. A quantidade de corante extraída do músculo foi determinada pela mensuração da absorbância do sobrenadante através de espectrofotômetro a 620 nm (FIORENTINO et al., 1999). A concentração do corante foi calculada em gramas a partir do peso do tecido muscular (HAKIM et al., 2009).

Para analisar permeabilidade vascular em músculo esquelético dos membros posteriores o estudo de Kronqvist et al. (2002) utilizou azul de Evans por via

intravenosa (50 µl por 10g de massa corporal) na veia caudal de camundongos. Os animais foram sacrificados 3 a 4 horas após a injeção de azul de Evans.

Já no estudo de Matsuda et al. (1995) o azul de Evans foi dissolvido em tampão fosfato-salino (PBS; 0.15 M NaCl, 10 mM tampão fosfato, pH 7.0), posteriormente a solução foi filtrada em membrana esterilizante (0,2 µm) e mantida a 4°C. A solução com o corante foi aplicada por injeção intravenosa (1mg de corante/0.1ml/10g de massa corporal) através da veia caudal e os camundongos foram sacrificados 3-24 horas após a injeção do azul de Evans.

A partir da análise da literatura supra mencionada percebeu-se que a metodologia empregada, desde a diluição e aplicação do corante azul de Evans, o tempo de sacrifício dos animais e a análise das amostras teciduais, apresenta enorme variabilidade, não havendo padronização nos métodos utilizados. Tal fato poderia comprometer a reprodutibilidade do método e limitar a comparação dos dados encontrados no presente estudo com os dados existentes na literatura. Além disso, há uma grande escassez de estudos que abordam extravasamento protéico com azul de Evans em lesões musculoesqueléticas, o que limita a comparação dos resultados encontrados no presente estudo com dados já existentes na literatura.

Assim como o método de extravasamento protéico é utilizado para analisar processo inflamatório agudo, a presença de alguns marcadores bioquímicos, como por exemplo, a Proteína C-Reativa (PCR), pode ser considerada indicativa de resposta inflamatória aguda.

A partir dos pressupostos envolvendo a PCR, estudos têm analisado os seus níveis plasmáticos, assumindo o seu papel como um marcador importante de dano muscular e resposta inflamatória (LEAL JUNIOR et al., 2009; LEAL JUNIOR et al., 2010). Em dois estudos de Leal Junior et al. (2009, 2010) os níveis de PCR no plasma sanguíneo de atletas de alto nível foram analisados para verificar a presença de processo inflamatório, provocado pelo dano muscular induzido por um protocolo de fadiga, envolvendo exercícios de alta intensidade do músculo bíceps. Em ambos os estudos, o exercício resultou em um aumento significativo dos níveis de PCR, podendo indicar presença de resposta inflamatória.

Seguindo o intuito de observar os níveis plasmáticos de PCR, para determinar a presença de processo inflamatório após lesão muscular por estiramento, o estudo de Ramos (2010) realizou uma caracterização da curva de tempo de PCR relacionada

com lesão muscular induzida por alongamento passivo em diferentes tempos. Como resultado, foi encontrado um aumento estatisticamente significativo dos grupos lesão 6h, lesão 12h e lesão 24h quando comparados ao grupo controle. No entanto, quando comparados apenas os grupos lesionados, apenas o grupo lesão 6h apresentou um aumento significativo em relação aos outros grupos analisados.

No presente estudo, utilizamos o mesmo protocolo de lesão, assim como a mesma forma de análise da PCR. No entanto, apenas o grupo lesão no tempo de 6h apresentou níveis elevados que fossem estatisticamente significantes em comparação aos demais grupos analisados, o que de certa forma diferiu dos resultados encontrados no estudo de Ramos (2010), que encontrou elevação dos níveis de PCR em todos os grupos lesionados. Os dados do nosso estudo podem indicar que o pico do processo inflamatório se dá 6 horas após a lesão muscular por estiramento do músculo tibial anterior, sendo que nos demais tempos analisados (12h e 24h), os níveis de PCR já voltaram ao seu estado basal, ou ainda, que não houve processo inflamatório nos tempos de 12 e 24 horas, por não ter ocorrido uma lesão músculo-esquelética de fato.

Durante a fase aguda a PCR desempenha um papel anti-inflamatório, sendo produzida muito rapidamente e em níveis elevados (MARNELL et al., 2005). No entanto humanos e ratos diferem no controle da síntese de PCR. Em humanos, a PCR é uma proteína da fase aguda, enquanto em ratos, ela é expressa constitutivamente em níveis baixos e aumenta apenas ligeiramente durante a resposta inflamatória aguda (PEPYS, 1979). Esta situação pôde ser observada em nosso estudo, já que os níveis de PCR de todos os grupos experimentais nos tempos de 12 e 24 horas estavam similares, apresentando níveis baixos.

Contudo, apesar dos resultados prévios acerca da PCR no processo inflamatório causado por lesões musculoesqueléticas ou dano muscular induzido por exercícios (LEAL JUNIOR et al., 2009; RAMOS, 2010; LEAL JUNIOR et al., 2010), em nosso trabalho observamos que os grupos lesão + sinvastatina nos diferentes tempos estudados não apresentaram alterações estatisticamente significantes nos níveis de PCR apesar de haver dano muscular, conforme observado na análise de CK e na análise histológica. Estes achados podem ser justificados por um possível efeito anti-inflamatório provocado pelas estatinas, hipótese essa testada por Albert et al. (2001).

Neste estudo de Albert et al. (2001) foi testada a hipótese de que a pravastatina (estatina) pode ter efeitos anti-inflamatórios evidenciados pela redução de PCR. Para isso foram analisadas mudanças nos níveis de PCR desde o início do estudo até 24 semanas após seu começo, onde os participantes foram divididos em ensaio de prevenção primária e receberam 40mg/dia de pravastatina ou placebo durante 24 semanas, ou em coorte de prevenção secundária recebendo 40 mg/dia durante 24 semanas. Durante este estudo prospectivo, a pravastatina reduziu os níveis de PCR tanto em 12 quanto em 24 semanas de tratamento de forma independente ao colesterol LDL. Estes dados evidenciam que as estatinas podem ter efeitos anti-inflamatórios adicionalmente aos efeitos hipolipemiantes (ALBERT et al., 2001).

Em outro trabalho com objetivo semelhante, procurou-se esclarecer a redução de marcadores inflamatórios em pacientes com hipercolesterolemia através de tratamento com estatinas e determinar fatores que poderiam predizer a redução desses marcadores. O estudo examinou dois grupos: o primeiro grupo consistia de 54 pacientes com hipercolesterolemia, que após determinação do perfil lipídico, iniciaram tratamento com estatinas. Já o segundo grupo consistia de 54 voluntários saudáveis. Amostras sanguíneas dos pacientes com hipercolesterolemia em tratamento com estatinas foram obtidas após 4 semanas de tratamento. Como resultado, a terapia com estatinas reduziu os níveis de PCR no plasma sanguíneo. Dessa forma, os autores concluíram que a terapia com estatinas reduz os marcadores inflamatórios em pacientes com hipercolesterolemia, sendo que esta ação anti-inflamatória é limitada a pacientes cujos marcadores inflamatórios estão acima do nível basal (HORIUCHI et al., 2010).

Até o presente momento, não encontramos estudos que correlacionem o efeito anti-inflamatório das estatinas com lesões músculo-esqueléticas. Sendo esta questão, portanto, ainda não elucidada.

Adicionalmente ao método de extravasamento protéico e PCR, a análise dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, bem como a expressão de COX-2 no músculo esquelético, pode ser uma ferramenta interessante para analisar inflamação após lesão do músculo-esquelético. A presença de processo inflamatório induzido por lesão músculo-esquelética apresenta características específicas, entre elas a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que podem permanecer durante dias no local lesionado (HAMADA et al., 2005), sendo fundamentais no processo

inflamatório. Da mesma forma, a expressão de COX-2 desempenha um papel importante na inflamação (HEDENBERG-MAGNUSSON et al., 2002).

No presente estudo realizamos a análise da expressão gênica, afim de verificar a expressão no gene dos níveis de COX-1, COX-2 e TNF- α . Como citado anteriormente, sabe-se que a atividade sérica de algumas enzimas do músculo esquelético desempenha a função de marcador do estado funcional do tecido muscular, variando muito em condições patológicas e fisiológicas (SZUMILAK et al., 1998). Durante anos, pesquisas sobre o processo inflamatório estiveram focadas em entender a função exercida pelas duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), tendo em mente a sua representatividade e papel fundamental no processo inflamatório (WALLACE, 2006). Enquanto está confirmado que a citocina pró-inflamatória TNF- α , está expressa dentro do músculo logo após a lesão e desempenha um papel importante no início da degradação do tecido muscular lesionado (CANNON e ST PIERRE, 1998).

Como citado anteriormente, a COX-1 é uma enzima constitutiva, expressa na maioria dos tecidos. Ela é importante por manter a homeostase e produzir prostaglandinas envolvidas em diversos processos fisiológicos do corpo humano, como por exemplo, na citoproteção gástrica, agregação plaquetária, auto-regulação do fluxo sanguíneo renal e início do parto. Assim como o esperado, no presente estudo os níveis da expressão gênica de COX-1 não apresentaram alterações estatisticamente significantes, sugerindo assim, a presença de COX-1 de forma constitutiva em todos os animais. Podemos dessa forma, inferir, que o uso da sinvastatina, bem como a indução da lesão muscular, não interferem nos níveis constitutivos da expressão gênica de COX-1.

A COX-2 é uma enzima induzida após certos estímulos, importante na mediação da dor e inflamação após uma lesão. O aumento dos seus níveis, indica presença de processo inflamatório. No estudo realizado por Ramos (2010), foi analisada a expressão gênica dos níveis de COX-2 nos animais submetidos ao protocolo de lesão muscular por estiramento. Os resultados demonstraram um aumento estatisticamente significativo dos níveis de COX-2 após 6 horas do protocolo de lesão muscular, sugerindo presença de inflamação no músculo tibial anterior.

No presente estudo não observamos alterações estatisticamente significantes na expressão gênica dos níveis de COX-2 no grupo experimental lesão nos tempos

de 6, 12 e 24 horas após protocolo de lesão muscular. Esses resultados diferem da literatura, visto que os animais foram submetidos a um protocolo de lesão que é responsável por desencadear um processo inflamatório, com consequente elevação dos níveis de COX-2. Porém, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a lesão muscular não foi capaz de induzir um processo inflamatório, desencadeando a típica elevação de marcadores inflamatórios. Esses resultados podem sugerir que o modelo experimental inovador utilizado no presente estudo apresenta uma variabilidade de resultados, devido ao fato de estar ainda em fase de caracterização.

No estudo de Martín-Ventura et al. (2005), foi investigado se o tratamento com altas doses de atorvastatina durante o período de um mês, sem o tratamento prévio com qualquer tipo de estatina, seria capaz de diminuir a inflamação em células mononucleares do sangue periférico e em placas ateroscleróticas na artéria carótida de pacientes apresentando estenose desta artéria. Como resultado foi encontrado que a atorvastatina foi capaz de diminuir a expressão gênica dos níveis de COX-2, além de proporcionar a redução de outros marcadores inflamatórios, sugerindo que o tratamento intensivo, durante um mês, com atorvastatina, diminui a atividade inflamatória de células mononucleares do sangue periférico e de placas ateroscleróticas na artéria carótida. No estudo de Massaro et al. (2010) foi investigado se a sinvastatina e a atorvastatina seriam capazes de afetar a expressão de COX-2 no endotélio humano. Como resultado, foi encontrado que as estatinas diminuíram a expressão de COX-2 no endotélio vascular humano.

Contudo, apesar de estudos relacionarem o uso das estatinas com a redução de COX-2 (HERNÁNDEZ-PRESA et al., 2002; DENG et al., 2006), a partir da análise dos resultados do presente estudo, verificamos um aumento de COX-2 no grupo sinvastatina + lesão após 6 horas do protocolo de lesão muscular. Dessa forma, podemos sugerir, que o aumento da COX-2 no grupo sinvastatina + lesão ocorra devido à lesão muscular, que eleva os níveis dessa enzima e não ao tratamento com o fármaco. Baseado em estudos citados anteriormente podemos inferir que o tratamento com sinvastatina tenha ocorrido por um curto espaço de tempo, não sendo capaz de provocar a redução dos níveis de COX-2. Adicionalmente, podemos sugerir que a dose de sinvastatina utilizada no presente estudo não foi capaz de causar redução dos níveis de COX-2, que encontravam-se elevados devido à lesão muscular.

Além disso, os resultados do presente trabalho sugerem que o tratamento com sinvastatina em animais apresentando lesão do músculo-esquelético, não seja capaz de reduzir os níveis de COX-2 e sim, que essa redução com o uso de sinvastatina descrita na literatura ocorra apenas em outras situações em que não haja a musculatura esquelética envolvida. O resultado encontrado no presente estudo diverge da literatura supracitada, entretanto como até o presente momento não existem estudos relacionando lesões do músculo esquelético e o uso de estatinas, torna-se difícil estabelecer uma comparação dos resultados aqui apresentados.

Poucos estudos reportam o envolvimento de citocinas em lesões musculoesqueléticas. Entretanto, um estudo que relatou lesão muscular por contusão, referenciou a mensuração de citocinas no músculo lesionado (BUNN et al., 2004). Neste estudo Bunn et al. (2004) utilizaram lesão muscular por contusão através de queda de massa para analisar o comportamento das citocinas IL-1 β e TNF- α após a lesão em dois grupos experimentais. Um dos grupos foi submetido a um protocolo de lesão leve (em que foi utilizada queda de 100 gramas de massa a uma altura de 130 milímetros) enquanto o outro grupo foi submetido a um protocolo de lesão severa (queda de 200 gramas de massa a uma altura de 130 milímetros). No grupo submetido à lesão muscular por contusão leve foi observado aumento das concentrações de IL-1 β e TNF- α até quatro dias após a lesão muscular. Enquanto no grupo submetido à lesão muscular por contusão severa os níveis de IL-1 β e TNF- α apresentaram um aumento gradativo e continuaram a aumentar até oito dias após a lesão.

No estudo realizado por Ramos (2010), foi observado que os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 apresentaram-se elevados após 12 horas do protocolo de lesão muscular, o que indicaria processo inflamatório agudo induzido pela lesão. Todavia no presente estudo não foi observada elevação nos níveis das citocinas pró-inflamatórias nos grupos lesão e lesão + sinvastatina em todos os tempos de protocolo. Esses resultados poderiam enfatizar a teoria citada anteriormente, a respeito da não reprodutibilidade do modelo experimental de lesão muscular por estiramento aplicado no presente estudo, visto que o mesmo não seria capaz de provocar a liberação de citocinas inflamatórias envolvidas no processo inflamatório agudo nos tempos testados.

Em um estudo de Novack et al. (2009), foi verificado a existência de um possível efeito anti-inflamatório na terapia com estatinas. Para isso, foi analisado se o uso de estatinas poderia reduzir os níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 em pacientes com infecção bacteriana aguda. Como resultado, foi encontrado que a terapia com estatinas poderia estar associada à redução de citocinas inflamatórias nestes pacientes. Já em outro estudo, Kagami et al. (2008) examinaram os efeitos da sinvastatina sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em mastócitos. A conclusão obtida foi que a sinvastatina seria capaz de inibir a produção de TNF- α e IL-6 em mastócitos ativadas. Por outro lado, um estudo com o intuito de determinar se o tratamento com altas doses (80 mg) de atorvastatina em indivíduos normolipidêmicos poderia reduzir os níveis circulantes de marcadores inflamatórios, como PCR e citocinas inflamatórias, observou que o tratamento com atorvastatina não provocou efeitos significativos nos níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios PCR, TNF- α e IL-6 (MILLAR et al., 2010).

Assim como na literatura supracitada, estudos têm reportado a redução nos níveis de marcadores inflamatórios com o uso de estatinas. Entretanto, essas mudanças estariam presentes apenas em pacientes com aumento dos níveis de marcadores inflamatórios e raramente em pacientes com níveis normais desses marcadores (PLENGE et al., 2002; STEINER et al., 2005). Dessa forma, os resultados encontrados no presente estudo corroboram com a literatura, visto que o grupo sinvastatina não sofreu alterações em relação ao grupo hígido, nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α (tanto na expressão gênica, quanto na expressão protéica). Portanto, nossos resultados enfatizariam que não há mudança nos níveis das citocinas inflamatórias com o uso de sinvastatina, sem alterações prévias desses marcadores.

Da mesma forma, os grupos sinvastatina + lesão, em todos os tempos de protocolo, não apresentaram alteração nos níveis das citocinas inflamatórias analisadas, tanto em relação à expressão gênica, quanto à expressão protéica. Esses resultados podem sugerir que assim como na literatura mencionada anteriormente, o uso da sinvastatina seria responsável por impedir que os níveis das citocinas inflamatórias se elevassem na presença de lesão músculo-esquelética, a qual teoricamente deveria provocar resposta inflamatória com a liberação destas citocinas. Todavia, tendo em vista que os grupos lesionados não apresentaram elevação dos níveis de citocinas inflamatórias, existe a possibilidade de que esses

resultados indiquem apenas que não houve mudança dos níveis de citocinas com o uso de sinvastatina, por não ter havido alteração prévia desses marcadores.

Existem alguns estudos que observaram o uso de estatinas sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias (KAGAMI et al., 2008; NOVACK et al., 2009; MILLAR et al., 2010). Entretanto, até o presente momento não encontramos estudos que correlacionem o uso de estatina com citocinas inflamatórias após lesões músculo-esqueléticas.

Assim como há liberação de citocinas pró-inflamatórias na presença de processo inflamatório agudo, também pode ser observada nesta fase a liberação de prostaglandinas. Estudos têm demonstrado que após lesões músculo-esqueléticas e dores musculares, pode ser observado um aumento nas concentrações de prostaglandinas, mais especificamente, PGE_2 (McARLE et al., 1994; HEDENBERG-MAGNUSSON et al., 2002). Entretanto há uma escassez de estudos relacionando lesões do músculo esquelético com liberação de prostaglandinas, mesmo sabendo que as mesmas exercem múltiplas funções no processo inflamatório muscular, incluindo estimulação de citocinas pró-inflamatórias, indução de síntese de óxido nítrico e vasodilatação com aumento de permeabilidade vascular (MURATA et al., 1997; LAPOINT et al., 2002).

No presente estudo, observamos um aumento estatisticamente significativo dos níveis de PGE_2 apenas no grupo lesão após 6 horas do protocolo de lesão muscular por estiramento. Entretanto, não observamos alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento de permeabilidade vascular neste mesmo tempo de protocolo, bem como nos demais tempos testados. Esses resultados podem inferir que exista um processo inflamatório presente neste grupo experimental no tempo de protocolo de 6 horas. Entretanto, nossos resultados não permitem afirmar que 6 horas após o protocolo de lesão muscular por estiramento, ocorra de fato o pico máximo do processo inflamatório. Contudo, a partir de todos os resultados analisados, podemos verificar uma tendência a um possível processo inflamatório sendo desencadeado no tempo de protocolo de 6 horas após a lesão muscular, podendo sugerir que o pico da lesão venha a ocorrer neste tempo experimental.

Em um estudo de Hernandez-Presa et al. (2002) foi evidenciado os efeitos antiinflamatórios das estatinas, provenientes da inibição da expressão da ciclooxigenase-2 em um modelo de aterosclerose em coelhos. Além disso, as

estatinas inibem respostas inflamatórias em diferentes modelos de doenças auto-imunes (AKTAS et al., 2003; BARSANTE et al., 2005). No estudo de Martín-Ventura et al. (2005), foi investigado se o tratamento com altas doses de atorvastatina durante um mês, sem o tratamento prévio com estatinas, seria capaz de diminuir a inflamação em células mononucleares do sangue periférico e em placas ateroscleróticas na carótida de pacientes com estenose de carótida. Como resultado foi encontrado que a atorvastatina foi capaz de diminuir significativamente os níveis plasmáticos de PGE_2 , além de proporcionar a redução de outros marcadores inflamatórios, sugerindo que o tratamento intensivo, durante um mês, com atorvastatina, diminui a atividade inflamatória de células mononucleares do sangue periférico e de placas ateroscleróticas na artéria carótida.

Como citado anteriormente, no presente estudo observamos que os animais do grupo lesão no tempo de protocolo de 6 horas apresentaram os níveis de PGE_2 elevados de forma estatisticamente significativa em relação aos demais grupos experimentais, enquanto os animais do grupo lesão + sinvastatina no tempo de protocolo de 6 horas não apresentaram alterações em relação ao grupo hígido e ao grupo sinvastatina. Esses resultados sugerem, que o uso de sinvastatina associado à lesão muscular provocou uma diminuição nos níveis de PGE_2 , de forma que seus níveis estivessem próximos do considerado como normal.

Como citado anteriormente, nos demais tempos de protocolo, 12 e 24 horas, não houve alterações estatisticamente significantes nos níveis de PGE_2 em nenhum dos grupos experimentais. De acordo com os resultados, não verificamos o aumento dos níveis de prostaglandina E_2 nos grupos submetidos à lesão muscular por estiramento, sugerindo a ausência de processo inflamatório nestes tempos de protocolo. Dessa forma, existe a dificuldade em analisar a inibição do processo inflamatório através do uso da sinvastatina, com consequente redução dos níveis de PGE_2 , já que não houve de fato expressão de processo inflamatório com aumento desta prostaglandina, decorrente da indução da lesão nos tempos de 12 e 24 horas após o protocolo de lesão muscular.

Adicionalmente, podemos sugerir que as miopatias decorrentes do uso de estatinas, mais precisamente o uso de sinvastatina, apesar de provocarem dor muscular, não desencadeiam processo inflamatório nos músculos envolvidos, além de não provocar a liberação de prostaglandina E_2 . Desta forma, nossos resultados

levam a crer que esses fatores não sejam os responsáveis pelas dores musculares desencadeadas pelo uso de estatinas.

Contudo, até o presente momento, verificamos que não existem estudos que correlacionem o uso de estatinas em pacientes apresentando inflamação decorrente de lesão músculo-esquelética. De forma geral, a literatura aborda os efeitos anti-inflamatórios decorrentes do uso de estatinas em outras situações, como por exemplo, em infecções bacterianas (NOVACK et al., 2009), em modelos experimentais de encefalomielite auto-imune e inflamação das vias aéreas induzida por antígeno (KAGAMI et al., 2008), inflamação em todos os estágios da aterosclerose (BIASUCCI et al., 2010), entre outros. Dessa forma, torna-se limitada a comparação dos dados encontrados no presente estudo com o existente na literatura.

Por fim, acreditamos que seja de extrema importância a realização de estudos que abordem o uso de estatinas e o correlacionem com lesões músculo-esqueléticas, visto que uma das principais prescrições médicas para pacientes com hipercolesterolemia é a utilização desses fármacos associada à realização de atividade física, tornando possível a ocorrência de lesões. Sabendo-se que as estatinas possuem um efeito anti-inflamatório, torna-se fundamental estudar esse efeito sobre o processo inflamatório decorrente de uma lesão muscular.

6 CONCLUSÃO

Baseado em nossos achados, podemos inferir que o tratamento com sinvastatina foi capaz de provocar danos morfológicos e estruturais no músculo esquelético, sendo observadas alterações relativas a dano muscular. Além disso, observamos um possível efeito anti-inflamatório do fármaco sobre algumas variáveis analisadas, que podem ter mascarado o desenvolvimento do processo inflamatório na sua forma mais clássica, contudo não podendo ser confirmado, devido à heterogeneidade dos resultados.

Dessa forma, será necessário realizar mais estudos relacionando os efeitos da sinvastatina sobre o músculo-esquelético e lesão muscular. Contudo, o uso de sinvastatina parece oferecer riscos para estrutura muscular e ao mesmo tempo provocar um interessante efeito inibidor sobre o processo inflamatório decorrente deste dano estrutural.

REFERÊNCIAS*

ALBERT, M. A.; DANIELSON, E.; RIFAI, N.; RIDKER, P. M.; PRINCE Investigators. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. **JAMA**, v. 286, n. 1, p. 64-70, 2001.

AKTAS, O.; WAICZIES, S.; SMORODCHENKO, A.; DORR, J.; SEEGER, B.; PROZOROVSKI, T.; SALLACH, S.; ENDRES, M.; BROCKE, S.; NITSCH R.; ZIPP, F. Treatment or relapsing in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 6, p. 725-733, 2003.

BAKER, S. K.; TARNOPOLSKY, M. A. Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspectives. **Clin. Invest. Med.**, v. 24, n. 5, p. 258-272, 2001.

BARSANTE, M. M.; ROFFE, E.; YOKORO, C. M.; TAFURI, W. L.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; CASTRO, M. S.; TEIXEIRA, M. M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 516, n. 3, p. 282-289, 2005.

BEATON, L. J.; TARNOPOLSKY, M. A.; PHILLIPS, S. M. Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. **J. Physiol.**, v. 544, pt. 3, p. 849-859, 2002.

BESTERHORN, H. P.; RENSING, U. F.; ROSKAMM, H.; BETZ, P.; BENESCH, L.; SCHEMEITAT, K.; BLUMCHEN, G.; CLAUS, J.; MATHES, P.; KAPPENBERGER, L.; WIELAND, H.; NEISS, A. The effect of simvastatin on progression of coronary artery disease: the Multicenter Coronary Intervention Study. **Eur. Heart J.**, v. 18, n. 2, p. 226-234, 1997.

BIASUCCI, L. M.; BIASILLO, G.; STEFANELLI, A. Inflammatory markers, cholesterol and statins: pathophysiological role and clinical importance. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 48, n. 12, p. 1685-1691, 2010.

BOTTING, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, Suppl. 5, p. S202-S210, 2000.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F.M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **Br. Med. Bull.**, v. 81-82, p. 209-230, 2007.

BRANCACCIO, P.; LIPPI, G.; MAFFULI, N. Biochemical markers of muscular damage. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 48, n. 6, p. 757-767, 2010.

* De acordo com:

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

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.

BUNOUT, D.; ESCOBAR, E. Prevention of cardiovascular diseases: should the same criteria be applied in Latin America and Europe and North America? **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 53, n. 7, p. 889-895, 2000.

CANNON, J. G.; ST PIERRE, B. A. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 179, n. 1-2, p. 159-167, 1998.

CLARCK, L. T. Treating dyslipidemia with statins: the risk-benefit profile. **Am. Heart J.**, v. 145, n. 3, p. 387-396, 2003.

DENG, P.; ZHAO, S. P.; DAI, H. Y.; GUAN, X. S.; HUANG, H. G. Atorvastatin reduces the expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute myocardial infarction and modulates the early inflammatory response. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 2, p.300-303, 2006.

DEVARAJ, S.; CHAN, E.; JIALAL, I. Direct demonstration of an anti-inflammatory effect of simvastatin in subjects with the metabolic syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 11, p. 4489-4496, 2006.

DIRKS, A. J.; JONES, K. M. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. **Am. J. Physiol.**, v. 291, n. 6, p. C1208-C1212, 2006.

DU CLOS, T. W. C-reactive protein as a regulator of autoimmunity and inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 6, p. 1475-1477, 2003.

DU CLOS, T. W.; MOLD C. The role of C-reactive protein in resolution of bacterial infection. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 3, p. 289-293, 2001.

EVANS, M.; REES, A. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same? **Drug Saf.**, v. 25, n. 9, p. 649-663, 2002.

FAHLMAN, M. M.; BOARDLEY, D.; LAMBERT, C. P.; FLYNN, M. G. Effects of endurance training and resistance training on plasma lipoprotein profiles in elderly women. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 57, n. 2, p. B54-B60, 2002.

FERDINAND, K. C. The importance of aggressive lipid management in patients at risk: evidence from recent clinical trials. **Clin. Cardiol.**, v. 27, n. 6 Suppl. 3, p. 12-15, 2004.

FIELDING, R. A.; MANFREDI, T. J.; DING, W.; FIATARONE, M. A.; EVANS, W. J.; CANNON, J. G. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 1 pt. 2, p. R166-R172, 1993.

FIORENTINO, P. M.; CAIRNS, B. E.; HU, J. W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, n. 1, p. 27-32, 1999.

FLINT, O. P.; MASTERS, B. A.; GREGG, R. E.; DURHAM, S. K. Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity in vitro. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 145, n. 1, p. 91-98, 1997.

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

GRAHAM, D. J.; STAFFA, J. A.; SHATIN, D.; ANDRADE, S. E.; SCHECH, S. D.; LA GRENADE, L.; GURWITZ, J. H.; CHAN, K. A.; GOODMAN, M. J.; PLATT, R. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipidlowering drugs. **JAMA**, v. 292, n.21, p. 2585-2590, 2004.

GOLDMAN, J. A.; FISHMAN, A. B.; LEE, J. E.; JOHNSON, R. J. The role of cholesterol-lowering agents in drug-induced rhabdomyolysis and polymyositis. **Arthritis Rheum.**, v. 32, n. 3, p. 358-359, 1989.

HAKIM, A. W.; DONG, X. D.; SVENSSON, P.; KUMAR, U.; CAIRNS, B. E. TNFalpha mechanically sensitizes masseter muscle afferent fibers of male rats. **J. Neurophysiol.**, v. 102, n. 3, p. 1551-1559, 2009.

HAMADA, K.; VANNIER, E.; SACHECK, J. M.; WITSELL, A. L.; ROUBENOFF, R. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. **FASEB J.**, v. 19, n. 2, p. 246-266, 2005.

HEBERT, P. R.; GAZIANO, J. M.; CHAN, K. S.; HENNEKENS, C. H. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. **JAMA**, v. 278, n. 4, p. 313-321, 1997.

HEDENBERG-MAGNUSSON, B.; EMBERG, M.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Effect on prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ levels by local administration of glucocorticoid in human masseter muscle myalgia. **Acta Odontol. Scand.**, v. 60, n. 1, p. 29-36, 2002.

HERMAN, R. J. Drug interactions and the statins. **CMAJ**, v. 16, n. 10, p. 1281-1286, 1999.

HERNÁNDEZ-PRESA, M. A.; MARTÍN-VENTURA, J. L.; ORTEGO, M.; GÓMEZ-HERNANDEZ, A.; TUÑÓN, J.; HERNÁNDEZ-VARGAS, P.; BLANCO-COLIO, L. M.; MAS, S.; APARICIO, C.; ORTEGA, L.; VIVANCO, F.; GERIQUE, J. G.; DÍAZ, C.; HERNÁNDEZ, G.; EGIDO, J. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 1, p. 49-58, 2002.

HINA, K.; KUSACHI, S.; TWASAKI, K.; TAKAISHI, A.; YAMAMOTO, K.; TOMINAGA, Y.; KITA, T.; TSUJI, T. Use of serum creatine kinase MM isoforms for predicting the progression of left ventricular dilation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. **Jpn. Circ. J.**, v. 61, n. 4, p. 315-322, 1997.

HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Hum. Mutat.**, v. 1, n. 6, p. 445-466, 1992.

HORIUCHI, Y.; HIRAYAMA, S.; SODA, S.; SEINO, U.; KON, M.; UENO, T.; IDEI, M.; HANYU, O.; TSUDA, T.; OHMURA, H.; MIIDA, T. Statin therapy reduces inflammatory markers in hypercholesterolemic patients with high baseline levels. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 17, n. 7, p. 722-729, 2010.

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.

IGEL, M.; SUDHOP, T.; VON BERGMANN, K. Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 42, n. 8, p. 835-845, 2002.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1160-1164, 2001.

JÄRVINEN, M. J.; LEHTO, M. U. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. **Sports Med.**, v. 15, n. 2, p. 78-89, 1993.

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.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, T. L.; KÄÄRIÄINEN, M.; AÄRIMAA, V.; VAITTINEN, S.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: optimising recovery. **Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 21, n. 2, p. 317-331, 2007.

KAGAMI, S.; KANARI, H.; SUTO, A.; FUJIWARA, M.; IKEDA, K.; HIROSE, K.; WATANABE, N.; IWAMOTO, I.; NAKAJIMA, H. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 146, Suppl. 1, p. 61-66, 2008.

KOKKINOS, P. F.; FERNHALL, B. Physical activity and high density lipoprotein cholesterol levels: what is the relationship? **Sports Med.**, v. 28, n. 5, p. 307-314, 1999.

KRIS-ETHERTON, P. M.; BINKOSKI, A. E.; ZHAO, G.; COVAL, S. M.; CLEMMER, K. F.; HECKER, K. D.; JACQUES, H.; ETHERTON, T. D. Dietary fat: assessing the evidence in support of a moderate-fat diet; the benchmark based on lipoprotein metabolism. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 61, n. 2, p. 287-298, 2002.

KRONQVIST, P.; KAWAGUCHI, N.; ALBRECHTSEN, R.; XU, X.; SCHRØDER, H. D.; MOGHADASZADEH, B.; NIELSEN, F. C.; FRÖHLICH, C.; ENGVALL, E.; WEWER, U. M.; ADAM12 alleviates the skeletal muscle pathology in mdx dystrophic mice. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 5, p. 1535-1540, 2002.

LAAKSONEN, R.; JOKELAINEN, K.; SAHI, T.; TIKKANEN, M. J.; HIMBERG, J. J. Decreases in serum ubiquinone concentrations do not result in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 57, n. 1, p. 62–66, 1995.

LAPOINTE, B. M.; FRENETTE, J.; COTE, C. H. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. **J. Appl. Physiol.** v. 92, n. 5, p. 1995-2004, 2002.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; ROSSI, R. P.; DE MARCHI, T.; BARONI, B. M.; DE GODOI, V.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; BJORDAL, J. M. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. **Lasers Surg. Med.**, v. 41, n. 8, p. 572-577, 2009.

LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; FRIGO, L.; DE MARCHI, T.; ROSSI, R. P.; DE GODOI, V.; TOMAZONI, S. S.; SILVA, D. P.; BASSO, M.; FILHO, P. L.; DE VALLS CORSETTI, F.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effects of low-level laser therapy (LLLT) in the development of exercise-induced skeletal muscle fatigue and changes in biochemical markers related to postexercise recovery. **J. Orthop. Sports Phys. Ther.**, v. 40, n. 8, p. 524-532, 2010.

LEON, A. S.; SANCHEZ, O. A. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, Suppl. 6, p. S502-S515, 2001.

LI, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. Muscle injury and repair. **Curr. Opin. Orthop.**, v. 12, p. 409-415, 2001.

MALM, C.; NYBERG, P.; ENGSTROM, M.; SJODIN, B.; LENKEI, R.; EKBLOM, B.; LUNDBERG, I. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. **J. Physiol.**, v. 529, pt. 1, p. 243-262, 2000.

MALM, C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? **Acta Physiol. Scand.**, v. 171, n. 3, p. 233-239, 2001.

MARNELL, L.; MOLD, C.; DU CLOS, T. W. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 117, n. 2, p. 104-111, 2005.

MASCITELLI, L.; PEZZETTA, F. Physical activity in statin-treated patients. **Int. J. Cardiol.**, v.134, n. 1, p. 136-137, 2009.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**, v. 101, n. 2, p. 207-213, 2000.

MARTIN, J.; KRUM, H. Cytochrome P450 drug interactions within the HMG-CoA reductase inhibitor class: are they clinically relevant? **Drug Saf.**, v. 26, n. 1, p. 13-21, 2003.

MARTÍN-VENTURA, J. L.; BLANCO-COLIO, L. M.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A.; MUÑOZ-GARCÍA, B.; VEGA, M.; SERRANO, J.; ORTEGA, L.; HERNÁNDEZ, G.; TUÑÓN, J.; EGIDO, J. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. **Stroke**, v. 36, n. 8, p. 1796-1800, 2005.

MASSARO, M.; ZAMPOLLI, A.; SCODITTI, E.; CARLUCCIO, M. A.; STORELLI, C.; DISTANTE, A.; DE CATERINA, R. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. **Cardiovasc. Res.**, v. 86, n. 2, p. 311-320, 2010.

MATSUDA, R.; NISHIKAWA, A.; TANAKA, H. Visualization of dystrophic muscle fibers inmdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **J. Biochem.**, v. 118, n. 5, p. 959-964, 1995.

McARDLE, A.; EDWARDS, R. H.; JACKSON, M. J. Release of creatine kinase and prostaglandin E₂ from regenerating skeletal muscle fibers. **J. Appl. Physiol.** v. 76, n. 3, p. 1274-1278, 1994.

McCULLY, K. K. Exercise-induced injury to skeletal muscle. **Fed. Proc.**, v. 45, n. 13, p. 2933-2936, 1986.

MEADOR, B. M.; HUEY, K. A. Statin-associated myopathy and its exacerbation with exercise. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 4, p. 469-479, 2010.

MILLAR, J. S.; KY, B.; WOLFE, M. L.; PRUSCINO, L.; BAER, A.; RADER, D. J. Short-term treatment with high-dose atorvastatin reduces LDL cholesterol but shows no anti-inflammatory effects in normolipidemic subjects with normal CRP levels. **Clin. Transl. Sci.**, v. 3, n. 4, p. 140-146, 2010.

MOHAUPT, M. G.; KARAS, R. H.; BABIYCHUK, E. B.; SANCHEZ-FREIRE V.; MONASTYRSKAYA K.; IYER L.; HOPPELER H.; BREIL F.; DRAEGER A. Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. **CMAJ**, v. 181, n. 1-2, p. E11-E18, 2009.

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.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; KUWATA, H.; KUDO, I. Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A (2)s. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 159-166, 2000.

MURATA, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; HIRATA, M.; YAMASAKI, A.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; AZE, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; UENO, A.; OH-ISHI, S.; NARUMIYA, S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. **Nature**, v. 388, n. 6643, p. 678-682, 1997.

MUTSAERS, S. E.; BISHOP, J. E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G. J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, n. 1, p. 5-17, 1997.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS (ADULT TREATMENT PANEL III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n. 25, p. 3143-3421, 2002

NGUYEN, H. X.; TIDBALL, J. G. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. **J. Physiol.**, v. 547, pt. 1, p. 125-132, 2003.

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. **Am. J. Sports Med.**, v. 15, n.1, p. 9-14, 1987.

NORMAN, D. J.; ILLINGWORTH, D. R.; MUNSON, J.; HOSENPUD, J. Myolysis and acute renal failure in a heart-transplant recipient receiving lovastatin. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, n. 1, p. 46-47, 1988.

NOVACK, V.; EISINGER, M.; FRENKEL, A.; TERBLANCHE, M.; ADHIKARI, N. K.; DOUVDEVANI, A.; AMICHAY, D.; ALMOG, Y. The effects of statin therapy on inflammatory cytokines in patients with bacterial infections: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. **Intensive Care Med.**, v. 35, n. 7, p. 1255-1260, 2009.

OMAR, M. A.; WILSON, J. P.; COX, T. S. Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. **Ann. Pharmacother.**, v. 35, n. 9, p. 1096-1107, 2001.

OMAR, M. A.; WILSON, J. P. FDA adverse event reports on statin associated rhabdomyolysis. **Ann. Pharmacother.**, v. 36, n. 2, p. 288-295, 2002.

OWCZAREK, J.; JASIŃSKA, M.; ORSZULAK-MICHALAK, D. Drug-induced myopathies. An overview of the possible mechanisms. **Pharmacol. Rep.**, v. 57, n. 1, p. 23-34, 2005.

PEPYS, M. B. Isolation of serum amyloid P- component (protein SAP) in the mouse. **Immunol.**, v. 37, n. 3, p. 637-641, 1979.

PHILLIPS, P. S.; HAAS, R. H.; BANNYKH, S.; PHILLIPS, P. S.; HAAS, R. H.; BANNYKH, S.; HATHAWAY, S.; GRAY, N. L.; KIMURA, B. J.; VLADUTIU, G. D.; ENGLAND, J.D. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. **Ann. Intern. Med.**, v. 137, n. 7, p. 581-585, 2002.

PLENGE, J. K.; HERNANDEZ, T. L.; WEIL, K. M.; POIRIER, P.; GRUNWALD, G. K.; MARCOVINA, S. M.; ECKEL, R. H. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction. **Circulation**, v. 106, n. 12, p. 1447-1452, 2002.

RAMOS, L. **Efeito do laser de baixa potência no processo inflamatório induzido por estiramento muscular em ratos**. 2010. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SATO, K.; LI, Y.; FOSTER, W.; FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; ADACHI, N.; USAS, A.; FU, F. H.; HUARD, J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 3, p. 365-372, 2003.

SACKS, F. M.; PASTERNAK, R. C.; GIBSON, C. M.; ROSNER, B.; STONE, P. H. Effect on coronary atherosclerosis of decrease in plasma cholesterol concentrations in normocholesterolaemic patients. Harvard Atherosclerosis Reversibility Project (HARP) Group. **Lancet**, v. 344, n. 8931, p. 1182-1186, 1994.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 19, n. 1, p. 117-125, 2005.

STEINER, S.; SPEIDL, W. S.; PLEINER, J.; SEIDINGER, D.; ZORN, G.; KAUN, C.; WOJTA, J.; HUBER, K.; MINAR E., WOLZT, M., KOPP C. W. Simvastatin blunts endotoxin-induced tissue factor in vivo. **Circulation**, v. 111, n. 14, p. 1841-1846, 2005.

SZUMILAK, D.; SULOWICZ, W.; WALATEK, B. Rhabdomyolysis: complications and treatment. **Przegl. Lek.**, v. 55, n. 5, p. 274-279, 1998.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest.** v. 108, n. 1, p. 15-23, 2001.

THOM, T. J.; EPSTEIN, F. H. Heart disease, cancer, and stroke mortality trends and their interrelations. An international perspective. **Circulation**, 1994; v. 90, n. 1, p. 574-582, 1994.

THOMPSON, P. D.; CLARKSON, P.; KARAS, R. H. Statin-associated myopathy. **JAMA**, v. 289, n. 13, p. 1681-1690, 2003.

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.

UCAR, M.; MJORNDAL, T.; DAHLGVIST, R. HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. **Drug Saf.**, v. 22, n. 6, p. 441-457, 2000.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat. New. Biol.**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

WALLACE, J. L. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. **Sci. World J.**, v. 6, p. 577-588, 2006.

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.

WATKINS, L. O. Epidemiology and burden of cardiovascular disease. **Clin. Cardiol.**, v. 27, n. 6 suppl 3, p. 2-6, 2004.

WORTMANN, R. L. Lipid-lowering agents and myopathy. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 14, n. 6, p. 643-647, 2002.

WORZ, C. R.; BOTTORFF, M. The role of cytochrome P450-mediated drug-drug interactions in determining the safety of statins. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 2, n. 7, p. 1119-1127, 2001.

WU, A. H.; SMITH, A.; WIAN, F. Interpretation of creatine kinase and aldolase for statin-induced myopathy: Reliance on serial testing based on biological variation. **Clin. Chim. Acta**, v. 399, n. 1-2, p. 109-111, 2009.

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.