

Ana Paula de Sousa Paixão

MORFOMETRIA DOS MÚSCULOS SÓLEO E GASTROCNÊMIO
APÓS IMOBILIZAÇÃO NA POSIÇÃO ENCURTADA DO MEMBRO
PÉLVICO DE RATOS, DURANTE 15, 30 E 45 DIAS

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2011

Ana Paula de Sousa Paixão

MORFOMETRIA DOS MÚSCULOS SÓLEO E GASTROCNÊMIO
APÓS IMOBILIZAÇÃO NA POSIÇÃO ENCURTADA DO MEMBRO
PÉLVICO DE RATOS, DURANTE 15, 30 E 45 DIAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Patologia Geral
Orientador: Prof. Anilton Cesar Vasconcelos
Co-orientador: Prof. José Dias Corrêa Junior

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2011

Paixão, Ana Paula de Sousa.
P149m Morfometria dos músculos sóleo e gastrocnêmio após imobilização na posição encurtada do membro pélvico de ratos, durante 15, 30 e 45 dias [manuscrito]. / Ana Paula de Sousa Paixão. -- Belo Horizonte: 2011. 83f.: il.
Orientador: Anilton César Vasconcelos.
Co-Orientador: José Dias Corrêa Junior.
Área de concentração: Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Apoptose. 2. Atrofia Muscular. 3. Autofagia. 4. Imobilização. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Vasconcelos, Anilton César. II. Corrêa Junior, José Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 40



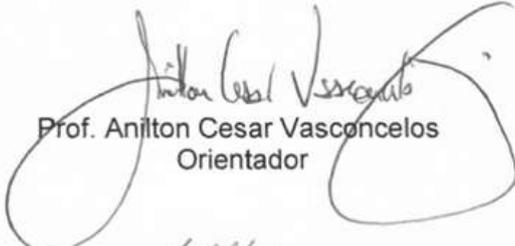
**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

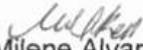
Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Anilton Cesar Vasconcelos, Milene Alvarenga Rachid e Paulo Eduardo Alencar de Souza, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“MORFOMETRIA DE MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO APÓS IMOBILIZAÇÃO NA POSIÇÃO ENCURTADA DO MEMBRO PÉLVICO DE RATOS, DURANTE 15, 30 E 45 DIAS”**, apresentada pela mestrand **ANA PAULA DE SOUSA PAIXÃO**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 25 de fevereiro de 2011.


Prof. Anilton Cesar Vasconcelos
Orientador


Profa. Milene Alvarenga Rachid


Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 532
Belo Horizonte - MG - CEP 31.130-106
Fone: (51) 3409-9641 FAX: (51) 3409-9640
cep@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado de ANA PAULA DE SOUSA PAIXÃO, nº de registro 2009658633. Às quatorze horas do dia 25 de fevereiro de dois mil e onze, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "MORFOMETRIA DE MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO APÓS IMOBILIZAÇÃO NA POSIÇÃO ENCURTADA DO MEMBRO PÉLVICO DE RATOS, DURANTE 15, 30 E 45 DIAS", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Anilton Cesar Vasconcelos, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Anilton Cesar Vasconcelos/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVA</u>
Profa. Milene Alvarenga Rachid	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVAR</u>
Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza	Instituição: PUC MINAS	Indicação: <u>APROVA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2011.

Prof. Anilton Cesar Vasconcelos _____
 Profa. Milene Alvarenga Rachid _____
 Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza _____
 Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) _____

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Patologia - Faculdade de Medicina/UFMG

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

Dedico este trabalho

A Deus em Primeiro lugar, pela oportunidade de existência. A meu marido Fabiano pelo amor e compreensão nestes dois anos de luta, pois sei que fui ausente algumas vezes, mas o momento chegou, vencemos juntos. Muito obrigada meu amor!

Dedico também esta vitória a minha família por ter acreditado em mim e ajudado a seguir em frente quando tropeçava e pensava em desistir. A minha mãe em especial, pela paciência, dedicação e amizade nas horas de medo e insegurança, me mostrando o lado positivo de tudo na vida. A Todos os meus irmãos pelo incentivo e carinho. Deixo aqui arquivado o meu obrigada a todos que participaram de mais um capítulo da minha história.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vitória concebida.

Ao orientador Prof. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos, pela oportunidade, confiança, aprendizado, crescimento profissional, dedicação e profissionalismo, ao grande amigo que se tornou em minha vida e também ao mais gentil e compreensivo orientador.

Ao co-orientador Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior, pelos ensinamentos, competência, paciência atribuída nos momentos de desespero e pelas companhias nos dias de experimento no laboratório, sempre sugerindo melhorias. Obrigada por se tornar mais um novo amigo.

À Prof^a. Dr^a Luciana Moro, pela colaboração de grande valia ao meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a Rosa Arantes, pela colaboração e por me proporcionar abertura ao mestrado. Obrigada.

Aos Professores da banca examinadora, pela disposição, pela valiosa contribuição e correção.

Aos Professores Antônio Carlos e José Carlos do Departamento de Morfologia - UFMG, pela experiência profissional e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Pedro Álves Campos, pela preocupação, disponibilidade, carinho e paciência.

Aos amigos do Laboratório do Estudo da Interação Químico-biológica e da Reprodução Animal (Depto de Morfologia, ICB-UFMG) ("Caro" Heder José, Marcela e Juliana), pelo aprendizado passado e não me esquecendo dos momentos maravilhosos que passamos juntos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Humana e Animal (Depto Biologia Celular, ICB-UFMG), em especial a doutoranda Anna Carolina Policarpo, pelo apoio nos momentos de gasto de energia via ATP nos experimentos e pela grande amiga que se tornou em minha vida.

À amiga mestranda Ana Cristina Pinto, pelo longo caminho que percorremos juntas, pelos apertos e sofrimentos que só nós duas sabemos e passamos para tornarmos o que somos hoje, não esquecendo as risadas e divertidas brincadeiras vividas.

A todo o pessoal do Laboratório de Apoptose, Irma, Núbia e Soraia, pelos momentos inesquecíveis que vivemos.

À amiga e estagiária Aline Cristina Vita, pela dedicação nos momentos de correria no laboratório e confiança em meu trabalho.

Ao amigo doutorando Endrigo Gabellini (Escola de Veterinária- UFMG), pelo apoio e experiências com os meus ratinhos.

À Pós-Doutoranda e amiga Paula Peixoto Campos (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG), que com toda a sua experiência e carreira me mostrou ser uma pessoa humilde, paciente e dedicada, obrigada pelo apoio nas técnicas desenvolvidas e principalmente pela amizade.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Milene Alvarenga Rachid e Tatiane Alves da Paixão, pelas sugestões ao meu trabalho.

Às professoras de Anatomia Humana do Departamento de Morfologia, ICB-UFMG (Karin Birgirt, Micena Roberta, Janice Henriques), pela oportunidade e confiança em meu trabalho.

Ao técnico de fisiologia (UFMG) Darci, pela gentileza e humildade.

Ao técnico de histologia (PUC - Minas) Rubens Miranda, pela simpatia e serviços prestados.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Patologia Geral e Morfologia, pelo bom atendimento e amizade.

A toda minha família, o meu muito obrigada.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo financiamento

***“O homem não morre
quando deixa de
existir, mas sim
quando deixa de amar”***

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Diagrama ilustrando as características morfológicas observadas no processo de morte celular via apoptose.....	09
Figura 2-	Diagrama mostrando a sequência de eventos envolvidos no processo de morte celular via apoptose.....	10
Figura 3-	Estágios do processo de apoptose.....	11
Figura 4-	Rato anestesiado em decúbito lateral esquerdo com o membro pélvico direito imobilizado.....	15
Figura 5-	Músculo sóleo e gastrocnêmio respectivamente dispostos longitudinalmente.....	16
Figura 6-	Fotomicrografias do músculo sóleo corado em HE.....	23
Figura 7-	Fotomicrografias do músculo gastrocnêmio corado em HE.....	23
Figura 8-	Morfometria de imagem digitalizada do músculo sóleo para análise da área, diâmetro médio e perímetro entre grupos controle e imobilizado.....	24
Figura 9-	Imagens digitalizadas das células musculares do sóleo imobilizado durante 15 dias. Mionúcleos condensados e não condensados.....	30
Figura 10-	Imagens digitalizadas do tecido muscular e conjuntivo do gastrocnêmio aos 30 dias. PicroSiriusRed. Grupos controle e imobilizado.....	32
Figura 11-	Imagens digitalizadas do músculo sóleo aos 30 dias através de reação específica para os tipos de fibras musculares. Grupos controle e imobilizado.....	33
Figura 12-	Imagens digitalizadas do tecido muscular do sóleo com coloração específica para fibras nervosas.....	35
Figura 13-	Imagens digitalizadas das células musculares do sóleo com marcação positiva para núcleos em apoptose.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Médias e desvios padrões do número de células por campo analisado do músculo sóleo dos grupos controle e imobilizado.....	26
Gráfico 2-	Médias e desvios padrões do número de células por campo analisado do músculo gastrocnêmio, dos grupos controle e imobilizado.....	26
Gráfico 3-	Médias e desvios padrões do número de células alteradas por campo analisado do músculo sóleo nos grupos controle e imobilizado.....	27
Gráfico 4-	Médias e desvios padrões do número de células alteradas por campo analisado do músculo gastrocnêmio dos grupos controle e imobilizado.....	28
Gráfico 5-	Médias e desvios padrões dos mionúcleos por campo analisado do músculo sóleo dos grupos controle e imobilizado.....	28
Gráfico 6-	Médias e desvios padrões dos mionúcleos por campo analisado do músculo gastrocnêmio dos grupos controle e imobilizado.....	29
Gráfico 7-	Médias e desvios padrões dos mionúcleos condensados por campo analisado do músculo sóleo dos grupos controle e imobilizado.....	30
Gráfico 8	Médias e desvios padrões dos mionúcleos condensados por campo analisado do músculo gastrocnêmio dos grupos controle e imobilizado.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Médias e desvios padrões do peso corporal e peso muscular, dos músculos sóleo e gastrocnêmio, dos grupos controle e imobilizado nos três tempos.....	22
Tabela 2-	Médias e desvios padrões da área (A), diâmetro médio (D. Me) e perímetro (P) dos músculos sóleo e gastrocnêmio, dos grupos controle e imobilizado nos três tempos.....	25
Tabela 3-	Medias e desvios padrões da área média relativa do tecido conjuntivo dos músculos sóleo e gastrocnêmio nos grupos controle e imobilizado.....	32
Tabela 4-	Médias e desvios padrões das distribuições de 200 fibras musculares em tipo I e II dos músculos sóleo e gastrocnêmio nos grupos controle e imobilizado.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIF	Fator Indutor e Apoptose
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Enzima de clivagem do Trifosfato de adenosina
Bad	Proteína pró apoptótica da família Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated death promoter</i>)
Bak	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated K protein</i>)
Bax	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica descrita inicialmente no linfoma de c (<i>B Cell Lymphoma-2</i>)
Bcl-XL	Proteína anti-apoptótica da família Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated XL protein</i>)
Bcl-w	Proteína anti-apoptótica da família Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated w protein</i>)
Bid	Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 (<i>BH3 interacting domain death agonist</i>)
Bim	Proteína pró apoptótica da família Bcl-2 (<i>Bcl2-interacting mediator of cell death</i>)
BSA	Albumina Serica Bovina (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAB	Revelador Diaminobenzidina
DD	Domínios de morte (<i>Death Domains</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
Fas	CD 95, marcador de superfície para apoptose
FasL	Ligante do Fas
FG	Fibras glicolíticas de contração rápida (<i>Fast Glycolytic</i>)
Fig	Figura
FOG	Fibras de contração rápida Oxidativa-glicolítica (<i>Fast oxidative/</i>

	<i>glycolytic</i>)
g	Gramas
Graf	Gráfico
HE	Hematoxilina-Eosina
ICB-	Instituto de Ciências Biológicas
m-ATPase	Enzima de clivagem do Trifosfato de adenosina associada a miofibrila
ml	Mililitro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
NF-KB	Fator de Transcrição Kappa Beta
OCT	Meio para criotomia (<i>Optimal Cutting Temperature</i>)
PBS	Solução de Fosfato Tamponada (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
POD	Enzima Peroxidase
PSR	Corante PicroSirius Red
P53	Proteína de 53 KiloDaltons produto da expressão de gen supressor de tumor de mesma denominação
SNK	Teste estatístico de Newmann-Keuls
SO	Fibras de contração lenta oxidativa (<i>Slow-Oxidative</i>)
Tab	Tabela
TBS	Tampão Tris-Salino (<i>Tris Buffer Solution</i>)
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR	Receptor para o Fator de Necrose Tumoral
TRADD	Proteína do Domínio de Morte associada ao Receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>)
TRAF2	Fator associada ao Receptor 2 do Fator de Necrose Tumoral (<i>TNF receptor-associated factor 2</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Σ	Somatória
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius (medida de temperatura)

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
INTRODUÇÃO.....	03
REVISÃO DE LITERATURA.....	05
Estrutura do Músculo Estriado Esquelético.....	05
Tipos de Fibras Musculares.....	05
As Funções da Musculatura Esquelética.....	06
Atrofia Muscular Esquelética.....	07
Apoptose.....	08
Autofagocitose ou autofagia.....	12
Imobilização com atadura gessada como modelo indutor de Atrofia Muscular Esquelética.....	12
OBJETIVOS.....	14
Objetivo Geral.....	14
Objetivos Específicos.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Distribuição dos grupos e delineamento experimental.....	15
Pesagem Corporal e dos Músculos Gastrocnêmio e Sóleo.....	17
Coleta do Material.....	17
Processamento histológico para emblocamento em parafina.....	18
Morfometria.....	18
Análise qualitativa das fibras nervosas e placas motoras.....	19
Processamento Imunohistoquímico para detecção de Caspase 3.....	19
Processamento para determinação ATPásica e quantificação dos tipos de fibras musculares.....	20
Análise estatística.....	21
RESULTADOS.....	22
Peso Corporal e Peso muscular.....	22
Descrição Histológica e Histopatológica.....	23
Área, Diâmetro médio e Perímetro.....	25

Células do Tecido Muscular Esquelético (Miócitos).....	27
Núcleos do tecido Muscular Esquelético (Mionúcleos).....	29
Tecido Conjuntivo Muscular.....	32
Tipos de Fibras Musculares.....	34
Tecido Nervoso.....	35
Caspase 3.....	36
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APROVAÇÃO PELO CETEA.....	57
ARTIGO SUBMETIDO.....	58

RESUMO

Trinta ratos Wistar machos jovens foram submetidos à imobilização do membro pélvico para estudo da atrofia muscular esquelética. Os animais foram divididos em seis grupos (6 ratos por grupo imobilizado: I, por 15 dias; II, 30 dias; III, 45 dias; e 4 ratos por grupo controle: IV, 15 dias; V, 30 dias e VI, 45 dias). Após os períodos preconizados os músculos sóleo e gastrocnêmio direitos foram dissecados e pesados. Os ventres musculares foram seccionados para processamento histológico, análise imunohistoquímica, morfométrica e para criotomia e determinação de ATPases miofibrilares. Os pesos corporais e dos músculos gastrocnêmio e sóleo foram compilados. Secções histológicas coradas (Hematoxilina Eosina, PicroSiriusRed,) e secções Histoquímicas (ATPase) foram analisadas morfometricamente (número de células e de núcleos, dimensões celulares, área do conjuntivo muscular, tipos de fibras musculares). As fibras nervosas (secções histológicas - Glees-Marsland) e os núcleos em apoptose ou em autofagocitose (secções Imunohistoquímica - Caspase 3) foram analisados qualitativamente. A imobilização adaptada foi eficiente para manter o membro na posição desejada e causou atrofia muscular esquelética e diminuição significativa dos pesos corporal e dos músculos. O número de células e de núcleos aumentou, assim como a área média do tecido conjuntivo. As dimensões musculares (área, diâmetro médio e perímetro) diminuíram. As fibras nervosas em ambos os músculos foram menos visível e descontínua. No músculo sóleo, diminuíram as fibras predominantes do tipo I e aumentaram as do tipo II, enquanto no gastrocnêmio houve manutenção dos dois tipos de fibras. Em ambos os músculos ocorreu marcação positiva para apoptose e/ou autofagocitose de núcleos, sendo mais acentuada no sóleo. Concluindo, a imobilização com atadura gessada adaptada provoca atrofia muscular já evidente com 15 dias. O gastrocnêmio perdeu peso e dimensões musculares, tendo sido mais afetado que o sóleo. O tecido conjuntivo aumentou mais no músculo sóleo que no gastrocnêmio, assim como a marcação para apoptose e/ou autofagocitose de núcleos. O sóleo apresenta predomínio de fibras tipo I a partir dos 30 dias e o gastrocnêmio apresenta similaridades para os dois tipos de fibras musculares em todos os tempos de imobilização. Já o tecido nervoso se comportou igualmente em ambos os músculos, apresentando menos visível e descontínuo aos 45 dias. O músculo sóleo é menos sensível à imobilização que o gastrocnêmio aos 45 dias, porém mais vulnerável a atrofia pelo fato de apresentar mais fibras tipo I, e maior chance de apoptose ou autofagocitose de núcleos comprovadas pela maior marcação para caspase 3.

Palavras - chave: Apoptose, Autofagocitose, Atrofia Muscular, Imobilização.

ABSTRACT

Thirty young male Wistar rats were subjected to immobilization for the study of hind limb skeletal muscle atrophy. Animals were split into six groups (6 rats per treated group: I, for 15 days; II, 30 days; III, 45 days, and 4 mice / control group: IV, 15 days, V, VI and 30 days, 45 days). After such intervals, the gastrocnemius and soleus muscles were dissected and weighed. The muscle bellies were sectioned for histological, immunohistochemical and morphometric analysis, and cryotomized for myofibrillar ATPases determination. The body weights and gastrocnemius and soleus muscles were compiled. Stained histological sections (hematoxylin eosin, PicroSiriusRed,) and sections histochemistry (ATPase) were analyzed morphometrically (number of cells and nuclei, cell sizes, connective muscle area, muscle fiber types). Nerve fibers (sections histological - Glees-Marsland) and the nuclei in apoptosis and/or nuclear autophagocytosis (sections Immunohistochemistry - Caspase 3) were analyzed qualitatively. Immobilization caused skeletal muscle atrophy and a significant reduction in body and muscular weight. The number of cells and nuclei increased as well as the average area of connective tissue. The muscular dimensions (area, perimeter and diameter) decreased. The nerve fibers in both muscles were less visible and discontinuous. In the soleus muscle the predominant type I fibers decreased and type II increased, while in the gastrocnemius were maintained the proportion of the two types of fibers. In both muscles there was positive staining for apoptosis and/or nuclear autophagocytosis which was more pronounced in the soleus. In conclusion, immobilization in a plaster bandage causes muscle atrophy already evident at 15 days. The gastrocnemius muscle has lost weight and dimensions, being more affected than the soleus. The connective tissue increases more in the soleus muscle than in gastrocnemius as well as the labeling to apoptosis and/or nuclear autophagocytosis. The soleus shows a predominance of type I fibers to 30 days and the gastrocnemius has similarities to both types of muscle fibers in all times of immobilization. Already nervous tissue behaved equally in both muscles, with less visible and discontinued after 45 days. The soleus muscle is less sensitive to the immobilization that gastrocnemius detention to 45 days, but more vulnerable to atrophy due to having more type I fibers and has a higher chance of apoptosis and/or nuclear autophagocytosis, confirmed by a stronger staining for caspase 3.

Keywords: Apoptosis, Autophagocytosis, Muscle Atrophy, Immobilization.

INTRODUÇÃO

Quando um músculo permanece inativo por período prolongado, devido à imobilização, denervação ou microgravidade (ZHANG *et al.*, 2006; FAVIER *et al.*, 2008), são observadas maior degradação das proteínas contráteis frente à sua renovação, redução do número de miofibrilas, perda do volume celular (GUYTON e HALL, 1996) e redução no número de mionúcleos, tendo como consequência o quadro de atrofia muscular (VOLTARELLI *et al.*, 2007).

A atrofia muscular esquelética é um fenômeno clínico comum e tem-se constituído, nos últimos anos, objeto de estudo (VOLTARELLI *et al.*, 2007). A perda nuclear na atrofia pode resultar em morte celular via apoptose; sendo esse processo importante para a regressão de estruturas musculares (APPELL, 1990; GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1993; O'LEARY e HOOD, 2008). A apoptose na musculatura esquelética está associada a várias alterações regressivas inclusive na atrofia muscular (ADAMS *et al.*, 2001; DIRKS e LEEUWENBURGH, 2002; ADHIHETTY *et al.*, 2008).

Portanto, é preciso um estudo detalhado e profundo das alterações histológicas que envolvam a atrofia muscular esquelética para que se avalie a importância da apoptose nesse tecido (FERREIRA *et al.*, 2004; VOLTARELLI *et al.*, 2007; GUNDERSEN e BRUUSGAARD, 2008).

O presente trabalho visa a estudar a apoptose do tecido muscular esquelético em atrofia, assim como as alterações em sua constituição, considerando: quantidade de miócitos e mionúcleos, área de secção transversa, diâmetro médio e perímetro da fibra muscular, área do tecido conjuntivo intercelular e interfascicular, tipos (I e II) de fibras musculares além das fibras nervosas e placas motoras.

A atrofia muscular associada à imobilização aparece de maneira rápida e reversível (HADDAD *et al.*, 2003). A posição da imobilização influencia o grau total de atrofia muscular esquelética. Na posição encurtada ocorre um rápido aumento do grau de atrofia (SMITH *et al.*, 2000; JOKL e KONSTADT, 1983; KIM *et al.*, 2007; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984). Na literatura, é escassa a informação sobre a perda de fibras musculares em modelos imobilizados em longos períodos e sobre a técnica de imobilização por atadura gessada. Sendo este um procedimento clínico relativamente comum, existe a necessidade de se analisar qual seria o tempo de

imobilização para gerar a perda dos mionúcleos. Deve-se então esclarecer sobre a possível ocorrência da apoptose nas células musculares e sua participação no processo de atrofia muscular.

REVISÃO DE LITERATURA

Estrutura do Músculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é formado por numerosas fibras musculares multinucleadas que se estendem por todo o comprimento muscular. Cada fibra é envolvida por uma camada de tecido conjuntivo, chamada endomísio. Estas fibras individuais são agrupadas em fascículos, envolvidos por outra camada de tecido conjuntivo, denominada perimísio. O agrupamento dos fascículos forma o músculo, o qual apresenta-se também envolvido por tecido conjuntivo chamado epimísio (BERNE *et al.*, 2004). Cada fibra muscular contém centenas a milhares de miofibrilas. Cada miofibrila contém disposto, lado a lado, cerca de 1500 filamentos de miosina e 3000 de actina. Tais filamentos representam moléculas de proteínas contráteis (GUYTON e HALL, 1996). A miofibrila é subdividida longitudinalmente em sarcomêros. O mesmo é limitado entre duas linhas escuras, chamadas de linha Z, sendo a unidade contrátil propriamente dita do músculo estriado esquelético (BERNE *et al.*, 2004).

Tipos de Fibras Musculares

Os músculos esqueléticos são constituídos por populações mistas de fibras musculares brancas e/ou vermelhas (CLOSE, 1972). Apesar da variabilidade na composição das fibras musculares, a qualidade desta é fortemente influenciada pela predominância de um tipo específico de miofibrila associada ao seu tamanho e frequência (ASHMORE, 1974). As diferentes qualidades de fibras podem ser visualizadas através da utilização de ensaios histoquímicos, metabólicos, fisiológicos, bioquímicos e imunohistoquímicos que permitem a caracterização dos distintos tipos de fibras (MINAMOTO, 2005).

Com base em reações específicas, as fibras podem ser classificadas em três grupos principais, segundo a nomenclatura e as seguintes características: SO (fibras de contração lenta, oxidativa): possui um diâmetro pequeno, baixo nível de enzimas glicolíticas, moderado a elevado grau da capacidade aeróbia (PETER *et al.*, 1972), podendo também ser classificadas em fibras vermelhas, tipo I (BERNE *et al.*, 2004);

FOG (Fibras de contração rápida, oxidativa e glicolítica): diâmetro intermediário, atividade aeróbica moderada a alta, contendo elevada concentração de enzimas oxidativas (PETER *et al.*, 1972), podendo ser classificadas como fibras brancas, tipo II A (BERNE *et al.*, 2004); FG (contração rápida, glicolítica): diâmetro maior com alta concentração de glicogênio e baixa atividade enzimática oxidativa (PETER *et al.*, 1972), sendo nomeadas como fibras brancas, tipo II B (BERNE *et al.*, 2004).

A correlação entre a velocidade de contração muscular e a atividade ATPásica da miosina, reflete a expressão de diferentes isoformas de miosina nos dois tipos de fibras musculares. Na maioria das fibras rápidas, as atividades das enzimas glicolíticas são mais expressadas ao passo que as enzimas oxidativas são menos expressadas e como dependem do metabolismo glicolítico elas fadigam rapidamente. Porém as do tipo II A possuem tanto capacidade glicolítica quanto capacidade oxidativa elevadas. Em contraste, as fibras lentas, que satisfazem as suas demandas metabólicas através da fosforilação oxidativa, fadigam mais lentamente. As fibras tipo I contêm numerosas mitocôndrias e altos níveis de proteína mioglobina ligante de oxigênio e como a mioglobina é vermelha, também são chamadas de fibras vermelhas (BERNE *et al.*, 2004).

As funções da Musculatura Esquelética

Cerca de 40% do corpo humano é composta por musculatura esquelética, cuja massa e composição são necessárias para a correta regulação de respostas motoras, envolvendo: as atividades físicas diárias, manutenção e execução dos movimentos, fala e respiração. As alterações observadas em sua composição e função podem ser vistas em condições patológicas, geralmente resultando em atrofia muscular esquelética (ST-AMAND *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2006; PELIZZARI *et al.*, 2008). De acordo com GUYTON e HALL (1996) todos os músculos do corpo estão constantemente em processo de remodelagem, para se adequarem às funções impostas, podendo ocorrer alterações em seu comprimento e diâmetro. A função muscular esquelética depende de vários fatores, tais como: atividade proprioceptiva, inervação motora, carga mecânica e mobilidade das articulações (APPELL, 1990). Qualquer desequilíbrio entre o tecido muscular e esses fatores pode gerar a atrofia muscular (MATHEUS *et al.*, 2007), sendo esta

determinada, em 35% a 45%, de perda de tecido muscular após 7 dias de imobilização em estudos conduzidos com ratos (APPEL, 1986).

Atrofia Muscular Esquelética

Quando um músculo permanece inativo por um período prolongado, devido à imobilização, denervação ou microgravidade (ZHANG *et al.*, 2006; FAVIER *et al.*, 2008), é observada maior intensidade da degradação das proteínas contráteis frente à sua renovação, redução do número de miofibrilas, perda do volume celular (GUYTON e HALL, 1996), redução no número de mionúcleos e conseqüentemente, atrofia muscular (VOLTARELLI *et al.*, 2007). Esta é mais evidente em músculos posturais ou tônicos responsáveis em manter o corpo contra a gravidade (MINAMOTO, 2005), ou seja, anti-gravitacionais, extensores e uniarticulares, devido à maior composição em fibras lentas (APPELL, 1990), apresentando resposta trófica específica relacionada também ao tipo de músculo. Sendo assim o grau de atrofia da fibra é proporcional à porcentagem de fibras lentas num dado músculo (EDGERTON *et al.*, 2002).

A atrofia muscular esquelética é um fenômeno clínico comum e tem-se constituído, nos últimos anos, objeto de estudo. Está associada a diversas entidades nosológicas (VOLTARELLI *et al.*, 2007), como: insuficiência cardíaca (FERREIRA *et al.*, 2004); alterações neuromusculares (TEWS, 2002) acometendo 100% destes indivíduos (FERRAZ *et al.*, 2004); lesões músculo-esqueléticas, que requerem um período posterior de imobilização (WILLS *et al.*, 1982) e deficiência de selênio e a vitamina E (CAIOZZO, 1996).

De acordo com Allen *et al.* (1995), Smith *et al.* (2000), Barton e Morris (2003), Voltarelli *et al.* (2007), durante a atrofia muscular esquelética ocorre diminuição do número de mionúcleos, perdas estruturais do tecido muscular, como proteínas contráteis e aumento da fadigabilidade devido à diminuição do potencial metabólico das fibras individuais. Isto interfere na função motora e nas atividades cotidianas, pois a involução é rápida e drástica. A perda nuclear pode resultar em morte celular via apoptose (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1993); sendo este processo importante para a regressão de estruturas biológicas musculares (APPELL, 1990; O'LEARY e HOOD, 2008).

Apoptose

Apoptose é um processo de morte celular individual e ativa, cuja execução depende de energia, síntese e degradação protéicas (KERR e SEARLE, 1972; VASCONCELOS e LAM, 1995). Toda célula possui a maquinaria de apoptose e está pronta para engatilhar sua autodestruição a menos que seja sinalizada para não fazê-la (MALLAT e TEDGUI, 2000). Apoptose tem como função atuar em células que não possuem funções no organismo, quando há excesso de células (regulando o tamanho dos tecidos), exercendo um papel oposto ao da mitose (VASCONCELOS e LAM, 1995), em células que se desenvolvem de forma inadequada, em células que já desempenharam suas funções e naquelas que podem ser prejudiciais e devem ser eliminadas (ELLIS e HORVITZ, 1991).

Apoptose é caracterizada morfológicamente: (a) retração celular e perda de adesão com outras células, ou com a membrana basal (anoiquia); (b) zeiose ou formação de projeções digitiformes na membrana citoplasmática; (c) condensação do citoplasma com diminuição do teor hídrico e do volume celular; (d) condensação nuclear com compactação da cromatina em massas densas uniformes, alinhadas na face interna da carioteca (crescentes) (PEITSCH *et al.*, 1993); (e) convolução com posterior fragmentação da membrana nuclear (sem cariorrexe ou ruptura) e fragmentação celular com a formação dos corpos apoptóticos (KERR e SEARLE, 1972). Estes últimos são fagocitados pelas células circunjacentes (canibalismo celular) ou por fagócitos profissionais antes que ocorra a lise celular (Fig.1) (SAVILL *et al.*, 1993). Sem a ruptura de células, não há liberação de componentes celulares no espaço extracelular e não há indução de inflamação (SAVILL *et al.*, 1993; FADOK e HENSON, 1998). Possivelmente, a célula em apoptose protege a sua membrana contra o risco de lise por ativação de transglutaminases (FESUS *et al.*, 1987) que promovem ligações cruzadas de proteínas do citoesqueleto fortalecendo, assim, a sua membrana (BATISTA, 2007).

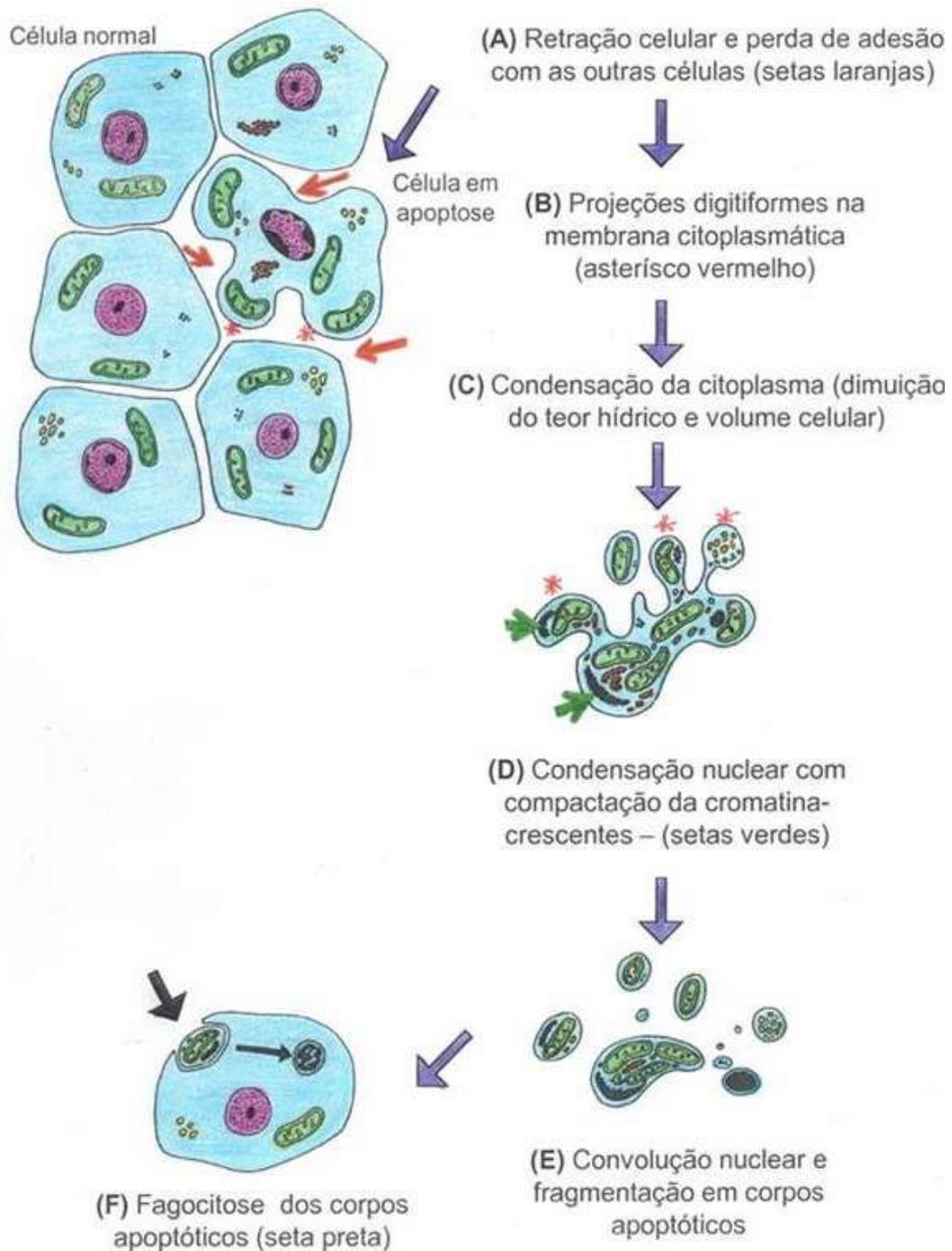


Fig 1: Diagrama ilustrando as características morfológicas observadas no processo de morte celular via apoptose. Adaptado de PEREIRA (2010).

A principal característica molecular do processo de apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA através de endonucleases dependentes de Ca^{+2} e Mg^{+2} . Esta clivagem internucleossômica resulta em fragmentos oligonucleossomais (WYLLIE *et al.*, 1980; COHEN e DUKE, 1992). A maioria das mudanças morfológicas observadas na apoptose é mediada por uma cascata enzimática envolvendo proteases de cisteína específicas de aspartato denominadas

caspases (THORNBERRY *et al.*, 1997) que são ativadas neste tipo de morte celular (COHEN, 1997). Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que apresentam resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. Elas são sintetizadas como precursores inativos que são clivados proteoliticamente para gerar subunidades ativas (THORNBERRY *et al.*, 1997). A ativação das caspases promove a desmontagem da membrana e arcabouço nuclear, a condensação da cromatina e a degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas (Fig.2).

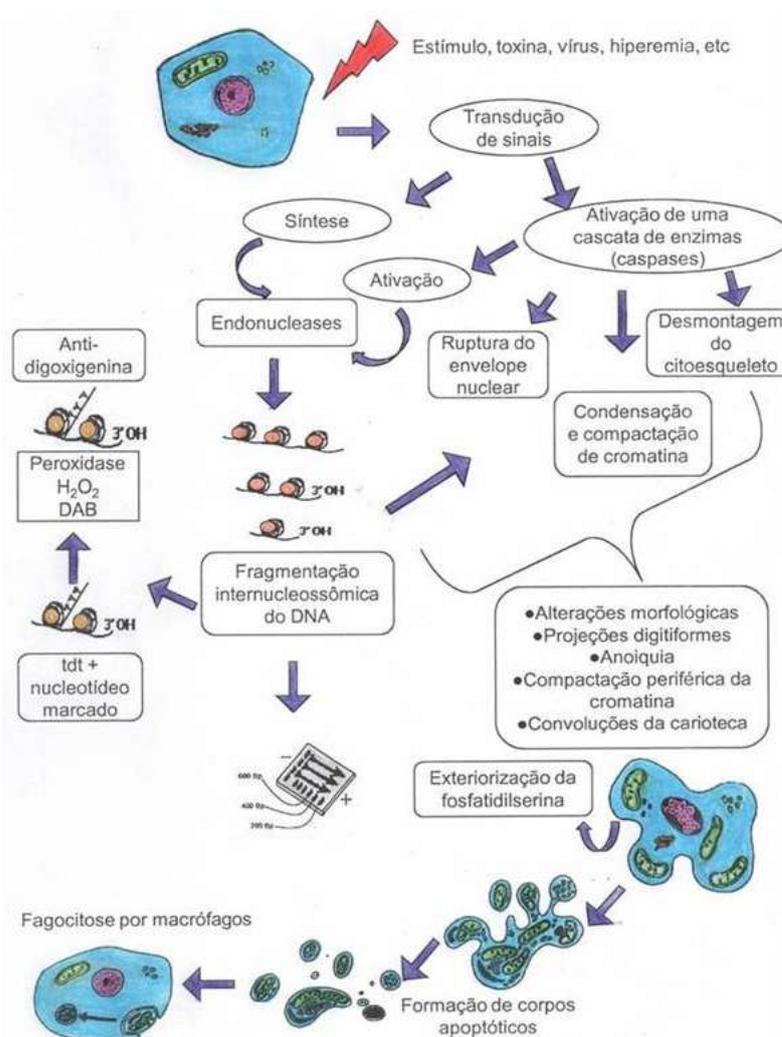


Fig. 2: Diagrama mostrando a sequência de eventos envolvidos no processo de morte celular via apoptose (PEREIRA, 2010).

Estas alterações são comuns nas células em apoptose, independentemente do agente indutor do processo. Isto significa que a ação das caspases representa a via final comum que normalmente opera em células programadas para morrer (THORNBERRY *et al.*, 1997). As caspases que participam do processo de apoptose

miofibrila regulada pelos genes de um mionúcleo específico). Neste processo não ocorre a destruição total da fibra, sendo a degradação de segmentos protéicos associados à atrofia muscular. A resposta mionuclear é específica do tipo de fibra muscular, sendo observada uma diminuição maior do número de mionúcleo em fibras que expressam isoformas de miosina tipo I em relação a tipo II (ALLEN *et al.*, 1996).

Autofagocitose ou autofagia

Segregação e degradação de constituintes citoplasmáticos - organelas, inclusões, áreas do citoplasma e mesmo núcleos (lesados ou indesejados) por vacúolos autofágicos, daí o termo autofagocitose ou autofagia. Em outras palavras a própria célula recicla seus constituintes sem que haja morte celular. Os vacúolos autofágicos posteriormente se fundem com lisossomos formando fagolisossomos, que irão fazer a digestão e reciclagem do material autofagocitado (HARR e DISTELHORST, 2010). No caso da atrofia muscular, se a perda de massa muscular não é associada com a perda de células (se não há diminuição quantitativa), filamentos de actina e miosina, mitocôndrias e mesmo núcleos são reciclados por autofagocitose (ZHAO *et al.*, 2008; TOLKOVSKY, 2010; TENG *et al.*, 2011; IIDA *et al.*, 2011). Nos músculos em atrofia a via ubiquitina-proteassoma catalisa a degradação das proteínas miofibrilares, ainda que a importância dessa via tenha recebido pouca atenção (ZHAO *et al.*, 2008).

Imobilização com atadura gessada como modelo indutor de atrofia muscular esquelética

A atrofia muscular associada à imobilização aparece de maneira rápida e reversível (HADDAD *et al.*, 2003). A partir de quatro a seis dias de imobilização já ocorrem perdas estruturais no tecido muscular (BOOTH, 1977), promovendo a atrofia (APPEL *et al.*, 1986; WILLIAMS *et al.* 1988; VAZEILLE, *et al.*, 2008). A imobilização tem um grande efeito na função muscular, podendo causar perdas contínuas de cálcio dos ossos aumentando a vulnerabilidade às lesões musculares e ósseas (FITTS *et al.*, 2001), bem como osteoporose, anquilose e fibrose (CHIKWENDU e JEEVENDRA, 1999). A posição da imobilização influencia

significativamente o grau total de atrofia muscular esquelética. Na posição encurtada ocorre um rápido aumento do grau de atrofia (SMITH *et al.*, 2000; JOKL e KONSTADT, 1983; KIM *et al.*, 2007; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1984), em relação à posição alongada e neutra (JOKL e KONSTADT, 1983), caracterizada pelo aumento do número de sarcômeros em série e atrofia moderada ou ausente (VOLPI *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Adaptar o modelo de indução da atrofia muscular em gato proposto por Jokl e Konstadt (1983) ao rato Wistar macho, a fim de estudar as alterações da morfologia muscular, das fibras nervosas e placas motoras e a autofagocitose de núcleos na atrofia muscular esquelética. Empregou-se a imobilização do membro pélvico na posição encurtada, em 15, 30 e 45 dias de imobilização.

Objetivos Específicos

Mensurar os pesos: corporal e dos músculos sóleo e gastrocnêmio em diversos momentos da atrofia muscular.

Quantificar morfometricamente a composição muscular na atrofia: o número médio de miócitos e de núcleos por área, a área média de secção transversa das fibras, o diâmetro médio e o perímetro das fibras musculares, a área relativa do tecido conjuntivo intercelular e fascicular, e a relação entre os tipos I e II de fibras musculares.

Comparar os resultados obtidos para os parâmetros descritos nos itens anteriores, a partir dos membros imobilizados na posição encurtada nos distintos tempos de imobilização, com os resultados obtidos dos controles.

Comparar os resultados obtidos para os parâmetros nos imobilizados entre os distintos tempos de imobilização.

Identificar morfologica e qualitativamente fibras nervosas e placas motoras em diversos momentos da atrofia muscular.

Identificar morfologica e qualitativamente a expressão da caspase 3 e a autofagocitose de núcleos em diversos momentos da atrofia muscular por técnica imunohistoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Distribuição dos grupos e delineamento experimental

Foram utilizados 30 ratos Wistar, adultos jovens (17 semanas), machos, com peso inicial de aproximadamente 350 a 400 gramas cada, para imobilização do membro pélvico. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação da UFMG e mantidos confinados em gaiolas plásticas, no biotério do Departamento de Morfologia, com temperatura ambiente controlada (22°C) e iluminação artificial, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro (7:00 às 19:00 hs.) e 12 horas escuro (19:00 às 7:00 hs), com alimentação e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG) sob o número 251/08 (Anexo 1).

Os animais foram divididos em 6 grupos, sendo 3 grupos imobilizados (6 ratos por grupo: I, músculo imobilizado por 15 dias; II, 30 dias e III, 45 dias) e 3 grupos controles (4 ratos por grupo: IV, controle de 15 dias; V, 30 dias e VI, 45 dias). Imobilizaram-se os membros pélvicos direitos na articulação do joelho (femorotibiopatelar) e tornozelo (tibiotalársica), através de atadura gessada (Fig. 4). Os ratos foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50-75mg/ kg) via intraperitoneal para proceder-se a imobilização (ST-AMAND *et al.*, 2001); durante o procedimento foi administrada a dose mínima, sendo aumentada quando necessário. A dosagem anestesiou os animais por aproximadamente duas horas seguindo o protocolo sugerido por Vialle *et al.* (1999) e Filho *et al.* (2003). Os membros foram imobilizados na posição de flexão de joelho e extensão de tornozelo e as articulações foram colocadas no ângulo máximo resultando na posição encurtada para os músculos gastrocnêmios e sóleos (JOKL e KONSTADT, 1983). Em etapa final colocou-se um colar elizabetano adaptado para o rato, confeccionado de material radiográfico, para impedir danos na técnica de imobilização do membro (Fig. 4 A).

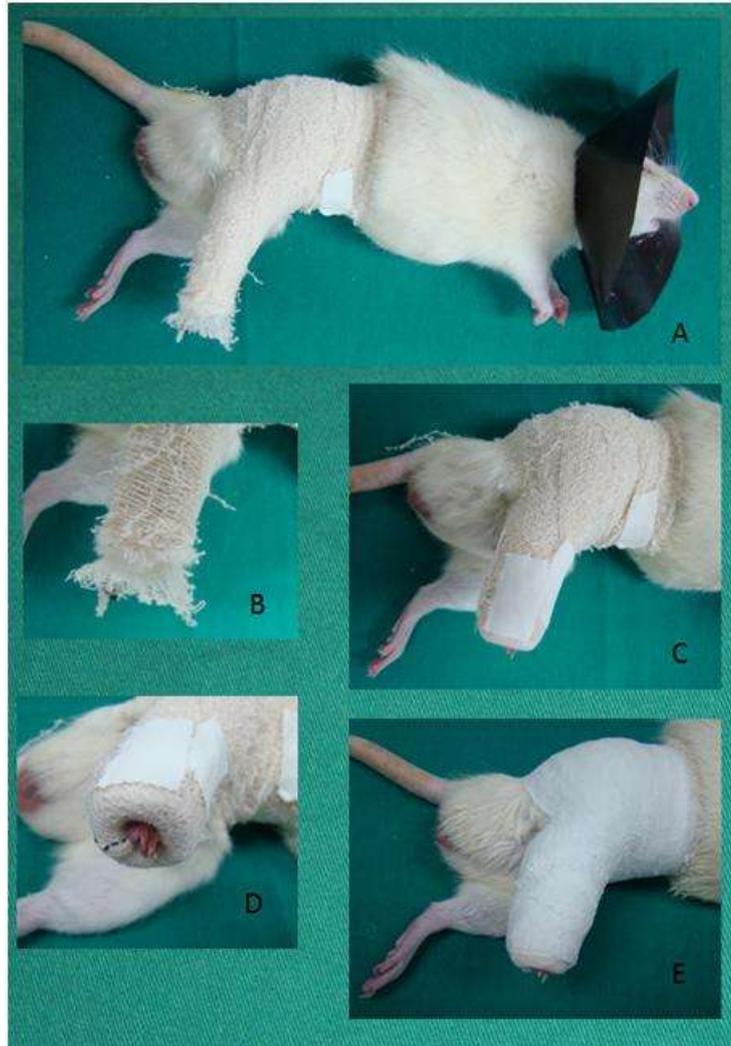


Fig. 4 - Rato anestesiado em decúbito lateral esquerdo com o membro pélvico direito imobilizado: A- Animal em decúbito lateral antes de imobilização concluída, já com o colar elizabetano; B- Observar as três camadas da imobilização: malha tubular mais interna, algodão ortopédico na camada média e atadura de crepom na camada mais externa; C- Notar o arremate da extremidade da imobilização e a robusta fixação abdominal; D - Extremidade distal do membro imobilizado com coloração normal, E - Conclusão da imobilização envolvendo a camada externa com atadura gessada. Vide artigo da técnica de imobilização (Anexo 2).

Os grupos foram formados por distribuição aleatória e o ensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado. Os animais eram vistoriados diariamente, duas vezes por dia. Quando a imobilização era danificada pelo próprio animal, novo procedimento de sedação e imobilização foi conduzido. Após os dias referidos de imobilização (15, 30 e 45 dias), os seis animais de cada grupo imobilizado, assim como os quatro animais de cada grupo controle foram eutanasiados através da inalação por CO₂ na câmara de CO₂. Em seguida, procedeu-se a retirada dos músculos sóleos e gastrocnêmios direitos (Fig. 5) os quais foram dissecados e

pesados. Amostras dos músculos eram retiradas para serem submetidas técnicas histológicas e moleculares.

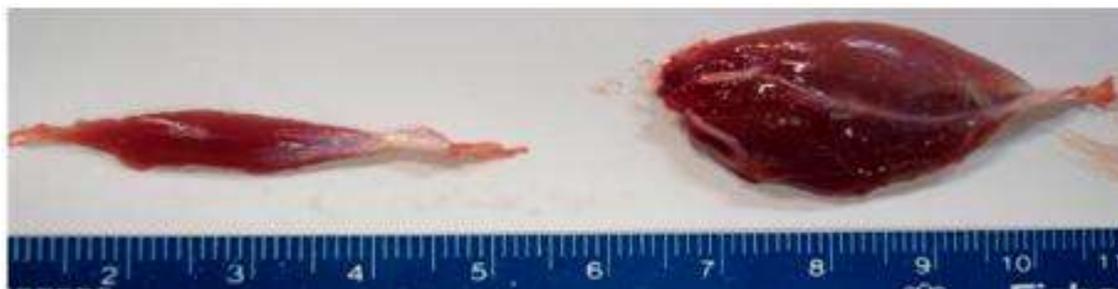


Fig. 5 - Músculo sóleo e gastrocnêmio respectivamente dispostos longitudinalmente.

Pesagem corporal e dos músculos sóleo e gastrocnêmio

Os animais foram pesados antes do início do experimento e após a eutanásia (final do experimento). Para a pesagem corporal foi utilizado balança digital (Marte, modelo AL500, São Paulo) com precisão de 0,0001g.

Após o processo de pesagem corporal dos animais e análise dos valores, os membros pélvicos direitos foram dissecados, e os músculos gastrocnêmio e sóleo foram retirados e pesados na mesma balança.

Coleta do Material

Logo após o sacrifício e retirada dos músculos, fragmentos do sóleo e gastrocnêmio imobilizados e controles foram obtidos a partir de secção transversal na região do ventre muscular e processados para posterior análise morfométrica. Os fragmentos fixados em formol tamponado a 10% foram submetidos à avaliação histológica, imunohistoquímica e morfométrica. Outros foram crioprottegidos com sacarose e armazenados em freezer a -20° C para posterior obtenção de criocortes e realização de técnicas histoquímicas para determinação de diferentes ATPases miofibrilares.

Processamento histológico para emblocamento em parafina

Os fragmentos fixados em formol tamponado a 10% foram processados segundo técnica de rotina para inclusão em parafina (LUNA, 1968). Cortes de 5 µm foram corados: em Hematoxilina - Eosina (HE) para avaliação histológica do tecido muscular; em Picrosirius Red (PSR) para avaliação histológica do tecido conjuntivo, e em Gleees - Marsland, para evidênciação histológica da fibra nervosa e placa motora (LUNA, 1968; MARSLAND, 1954).

Morfometria

Imagens digitais obtidas em microscópio óptico (Olympus BX 41), com objetiva de 10x e projetiva 3,3 acoplado a uma câmara digital (JVC/ TK- 1270 *Color Video Camera; Germany*) e captador de imagens ("*frame grabber*") MiroMOVIE PRO; *Germany*) no laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia do ICB-UFMG. Para quantificação de todas das variáveis selecionadas utilizou-se o programa *Media Cybernetics Image Pro-Plus*, versão 4.0. A metodologia empregada para a segmentação das imagens, definição das condições morfométricas e obtenção das medidas foram descritas por Caliari (1997).

Para a avaliação da atrofia muscular e quantificação da área, diâmetro médio e perímetro das fibras musculares, utilizaram-se imagens capturadas de lâminas coradas em HE com objetiva de 10x. Preconizou-se 100 células por animal (BRITO *et al.*, 2006).

Para a quantificação das células musculares (miócitos), utilizaram-se imagens capturadas das lâminas coradas em HE, com objetiva de 10x. O número mínimo representativo de campos foi obtido conforme Moro *et al.* (2004). O número de campos microscópicos foi considerado representativo quando o aumento no tamanho amostral não resultou em diminuição significativa no valor do coeficiente de variação. Usando essa abordagem, 14 campos microscópicos por lâmina foram utilizados para quantificar a celularidade dos músculos. As células foram quantificadas em termos de número de células e número de células alteradas por campo analisado. Para as células alteradas caracterizou-se a presença de: contorno irregular, citoplasma menos acidofílico e apresentando fendas.

Para a quantificação dos núcleos e núcleos condensados por campo analisado das células musculares, utilizaram-se imagens capturadas das lâminas coradas em HE, com objetiva de 40x. A condensação nuclear (intensa basofilia) foi considerada indício de apoptose ou autofagocitose mionuclear. Utilizamos 40 campos por animal (SAMPAIO, 2002).

Para a quantificação do tecido conjuntivo intercelular e interfascicular muscular, utilizaram-se imagens capturadas de lâminas coradas em PSR, com objetiva de 10x. Utilizamos 10 campos por animal (PORTO, 2006). A quantificação se deu das seguintes maneiras:

Área relativa do tecido conjuntivo = $(\Sigma \text{ da área do tecido conjuntivo} / \Sigma \text{ da área do músculo} + \Sigma \text{ da área do tecido conjuntivo}) \times 100$ (CALIARI, 1997).

Análise qualitativa das fibras nervosas e placas motoras

As imagens capturadas das lâminas coradas pela técnica de Glees-Marsland com objetiva de 40x foram avaliadas qualitativamente para analisar a morfologia das fibras e placas motoras nos distintos tempos de imobilização estudados (ENDO *et al.*, 2008).

Processamento Imunohistoquímico para detecção de Caspase 3

As amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% e lavadas 3 vezes com Tris Acido Bórico Salina (TBS). As lâminas com os cortes foram encubadas em estufa a 37 °C por 30 min; desparafinadas em xilol (15min por 2 vezes) e hidratadas em álcool absoluto (5min), álcool 90% (5min), álcool 70% (5min) e água destilada (5min).

Em seguida, os cortes foram imersos em metanol/H₂O₂ (3%) por 10 minutos à temperatura ambiente (37 °C). Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato, solução de ácido cítrico em ciclos alternados de aquecimento em forno de microondas. Sítios inespecíficos foram bloqueados utilizando Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA) e 0,1% de Tween 20 por 10 minutos à temperatura ambiente (37 °C). Após este procedimento, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 100 µl do anticorpo primário (Caspase 3) por 1 hora à temperatura ambiente (37 °C). A seguir, as amostras foram lavadas em

tampão de lavagem PBS contendo 0,1% de Tween 20 e posteriormente cobertas com 100 µl do anticorpo secundário (1 µl/ml) e incubadas à 37°C, em câmara úmida, por 30 minutos. Os cortes foram enxaguados em tampão TBS e incubados em câmara úmida, à temperatura ambiente (37 °C), com 100 µl de Streptavidin-Peroxidase (POD) (0,5 U/ml) por 30 minutos. Em seguida, a revelação foi efetuada com solução de 100µl diaminobenzidina a 3% em PBS à temperatura ambiente (37 °C) por 40 minutos e contracorados com dois banhos rápidos em Hematoxilina, a temperatura ambiente. Após desidratação em Etanol absoluto e imersão em Xilol, as lâminas foram montadas com Ethelan e posteriormente examinadas em microscópio de luz.

As imagens capturadas das lâminas, com objetiva de 40x, foram triadas qualitativamente para positividade da reação acima descrita.

Processamento para determinação ATPásica e quantificação dos tipos de fibras musculares

Fragmentos previamente crioprotetidos em banhos de solução de sacarose a 5%, 10% e 20% (1 hora cada) foram incluídos em *Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature* (OCT) e mantidos em “freezer” a -20°C antes da realização dos criocortes. Secções com 8µm obtidas em criostato (Microm HM 505N, Ontario, Canada) a -28°C e colhidos em lâminas histológicas silanizadas foram submetidas ao método histoquímico para marcação de ATPase miofibrilar (m-ATPase) em pH 9.4 (ROUND *et al.*, 1980), necessária para diferenciar os tipos de fibras musculares esqueléticas. Foram identificadas as fibras tipo FG e FOG, reveladas fortemente, após pré-incubação alcalina (pH 9,4), e SO, revelada negativamente após pré incubação alcalina (pH 9,4), conforme os critérios adotados por PETER *et al.* (1972).

As imagens capturadas das lâminas coradas pela técnica m-ATPase, com objetiva de 10x, foram submetidas à morfometria computadorizada para quantificar o número absoluto dos diferentes tipos celulares (tipo I e tipo II). Foram utilizadas 200 células consecutivas por animal (SAAD *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2004).

Análise estatística

O presente estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Para testar a distribuição Gaussiana dos dados foi utilizado o teste de Lilliefors e a homocedasticidade, o teste de Bartlett. Empregou-se análise de variância (ANOVA) e SNK (Newmann-Keuls) para comparação das médias dos vários grupos com um nível de 5 % de significância (SAMPAIO, 2002).

RESULTADOS

A técnica de imobilização com atadura gessada adaptada para ratos foi eficiente para manter o membro na posição desejada durante todos os tempos estudados, mesmo aos 45 dias quando a atrofia já era avançada e havia grande perda na massa muscular.

Peso Corporal e Peso muscular

A Imobilização do membro pélvico direito durante os três tempos propostos neste estudo mostrou redução significativa no peso corporal final nos grupos imobilizados quando comparados com seus respectivos controles ($p < 0,001$). O peso corporal final nos grupos imobilizados também caiu progressivamente nos três tempos, sendo mais acentuada no tempo final de 45 dias ($p < 0,05$) (Tab. 1).

A imobilização do membro pélvico direito nos três intervalos de tempos (15, 30 e 45 dias) gerou uma atrofia muscular esquelética significativa em relação aos respectivos controles em ambos os músculos ($p < 0,05$). No sóleo a perda de massa foi 40% aos 15 e 30 dias e 69% aos 45 dias. No gastrocnêmio foi de 23,8 % aos 15 dias, 47,1% aos 30 e 68,7% aos 45 dias. No entanto dentro dos grupos imobilizados, o peso muscular diminuiu significativa e progressivamente apenas no músculo gastrocnêmio, detectável no tempo de 15 dias de imobilização e mais intenso aos 45 dias ($p < 0,001$). A perda de massa muscular final do gastrocnêmio imobilizado foi de 48% e do sóleo de 25% (Tab. 1).

Tab. 1. Médias e desvios padrões do peso corporal e peso muscular, dos músculos sóleo e gastrocnêmio, dos grupos controles e imobilizados, avaliados nos tempos de 15, 30 e 45 dias.

Grupos	Peso corporal (g)		Peso (g)	Peso (g)
	Inicial	Final	Sóleo	Gastrocnêmio
Controle 15 dias	386±31	396 ± 31	0,20 ± 0,01 [#]	2,48 ± 0,092 [#]
Imobilizado 15 dias	456±45*	360 ± 40 ^A	0,12 ± 0,02 ^A	1,89 ± 0,26 ^A
Controle 30 dias	420±46	444 ± 46*	0,20 ± 0,01 [#]	2,63 ± 0,29 [#]
Imobilizado 30 dias	440±53*	329 ± 44 ^B	0,12 ± 0,04 ^A	1,39 ± 0,27 ^B
Controle 45 dias	460±39	460 ± 43*	0,29 ± 0,04 [#]	3,16 ± 0,06 [#]
Imobilizado 45 dias	406±34*	265 ± 51 ^C	0,09 ± 0,05 ^A	0,99 ± 0,31 ^C

Nota: *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre peso corporal inicial e peso corporal final, para cada período de estudo, dentro na mesma linha; peso corporal final entre grupos controles e imobilizados, dentro da mesma coluna, para o período de 30 e 45 dias. P<0,05

#Valores estatisticamente significativos nas comparações entre peso muscular, dentro da mesma coluna entre controle e imobilizado, para cada período de estudo nos músculos sóleo e gastrocnêmio. P<0,05

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas nas comparações entre grupos imobilizados para cada período de estudo, dentro da mesma coluna. p<0,05

Descrição Histológica e Histopatológica

Histologicamente os músculos sóleo (Fig. 6A) e gastrocnêmio (Fig. 7A) no grupo controle mostravam fibras seccionadas transversalmente de contorno arredondados, volumosas, com coloração acidofílica intensa e boa preservação da estrutura. Já nos grupos imobilizados, os músculos sóleo (Fig. 6B, C e D) e gastrocnêmio (Fig. 7B, C e D) apresentavam contornos irregulares, com área de secção transversal visivelmente diminuída, coloração menos acidófila e células poliédricas, além de fragmentação com fendas citoplasmáticas evidentes (Fig. 6D).

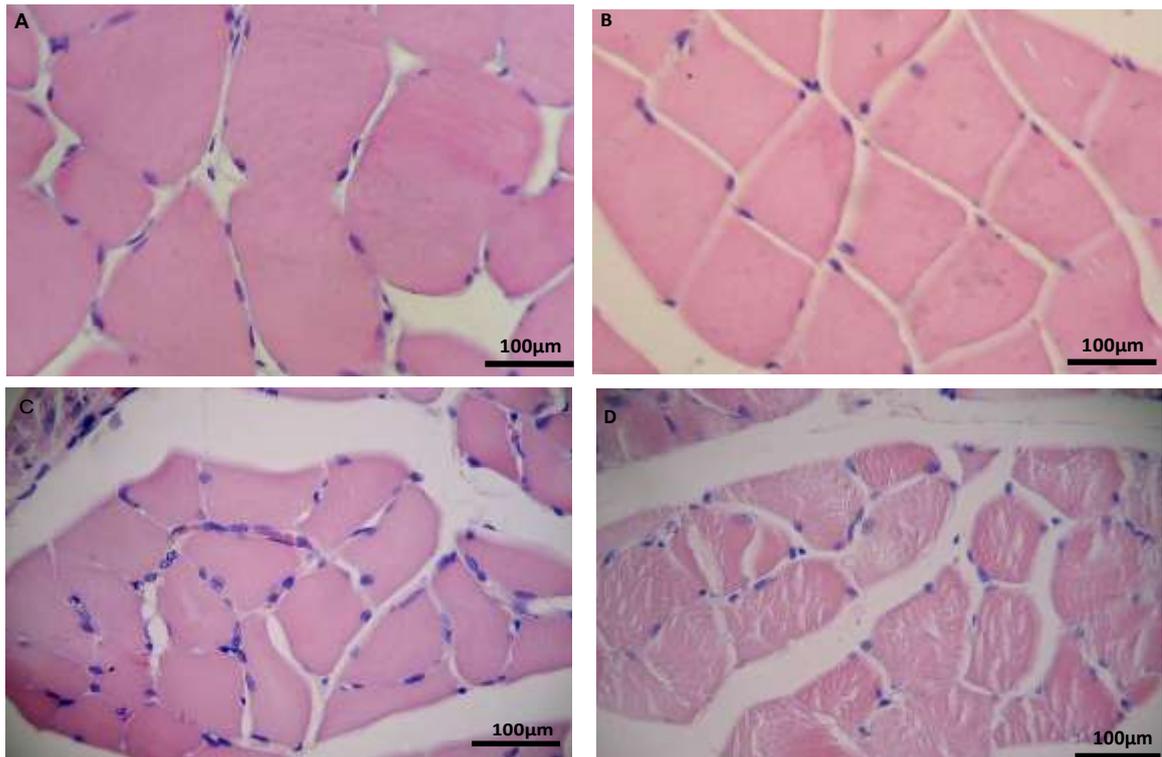


Fig. 6 - Fotomicrografias do músculo sóleo corado em HE: (A). Controle, sem lesões aparentes; (B, C e D) Grupos imobilizados aos 15, 30 e 45 dias, respectivamente, mostrando diminuição da área e de contorno transversal das fibras e redução da acidofilia e presença de células poliédricas.

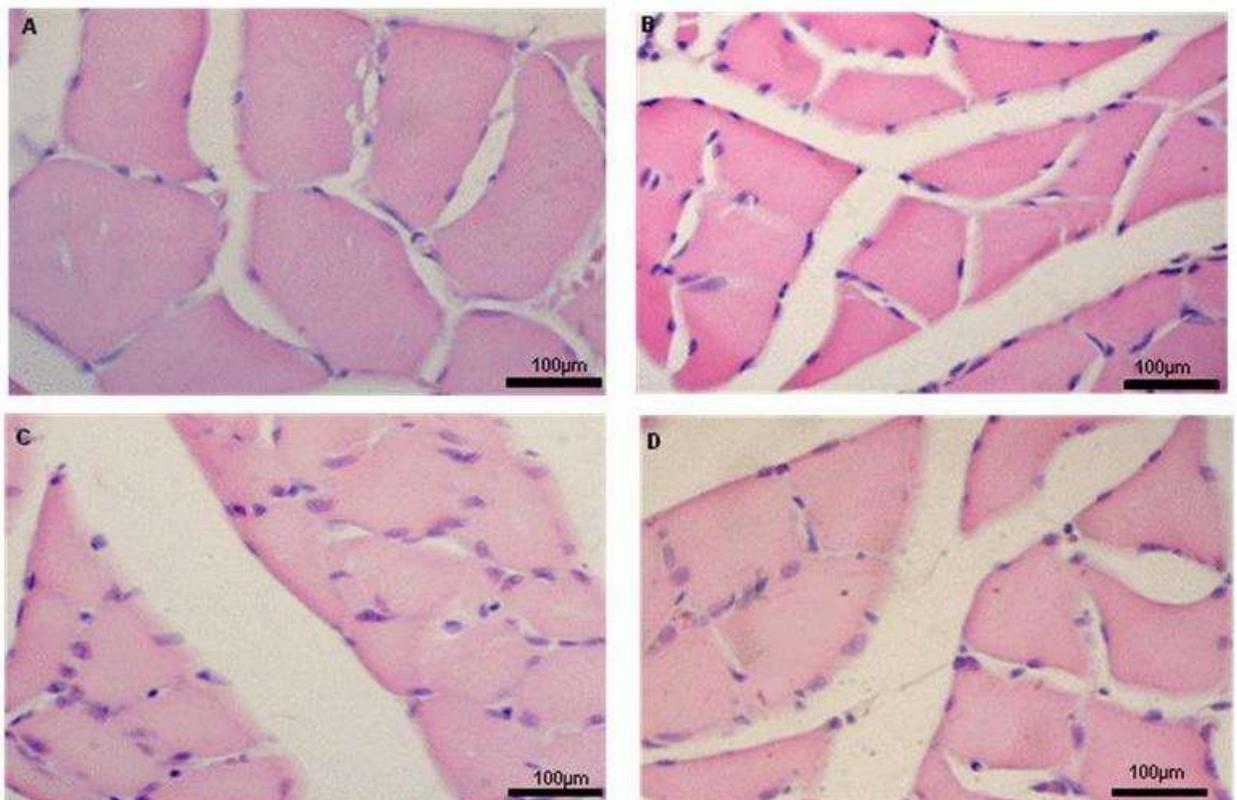


Fig. 7 - Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio corado em HE: (A). Controle, sem lesões aparentes; (B, C e D) Grupos imobilizados aos 15, 30 e 45 dias,

respectivamente, mostrando diminuição da área e de contorno transversal das fibras, redução da acidofilia e presença de células poliédricas.

Área, Diâmetro Médio e Perímetro

Morfometricamente houve diminuição significativa da área média da secção transversal das fibras (Fig. 8) em ambos os músculos estudados, evidentes aos 15 dias de imobilização e mais pronunciados aos 45 dias ($p < 0,01$) em relação aos seus respectivos controles. Entre os animais do grupo imobilizado, a área média da secção transversa diminuiu significativamente apenas no músculo gastrocnêmio aos 45 dias ($15 \sim 30 > 45, 15 > 45, p < 0,01$). Nos imobilizados a diminuição da área média da secção transversa foi de 8% no músculo sóleo e 30% no músculo gastrocnêmio aos 45 dias (Tab. 2).

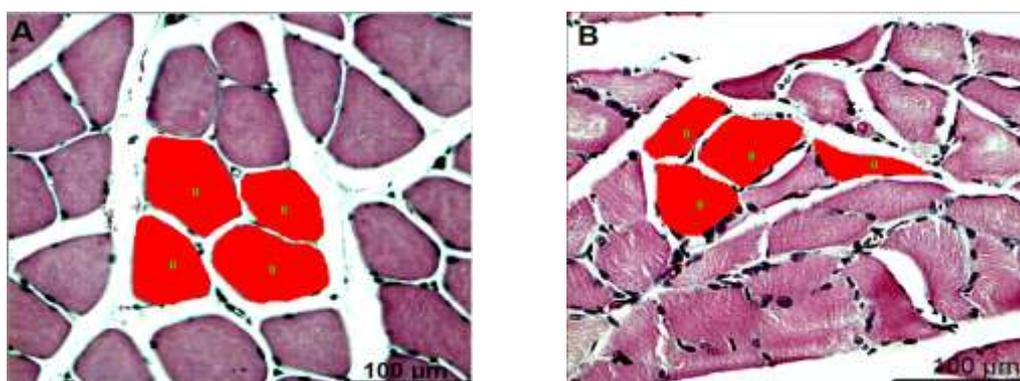


Fig. 8.- Morfometria de imagem digitalizada do músculo sóleo, para análise da área, diâmetro médio e perímetro celular entre grupos controle (A) e imobilizado (B) no tempo de 15 dias. HE.

No diâmetro médio e perímetro, a imobilização gerou uma redução significativa no músculo sóleo e gastrocnêmio em todos os tempos quando comparados com seus respectivos controles. Nos músculos sóleos imobilizados houve uma redução significativa mais intensa aos 30 dias, ainda que não tenha havido diferença com os valores intermediários obtidos para 45 dias ($15 > 30 \sim 45$ e $15 \sim 45, p < 0,04$) Nos sóleos imobilizados a redução do diâmetro médio e perímetro foram de 9,14% e 12,15% no pico de 30 dias, respectivamente. No entanto, a diminuição significativa do gastrocnêmio imobilizado foi mais intensa aos 45 dias ainda que não tenha havido diferença com os valores obtidos para 30 dias ($15 \geq 30 \geq 45$ e $15 > 45, p < 0,01$). Nos gastrocnêmios imobilizados a redução do

diâmetro médio e perímetro foram de 17,29% e 17,54% aos 45 dias, respectivamente (Tab. 2).

Tab 2. Médias e desvios padrões da área (A), diâmetro médio (D. Me) e perímetro (P) dos músculos sóleo e gastrocnêmio, dos grupos controles e imobilizados, avaliados nos três tempos (15, 30 e 45 dias).

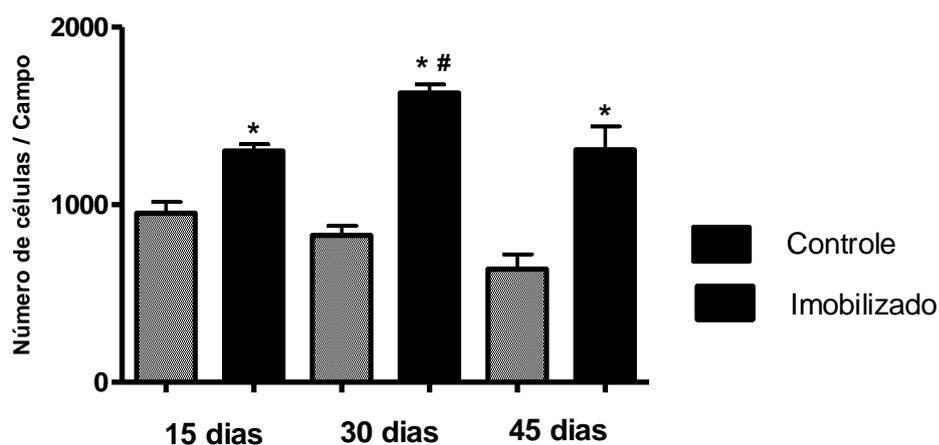
Sóleo	A	D. Me	P
Grupos (dias)	(μm^2)	(μm^2)	(μm^2)
Controle 15	237796 \pm 42333*	5467 \pm 521*	19590 \pm 1687*
Imobilizado 15	148423 \pm 19019 ^A	4265 \pm 264 ^A	15843 \pm 956 ^A
Controle 30	238950 \pm 46970*	5473 \pm 557*	19764 \pm 1988*
Imobilizado 30	124081 \pm 21427 ^A	3875 \pm 315 ^B	13918 \pm 1316 ^B
Controle 45	271191 \pm 106735*	5804 \pm 1199*	21236 \pm 4331*
Imobilizado 45	136644 \pm 31201 ^A	4060 \pm 523 ^{AB}	14848 \pm 2078 ^{AB}
Gastrocnêmio	A	D. Me	P
Grupos (dias)	(μm^2)	(μm^2)	(μm^2)
Controle 15	320321 \pm 90411*	6230 \pm 876*	22146 \pm 3239*
Imobilizado 15	152805 \pm 15322 ^A	4331 \pm 230 ^A	15814 \pm 910 ^A
Controle 30	315019 \pm 60370*	6143 \pm 496*	21679 \pm 1774*
Imobilizado 30	142473 \pm 36999 ^A	4126 \pm 528 ^{AB}	14787 \pm 1903 ^{AB}
Controle 45	247311 \pm 58297*	5496 \pm 699*	19393 \pm 2173*
Imobilizado 45	106462 \pm 32597 ^B	3582 \pm 564 ^B	13040 \pm 2056 ^B

Nota: * Valores estatisticamente significativos nas comparações entre dimensões celulares entre grupos controles e imobilizados, para cada período de estudo, dentro na mesma coluna. $p < 0,05$

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas nas comparações entre grupos imobilizados para cada período de estudo, dentro da mesma coluna. $p < 0,05$. A: área, D. Me: Diâmetro médio e P: Perímetro.

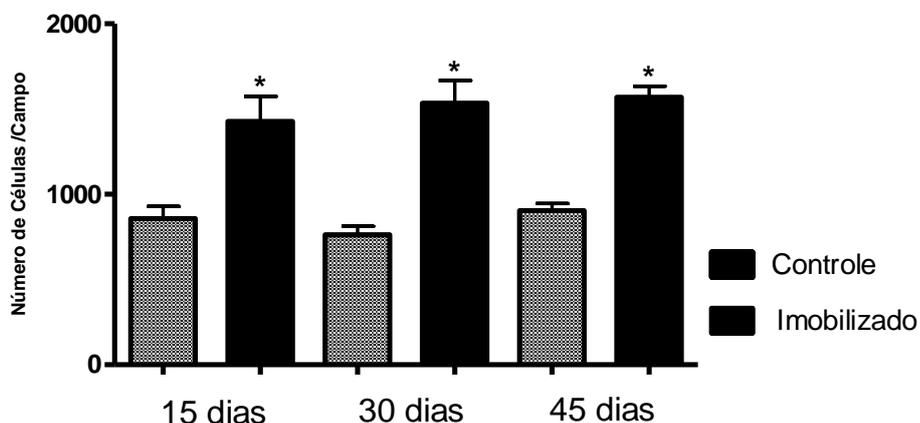
Células do Tecido Muscular Esquelético (Miócitos)

As células musculares do músculo sóleo no grupo imobilizado nos três tempos estudados (15, 30 e 45) aumentaram significativamente por campo analisado em comparação com os controles. Nos grupos imobilizados o aumento significativo ocorreu aos 30 dias e posteriormente diminuíram-se significativamente aos 45 dias ($p < 0,04$) (Graf. 1).



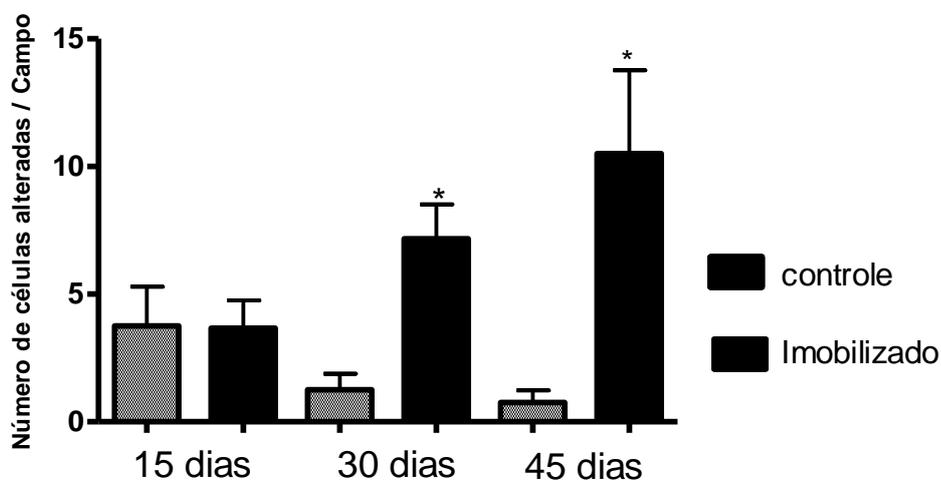
Graf. 1 – Médias e desvios padrões do número celular por campo analisado do músculo sóleo dos grupos controle e imobilizado nos três intervalos de tempo estudado. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. # Valor estatisticamente significativo nas comparações para o grupo imobilizado, entre os períodos de estudo ($P < 0,05$).

Já no músculo gastrocnêmio houve um aumento significativo do número de células por campo analisado do grupo imobilizado com relação aos seus controles nos três tempos estudados (15, 30 e 45). Nos grupos imobilizados não se detectou aumento significativos nos diferentes tempos estudados (Graf. 2).



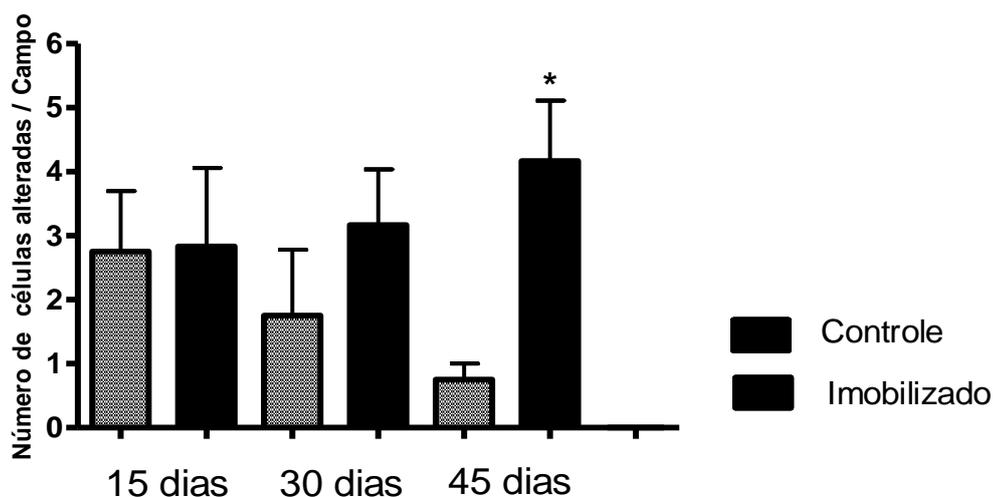
Graf. 2 - Média e desvio padrão do número celular por campo analisado do músculo gastrocnêmio dos grupos controle e imobilizado nos três intervalos de tempo estudado. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. ($P < 0,05$).

O número de células com morfologia alterada (contorno irregular, menos acidófila e fendas no citoplasma) no sóleo apresentou um aumento significativo por campo analisado aos 30 dias de imobilização quando comparados com seus controles, acentuando-se aos 45 dias ($p < 0,04$) (Graf. 3).



Graf. 3 - Médias e desvios padrões do número de células alteradas por campo analisado do músculo sóleo, nos grupos controle e imobilizado em três intervalos de tempo. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. ($P < 0,05$).

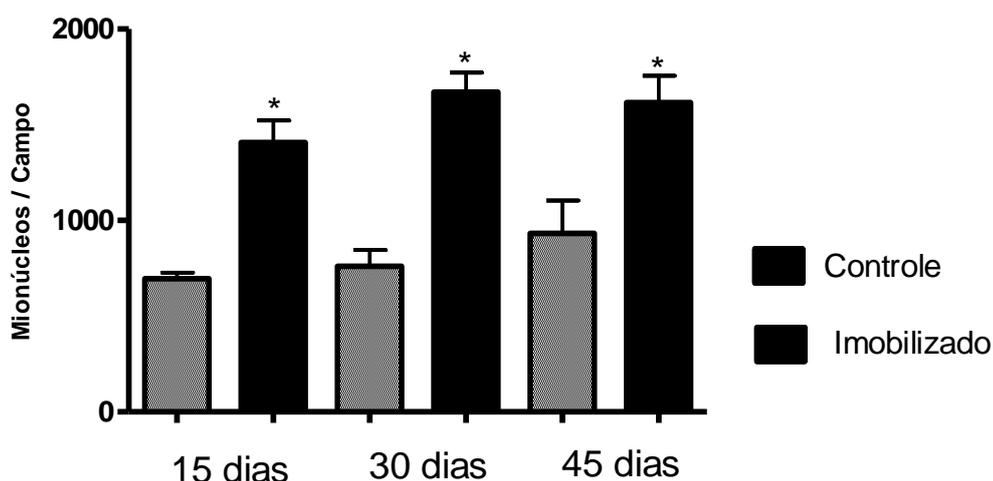
No músculo gastrocnêmio houve apenas aumento significativo de células alteradas por campo analisado no tempo de 45 dias imobilizado com seu controle (Graf.4).



Graf. 4 - Médias e desvios padrões do número de células alteradas por campo analisado do músculo gastrocnêmio, dos grupos controle e imobilizado nos três intervalos de tempo estudado. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. ($P < 0,05$).

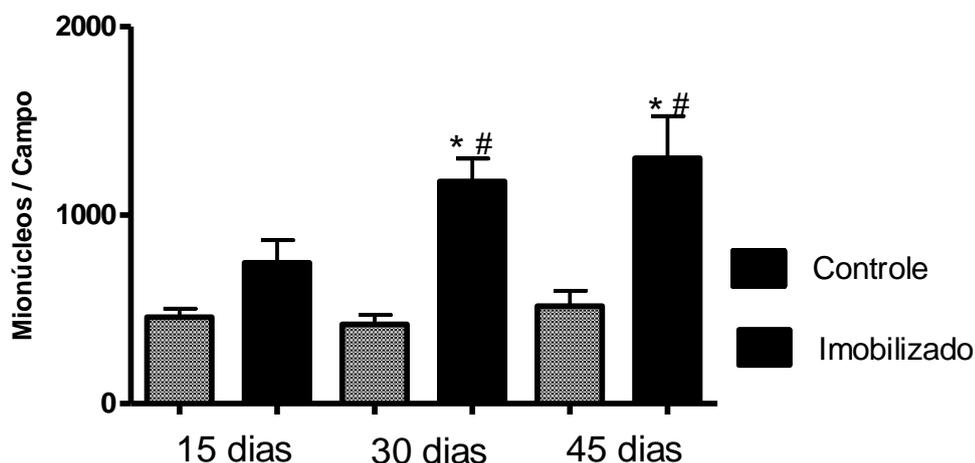
Núcleos do Tecido Muscular Esquelético (Mionúcleos)

Os mionúcleos por campo analisado do músculo sóleo aumentaram quando comparados os grupos imobilizados com os controles nos três tempos. ($p < 0,05$) (Graf. 5).



Graf. 5 - Médias e desvios padrões dos mionúcleos por campo analisado, do músculo sóleo, dos grupos controle e imobilizado nos três intervalos de tempo estudado. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. ($P < 0,05$).

Já o músculo gastrocnêmio apresentou um aumento significativo dos mionúcleos por campo analisado nos grupos imobilizados em relação aos controles aos 30 e 45 dias ($p < 0,02$). Quando analisado entre grupos imobilizados, o número dos mionúcleos por campo no tempo de 15 dias foi menor que aos tempos de 30 e 45 dias ($P < 0,03$) (Graf. 6).

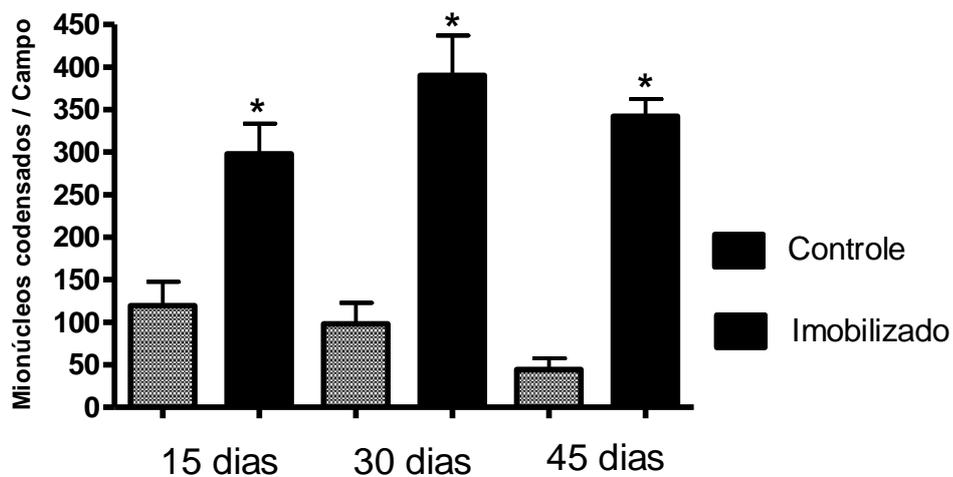


Graf. 6 - Médias e desvios padrões dos mionúcleos por campo analisado, do músculo gastrocnêmio, dos grupos controle e imobilizado nos três intervalos de tempo estudado. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. ($P < 0,05$). #Valores estatisticamente significativos nas comparações entre intervalos de tempo dentro do grupo imobilizado. ($P < 0,05$).

Os mionúcleos condensados do músculo sóleo (Fig. 9), com intensa basofilia, aumentaram significativamente nos grupos imobilizados em relação aos controles nos três tempos (Graf. 7).

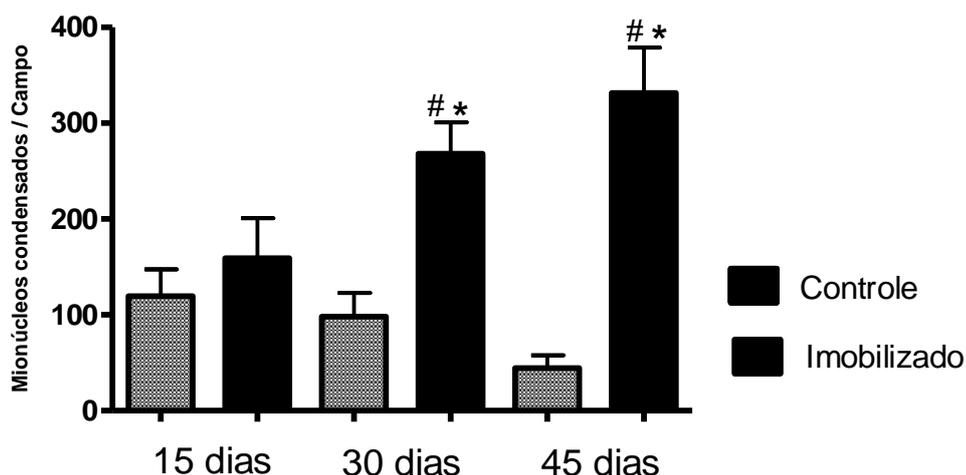


Fig. 9- Imagem digitalizada das células musculares do sóleo imobilizado de 15 dias. Mionúcleos condensados (setas pretas) e não condensados (setas vermelhas). HE.



Graf. 7 - Médias e desvios padrões dos mionúcleos condensados por campo analisado do músculo sóleo, dos grupos controle e imobilizado nos três intervalos de tempo. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. ($P < 0,05$).

No músculo gastrocnêmio houve um aumento significativo dos mionúcleos condensados por campo analisado aos 30 e 45 dias de imobilizado em relação aos controles ($p < 0,001$). Quando analisado entre grupos imobilizados, o número dos mionúcleos condensados por campo no tempo 15 dias foi menor que aos tempos de 30 e 45 dias ($p < 0,01$) (Graf. 8).



Graf. 8 - Médias e desvios padrões dos mionúcleos condensados por campo analisado do músculo gastrocnêmio, dos grupos controle e imobilizado nos três intervalos de tempo estudado. *Valores estatisticamente significativos nas comparações entre controle e imobilizado. ($P < 0,05$). #Valores estatisticamente significativos nas comparações entre intervalos de tempo dentro do grupo imobilizado. ($P < 0,05$).

Tecido Conjuntivo Muscular

A área média relativa do tecido conjuntivo intercelular e interfascicular (Fig.10) nos grupos imobilizados nos três tempos estudados aumentou significativamente em relação aos controles no músculo sóleo. Já no gastrocnêmio houve aumento da área média relativa do tecido conjuntivo aos 30 e 45 dias ($p < 0,01$) quando comparados com os controles. No entanto, a área do conjuntivo aumentou significativamente aos 45 dias no músculo sóleo, quando comparados os 3 tempos no grupo imobilizado ($45 \geq 30 \geq 15$ e $45 > 15$, $p < 0,05$). O aumento do tecido conjuntivo foi de 270% no sóleo e de 212% no gastrocnêmio no tempo final de 45 dias de imobilização

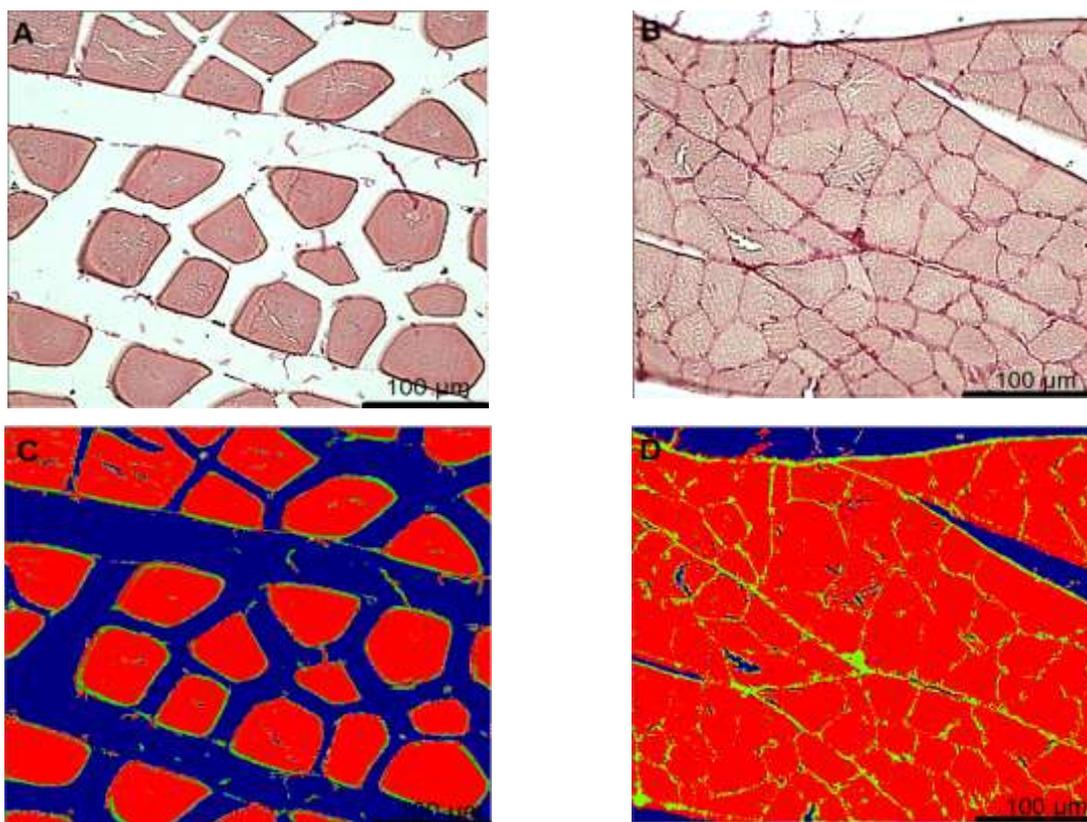


Fig. 10 - Imagem digitalizada do tecido muscular e conjuntivo do gastrocnêmio aos 30 dias. Grupo controle (A) e grupo imobilizado (B). PicroSiriusRed. Segmentação da imagem do grupo controle (C) e grupo imobilizado(D) com uso de três cores distintas.. Vermelha: Tecido Muscular; Verde: Tecido Conjuntivo, Azul: área nula.

Tab. 3 - Médias e desvios padrões da área média relativa do tecido conjuntivo muscular dos músculos sóleo e gastrocnêmio, grupos controle e imobilizado, avaliados nos três tempos (15, 30 e 45 dias).

Grupos Dias	Área conjuntivo (%) Sóleo	Área conjuntivo (%) Gastrocnêmio
Controle 15	10,19 ± 0,56	10,95 ± 3,25
Imobilizado 15	14,27 ± 2,46 ^{*B}	9,85 ± 0,95 ^A
Controle 30	10,27 ± 2,72	5,92 ± 2,66
Imobilizado 30	20,91 ± 5,40 ^{*AB}	12,41 ± 1,80 ^{*A}
Controle 45	9,80 ± 3,33	8,42 ± 3,14
Imobilizado 45	26,52 ± 7,97 ^{*A}	17,88 ± 5,97 ^{*A}

Nota: * Valores estatisticamente significativos nas comparações entre área relativa do tecido conjuntivo muscular entre grupos controles e imobilizados, para cada período de estudo, dentro na mesma coluna. $p < 0,05$.

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas nas comparações entre grupos imobilizados para cada tempo, dentro da mesma coluna. $p < 0,05$.

Tipos de Fibras Musculares

Quando se comparou o tipo de fibra muscular nos grupos imobilizados com os controles, observou-se que as fibras tipo I (Fig. 11) do sóleo diminuíram significativamente aos 30 dias de imobilização ($p < 0,007$). Já as fibras tipo II (Fig. 11) aumentaram significativamente no mesmo tempo ($p < 0,007$). Na comparação entre os períodos dentro do grupo imobilizado verificou-se queda significativa das fibras tipo II aos 45 dias ($15 \sim 30 > 45$, $15 \sim 45$, $p < 0,03$) (Tab. 6).

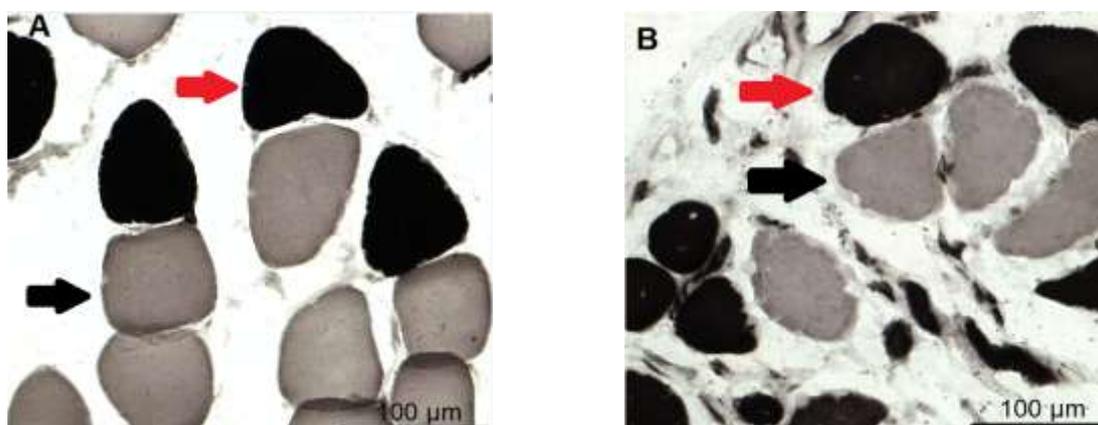


Fig. 11 - Imagens digitalizadas do músculo sóleo aos 30 dias através de reação específica para os tipos de fibras musculares. Grupo controle (A) e grupo imobilizado (B). Seta preta: Fibra tipo I - predomínio no músculo controle; Fibra tipo II - seta vermelha - em maior número no músculo imobilizado. ATPase (pH- 9,4).

No músculo gastrocnêmio, não houve alterações significativas quando se comparou o tipo de fibra nos grupos imobilizados com seus controles e nem nos diferentes períodos dentro do grupo imobilizado (Tab. 6).

Nas comparações entre fibras musculares I e II no sóleo do grupo controle observou-se que as fibras do tipo I foram mais numerosas ($p < 0,01$). Igualmente, as fibras do tipo I no sóleo do grupo imobilizado predominaram aos 30 e 45 dias ($p < 0,05$) (Tab. 6).

Tab. 4 - Médias e desvios padrões da distribuição de 200 fibras musculares em tipo I e II dos músculos sóleo e gastrocnêmio, nos grupos controle e imobilizado, avaliados nos tempos de 15, 30 e 45 dias

Grupos Dias	Sóleo		Gastrocnêmio	
	Fibras (un)		Fibras (un)	
	I	II	I	II
Controle 15	117 ± 17.34 ^a	83 ± 17.34 ^b	78.7 ± 53.9 ^a	121.3 ± 53.9 ^a
Imobilizado 15	129.3 ± 47.5 ^{Aa}	70.6 ± 47.5 ^{ABa}	92.3 ± 48.5 ^{Aa}	107.7 ± 48.5 ^{Aa}
Controle 30	146.6 ± 11.06 ^{*a}	53.3 ± 11.06 ^b	38 ± 22.6 ^b	162 ± 22.6 ^a
Imobilizado 30	111 ± 5.19 ^{Aa}	89 ± 5.19 ^{*Ab}	77 ± 48.5 ^{Aa}	123 ± 48.5 ^{Aa}
Controle 45	164.3 ± 16.07 ^a	35.7 ± 16.07 ^b	42 ± 21.9 ^b	158 ± 21.9 ^a
Imobilizado 45	141.7 ± 16.6 ^{Aa}	58.3 ± 16.6 ^{Bb}	99.3 ± 87.0 ^{Aa}	100.7 ± 87.0 ^{Aa}

Nota: *Valores estatisticamente significativos nas comparações do tipo de fibra I e II entre grupos controles e imobilizados para cada período de estudo, dentro na mesma coluna. $p < 0,05$

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas nas comparações entre fibras I com fibras I e Fibras II com fibras II nos grupos imobilizados para cada período de estudo, dentro da mesma coluna. $p < 0,05$

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nas comparações de fibras I versus II, entre grupos controles e entre grupos imobilizados para cada período de estudo, dentro da mesma linha. $p < 0,05$

Quando se compararam os tipos I e II de fibras musculares do gastrocnêmio no grupo controle observou-se predomínio do tipo II aos 30 e 45 dias ($p < 0,01$). Já no grupo imobilizado as fibras apresentaram proporções similares em todos os tempos (Tab. 6).

Tecido Nervoso

As fibras nervosas e placas motoras do grupo controle mostravam-se mais facilmente visualizáveis e mais contínuas que no grupo imobilizado em todos os tempos estudados e em ambos os músculos (Fig.12).

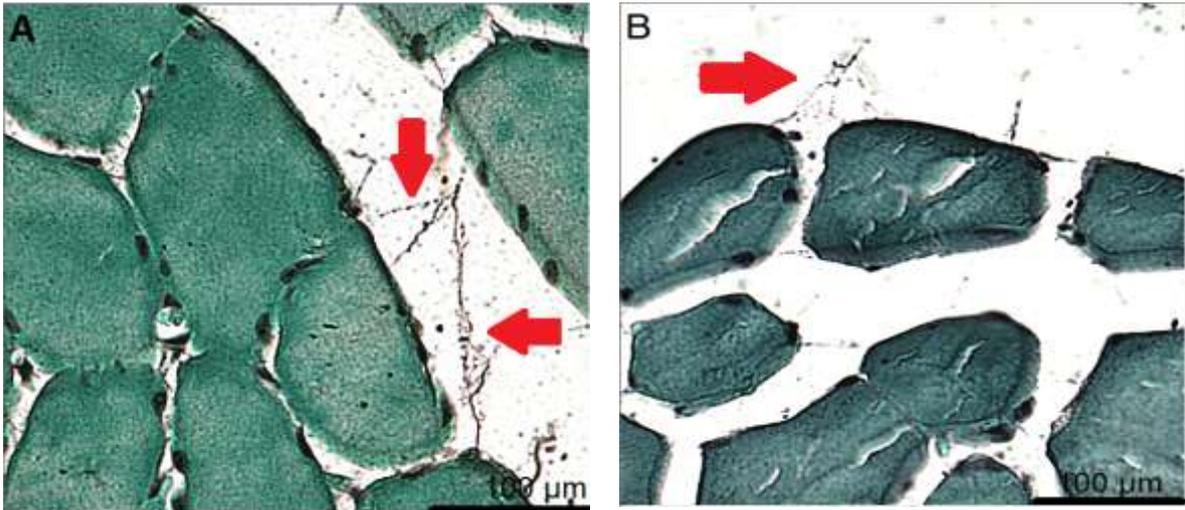


Fig. 12. Imagens digitalizadas do tecido muscular do sóleo com coloração específica para fibras nervosas. (A) Grupo controle, 30 dias; fibra nervosa mais facilmente visualizável e mais espessa (Seta). (B) Grupo imobilizado, 30 dias, fibra nervosa mais difícil de visualizar e mais tênue (Seta). Glees-Marsland.

Caspase 3

Os núcleos marcados pela reação imunohistoquímica (caspase 3) nos grupos imobilizados apresentavam-se, na maioria das vezes, com aspecto condensado e apesar de frequentes em todos os tempos avaliados (15, 30 e 45) foi maior aos 45 dias. O músculo sóleo foi mais intensamente marcado que o gastrocnêmico (Fig.13).

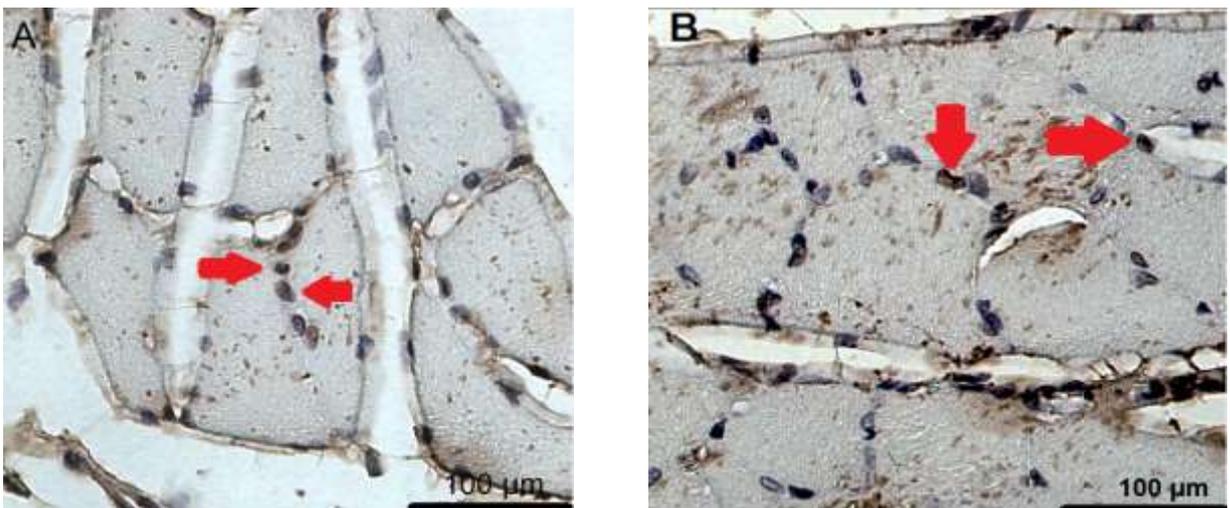


Fig. 13. Imagem digitalizada das células musculares do sóleo e gastrocnêmio com marcação positiva para Caspase 3 (núcleos em apoptose ou em autofagocitose). Sóleo - grupo imobilizado: 45 dias (A). Gastrocnêmio - grupo imobilizado: 45 dias (B). Caspase 3. Seta vermelha: positividade nuclear.

DISCUSSÃO

A Imobilização articular é um procedimento terapêutico amplamente empregado para permitir o reparo de lesões articulares e ou ósseas, mas que compromete a homeostasia das fibras musculares. Quando o tempo de imobilização é prolongado, como consequência ocorre à atrofia muscular. A técnica de imobilização com atadura gessada adaptada para ratos utilizada neste estudo foi eficiente, de simples aplicação e pouco onerosa. Manteve o membro na posição encurtada durante todos os tempos estudados, mesmo aos 45 dias quando a atrofia já era avançada. Williams e Goldspink (1984) em seu estudo analisaram a atrofia muscular nas posições encurtada e alongada. Nessa eles observaram que a atrofia é evidente aos 2 dias em relação à alongada que é mínima. Já a atrofia na posição neutra é mínima ou ausente (DURIGAN *et al.*, 2006). No estudo de Silva e colaboradores (2006) e Durigan (2006) a imobilização com resina acrílica do membro posterior na posição neutra em ratos mostrou-se mais trabalhosa e onerosa representando, portanto menor benefício quando comparada à técnica empregada no presente estudo.

O modelo de imobilização gessada ora apresentado, nos intervalos avaliados, produziu atrofia muscular similar a observada em seres humanos e em outros modelos. O peso corporal final nos grupos imobilizados caiu progressivamente nos três tempos, sendo mais acentuada no tempo final de 45 dias, corroborando estudos anteriores de outros autores (COHEN *et al.*, 1999; FITTS *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004; DURIGAN *et al.*, 2006; VOLTARELLI *et al.*, 2007; VOLPI *et al.* 2008; KIM e KIM, 2010).

Neste estudo priorizam-se os músculos sóleo e gastrocnêmio, por serem de fácil acesso, estarem próximos anatomicamente e apresentarem características distintas. A imobilização aqui utilizada gerou atrofia com perda de massa muscular significativa quando comparada com os respectivos controles, sendo no sóleo a perda de massa (40% aos 15 e 30 dias e 69% - 45 dias) e no gastrocnêmio de (23,8% aos 15 dias, 47,1% - 30 e 68,7% - 45 dias). Nos grupos imobilizados, o peso muscular diminuiu progressivamente apenas no músculo gastrocnêmio, já detectável aos 15 dias de imobilização. A perda de massa muscular final do gastrocnêmio foi de 48% e do sóleo de 25%. Jolk e Konstad (1983), empregando a imobilização na

posição encurtada por quatro semanas em gatos, verificaram diminuição significativa do peso dos músculos gastrocnêmio e sóleo, sendo o sóleo mais acometido, o que difere do atual estudo em ratos. Também Smith e colaboradores (2000) observaram redução no peso muscular do sóleo (15%) de coelhos no segundo e sexto dias após imobilização na posição encurtada. Outros autores relataram redução de 19, 20 e 33,8% do peso muscular do sóleo de ratos após imobilização (KONDO *et al.*, 1993; AHTIKOSKI *et al.*, 2003; KOURTIDOU-PAPADELI *et al.*, 2004). A diminuição progressiva do peso muscular apenas no músculo gastrocnêmio foi também relatada por Durigan e colaboradores (2006) que empregaram imobilização em posição neutra em ratos. Estes autores ainda salientaram que a imobilização por diferentes períodos resulta em atrofia muscular, variando de 15% a 70%, dependendo dos animais utilizados e das fibras avaliadas.

Em corte transversal, as fibras dos músculos do grupo controle apresentaram-se volumosas, com contornos arredondados e coloração acidofílicas. Já nos grupos imobilizados, as fibras apresentavam contornos irregulares, com área de secção transversal visivelmente diminuída, coloração menos acidofílica, além de fragmentação com fendas citoplasmáticas evidentes e células poliédricas. Ferreira *et al.* (2004) e Voltarelli *et al.* (2007) confirmam tais achados mostrando que as fibras dos músculos atrofiados têm diminuição do volume celular e do conteúdo protéico.

A avaliação morfométrica mostrou diminuição significativa da área média da secção transversal das fibras em ambos os músculos estudados, evidentes aos 15 dias de imobilização e mais pronunciados aos 45 dias em relação aos controles, indicando a perda de massa das fibras e de cada músculo. Entretanto, nos imobilizados a diminuição da área média da secção transversa foi de 8% no músculo sóleo e 30% no músculo gastrocnêmio aos 45 dias, sendo significativa apenas no músculo gastrocnêmio, o que reforça a assertiva de parágrafo anterior de que o músculo gastrocnêmio é mais sensível à atrofia que o sóleo neste modelo. Durigan *et al.* (2006) constatou redução significativa da área da secção transversa da fibra de 31% do músculo sóleo imobilizado após três dias em ratos, na posição neutra. Outros estudos relatam diminuição significativa da área da fibra no músculo sóleo de 43% e 68% após três semanas de imobilização (KANNUS *et al.*, 1998; EDGERTON *et al.*, 2002).

A diminuição significativa do diâmetro médio e perímetro das fibras dos músculos sóleo e gastrocnêmio em todos os tempos de imobilização quando

comparados com os controles vistas neste trabalho confirmaram em estudos anteriores (KANNUS *et al.*, 1998; EDGERTON *et al.*, 2002; DURIGAN *et al.*, 2006). No músculo sóleo imobilizado, as reduções do diâmetro médio e perímetro tiveram pico (9,14 e 12,15%) aos 30 dias. No gastrocnêmio imobilizado foi mais intensa (17,29 e 17,54%) aos 45 dias, reforçando a assertiva anterior de que o músculo gastrocnêmio é mais sensível à atrofia que o sóleo neste modelo. Williams e Goldspink (1984) imobilizaram o membro pélvico de camundongos em posição encurtada e alongada durante duas semanas e observaram diminuição no diâmetro médio e perímetro das fibras do músculo sóleo na posição encurtada em apenas dois dias de imobilização.

Tomados em conjunto, as dimensões celulares no músculo sóleo reduziram significativamente se acentuando aos 30 dias de imobilização e de maneira oposta, no músculo gastrocnêmio as dimensões diminuíram significativamente nos tempos finais de 30 dias se acentuando aos 45 dias de imobilização.

As células musculares tanto do músculo sóleo quanto do gastrocnêmio no grupo imobilizado aumentaram significativamente por campo analisado nos três tempos estudados (15, 30 e 45) em comparação com os controles. Já nos grupos imobilizados houve um aumento aos 30 dias com posterior queda aos 45 dias no músculo sóleo. O aumento de células por campo analisado aos 30 dias pode ser interpretado como consequência da diminuição das dimensões celulares (Área; Diâmetro Médio e Perímetro) das fibras do músculo sóleo, permitindo assim caber mais células no campo. Já a diminuição de células por campo analisado aos 45 dias sugere perda celular por apoptose ou autofagocitose. Não se detectou aumento de células por campo analisado nos diferentes tempos estudados para o músculo gastrocnêmio. Não existe relato na literatura sobre a análise quantitativa das células musculares em relação ao número celular e alterado em animais imobilizados.

As células alteradas por campo com contorno irregular, menos acidofílica e fendas no citoplasma aumentaram aos 30 dias de imobilização quando comparados com seus controles no músculo sóleo, e aos 45 dias em ambos os músculos. Células com contorno irregular e retraídas podem sugerir apoptose ou mesmo autofagocitose de núcleos, o que parece ser sustentado pela imunohistoquímica para caspase. O músculo sóleo, por apresentar proporções maiores de fibras do tipo I, parece mostrar células alteradas mais precocemente que o músculo gastrocnêmio.

Pôde-se constatar neste estudo que os mionúcleos do músculo sóleo aumentaram por campo, quando se comparou os grupos imobilizados com os controles nos três tempos, provavelmente devido à diminuição significativa dos diâmetros analisados por células. Tal aumento dos mionúcleos no músculo gastrocnêmio ocorreu apenas aos 30 e 45 dias. Quando analisado entre grupos imobilizados, o número dos mionúcleos por campo no tempo de 15 dias foi menor que aos tempos de 30 e 45 dias apenas no gastrocnêmio, devido à correlação do peso deste músculo com as dimensões de suas fibras. Em estudos anteriores, autores relataram a diminuição significativa dos mionúcleos em músculos sóleo e gastrocnêmio submetidos ao desuso pela imobilização (APPELL, 1990; FERREIRA *et al.*, 2004; VOLTARELLI *et al.*, 2007). Adams e colaboradores (2001) observaram que durante a atrofia muscular por desuso ocorre a diminuição da atividade transcricional e traducional do mionúcleo, e as fibras respondem com uma diminuição do número de mionúcleos por campo. O estudo de Allen *et al.* (1996) constatou diminuição do número de mionúcleos em fibras tipo I em relação à do tipo II, numa situação de ausência de carga.

Os mionúcleos condensados por campo do músculo sóleo aumentaram significativamente nos grupos imobilizados em relação aos controles nos três tempos. No músculo gastrocnêmio tal aumento e o entre grupos imobilizados ocorreu somente aos 30 e 45 dias. Mionúcleos condensados podem sugerir apoptose e/ou autofagocitose de nucleos, sustentado pela imunohistoquímica para caspase. O músculo sóleo, por apresentar proporções maiores de fibras do tipo I, parece mostrar mionúcleos condensados mais precocemente que o músculo gastrocnêmio. Diversos autores relataram aumento significativo de mionúcleos condensados em músculos sóleo e gastrocnêmio submetidos ao desuso pela imobilização (APPELL, 1990; FERREIRA *et al.*, 2004; VOLTARELLI *et al.*, 2007).

A área média relativa do tecido conjuntivo intercelular e interfascicular aumentou significativamente nos grupos imobilizados em relação aos controles nos três tempos no sóleo. Já no gastrocnêmio tal aumento só ocorreu aos 30 e 45 dias. Quando comparados os 3 tempos no grupo imobilizado, a área do conjuntivo aumentou significativamente somente aos 45 dias e no músculo sóleo. O aumento do tecido conjuntivo foi de 270% no sóleo e de 212% no gastrocnêmio no tempo final de 45 dias de imobilização. Tais achados parecem sustentar que o músculo sóleo é muito afetado na imobilização, mostrando maior aumento do tecido conjuntivo,

miócitos e miócitos alterados. No entanto, parecem sustentar também que o músculo sóleo é ao mesmo tempo mais resistente à atrofia que o gastrocnêmio, visto que não mostra diferenças significativas entre os 3 tempos no grupo imobilizado para alguns parâmetros (peso muscular, área média da secção transversal das fibras e de mionúcleos e mionúcleos condensados).

Vários estudos descrevem o aumento da área do tecido conjuntivo muscular do sóleo e gastrocnêmio de ratos após distintos períodos de imobilização, de maneira similar aos nossos resultados (WILLS *et al.*, 1982; KANNUS *et al.*, 1998; MATHEUS *et al.*, 2007; HIBINO *et al.*, 2008; VOLP *et al.*, 2008; BERTOLINI *et al.*, 2010). Williams e Goldspink (1984) demonstraram que a proliferação do tecido conjuntivo/aumento da taxa de renovação (“*turnover*”) são evidenciadas precocemente no músculo sóleo imobilizado em posição encurtada, sendo já perceptível em apenas dois dias de imobilização. Coutinho e colaboradores (2004) relatam que o tecido conjuntivo aumenta nos músculos sóleo e gastrocnêmio com o tempo prolongado de imobilização. Józsa e colaboradores (1988) observaram que o remodelamento de tecido conjuntivo após imobilização depende não somente do músculo imobilizado, mas também do tempo e das posições de imobilização (encurtada, alongada e neutra). Assim, independente do modelo estudado (imobilização ou denervação), a quantidade de tecido conjuntivo intramuscular aumenta significativamente, variando de 50% até 700%.

Com relação ao tipo de fibra muscular do sóleo, observou-se que enquanto as fibras tipo I diminuíram significativamente somente aos 30 dias, as do tipo II aumentaram no mesmo período. As alterações metabólicas decorrentes da imobilização, particularmente a queda da atividade basal, poderiam explicar a diminuição das fibras tipo I no sóleo neste período. Por outro lado, o aumento das fibras tipo II poderia ser explicado por uma tentativa de compensação muscular da queda das fibras tipo I. De acordo com Durigan *et al.* (2006) o músculo sóleo, predominantemente composto por fibras tipo I, é o mais susceptível à atrofia muscular inerente ao desuso. Ploug e colaboradores (1995) relacionaram a maior susceptibilidade do sóleo à atrofia por inatividade ao fato de ser este um músculo postural e ter uma atividade basal maior do que os não-posturais. Tal assertiva corrobora com a afirmação de Lieber (2002), de que os músculos considerados antigravitacionários, os uniarticulares e os que possuem maior proporção de fibras lentas (tipo I) são os mais vulneráveis à atrofia induzida pelo desuso muscular. Okita

e colaboradores (2001) em seu estudo imobilizaram ratos na posição encurtada durante quatro semanas e observaram que o músculo sóleo após o período total de imobilização apresentou um aumento significativo da fibra tipo II e diminuição da fibra tipo I quando se comparou grupo imobilizado com o controle; similar ao estudo de Kannus *et al.* (1998) e ao nosso estudo aos 30 dias.

Na comparação entre os períodos dentro do grupo imobilizado verificou-se queda significativa das fibras tipo II aos 45 dias apenas no músculo sóleo. Entretanto tal queda (fibras tipo II nos imobilizados aos 45 dias) veio acompanhada de diminuição das fibras tipo II nos controles, podendo significar não somente o efeito da imobilização em si, mas mesmo parte do comportamento natural do músculo. Há poucas referências na literatura que abordem a evolução temporal dentro de grupos controle e imobilizado. O usual é comparar proporções entre diferentes fibras momento a momento. A queda de fibras tipo II no músculo sóleo, aos 45 dias de imobilização não modificou a proporção de fibras, maior para o tipo I em todos os momentos do estudo.

Nas comparações entre fibras musculares I e II no sóleo do grupo controle observou-se que as fibras do tipo I apresentaram maior proporção (82.1% ao final, nos 45 dias). Com a imobilização, as fibras do tipo I no sóleo apresentaram proporções semelhantes às do tipo II somente aos 15 dias. Tal semelhança de proporções entre fibras tipo I e II neste momento (imobilizado e imobilizado aos 15 dias) sugere que as fibras do tipo I caíram mais precocemente que as do tipo II durante os primeiros 15 dias de imobilização. Já aos 30 e 45 dias mantiveram uma frequência maior do tipo I (70,8%). Kannus e colaboradores (1998) observaram que o músculo sóleo imobilizado apresentou 86% de fibras tipo I e 14% do tipo II. Há evidências de que o músculo sóleo (postural ou tônico) apresente predomínio de fibras tipo I, pois sua demanda funcional faz com que suas fibras sejam ativadas durante 90% do tempo (CAIOZZO, 1996; MINAMOTO, 2005). Assim, os músculos sóleos de ratos submetidos ao desuso apresentam maior incidência de fibras tipo II em detrimento da fibra tipo I (FITTS *et al.*, 2001; MINAMOTO, 2005), sustentando os nossos achados no tempo de 30 dias de imobilização quando comparado ao controle.

No músculo gastrocnêmio, não houve alterações significativas quando se comparou o tipo de fibra nos grupos imobilizados com seus controles e nem nos diferentes períodos dentro do grupo imobilizado indicando que as proporções de

fibras se mantiveram independente da imobilização. As fibras musculares do tipo II no gastrocnêmio no grupo controle apresentaram proporções maiores aos 30 e 45 dias (79%) nas comparações entre fibras I e II. Já no grupo imobilizado as fibras apresentaram maior variabilidade e proporções similares em todos os tempos, terminando o ensaio com 50,3% para tipo II e 49,7% para tipo I, nos 45 dias. Kannus e colaboradores (1998) imobilizaram o membro posterior de ratos na posição encurtada durante três semanas e analisaram o músculo sóleo e gastrocnêmio. Viram que após o tempo de imobilização no gastrocnêmio havia 3% de fibras tipo I e 97% do tipo II. Paralelamente, outros estudos relatam que o músculo gastrocnêmio (fásico ou rápido) apresenta heterogeneidade para os dois tipos de fibras, é ativado somente durante 5% das atividades diárias (CAIOZZO, 1996; MINAMOTO, 2005). Os músculos de indivíduos submetidos a qualquer tipo de imobilização sofrem uma transformação no sentido de fibras tipo I, por ser uma fibra mais susceptível ao desuso, para fibra tipo II (FITTS *et al.*, 2001; MINAMOTO, 2005).

As fibras nervosas e placas motoras do grupo imobilizado mostravam-se mais dificilmente visualizáveis e descontínuas que no grupo controle em todos os tempos estudados. Diversos autores afirmaram que a imobilização articular promove a diminuição da atividade neuromuscular e degeneração do nervo, associado à diminuição do trofismo muscular (APPELL, 1986; LIEBER, 2002; SAKAKIMA *et al.*, 2002; DURIGAN *et al.*, 2006; VOLTARELLI *et al.*, 2007). Fournier *et al.* (1983) relataram que em ratos com membro pélvico imobilizado na posição encurtada por 28 dias não apenas havia alterações na força muscular, mas também alteração significativas na atividade eletromiográfica. Tais alterações poderiam resultar de unidade central danificada e/ou redução de aferências proprioceptivas sobre os motoneurônios; que de acordo com o conceito de neuroplasticidade admite que novas sinapses sejam constantemente criadas a partir da necessidade e repetição, enquanto velhas sinapses são perdidas quando não utilizadas em tempo adequado (GONÇAVES-ARANTES e COELHO, 2006).

A reação imunohistoquímica para caspase 3 marcou núcleos condensados, frequentes em todos os tempos avaliados, sendo mais frequentes aos 45 dias nos grupos imobilizados quando comparados com o controle. O músculo sóleo apresentou mais marcação positiva que o gastrocnêmio. A detecção de caspase 3 ativa é considerada um bom marcador para apoptose (TENNISWOOD *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 2004; VOLTARELLI *et al.*, 2007). Smith *et al.* (2000) descreveram

alterações celulares e nucleares envolvidas na atrofia muscular, similares às obtidas neste estudo, e as consideraram resultado da ativação de endonucleases e de proteases citoplasmáticas, numa via modulada por vários genes reguladores com função pró-apoptótica. Entretanto, como neste estudo não se quantificou a celularidade total e nem se identificou morte celular fica ainda indefinido se os mionúcleos condensados e marcados imunohistoquimicamente para Caspase 3 são efetivamente apoptóticos ou estão apenas sendo reciclados sem morte celular no processo de autofagocitose.

Resumindo, a imobilização através de atadura gessada em ratos é eficiente para manter o membro imóvel e provocar atrofia muscular por desuso do membro já evidente com 15 dias de imobilização, em distintos períodos e mais acentuada em períodos prolongados. Trata-se, por conseguinte, de um modelo prático e eficiente para estudar os mecanismos responsáveis pela atrofia em animais experimentais. Em um mesmo modelo, há diferentes respostas teciduais, decorrentes das variações do tipo muscular estudado e do tempo de desuso do membro avaliado.

Este estudo ampliou o conhecimento dos eventos envolvidos na atrofia muscular por imobilização, sugerindo a associação entre os tipos de fibras musculares, fibras nervosas, placas motoras e marcação positiva dos núcleos condensados (apoptose e/ou autofagocitose de núcleos) no desenvolvimento da atrofia muscular esquelética. Estudos mais aprofundados nesta questão deverão ser conduzidos, de maneira a proporcionar maiores esclarecimentos nas interações entre nervos, placas motoras e fibras musculares durante a atrofia em períodos curtos e prolongados de imobilização. É também necessário uma avaliação morfométrica mais elaborada visando definir se há perda de fibras (apoptose) ou apenas reciclagem de núcleos (autofagocitose, sem perda celular).

CONCLUSÕES

O modelo de imobilização através de atadura gessada proposto por Jokl e Konstadt (1983) em gatos também se aplica a ratos Wistar, sendo capaz de manter o membro imóvel e provocar atrofia muscular por desuso após 15 dias de imobilização.

A atrofia muscular por desuso se acentua em períodos prolongados, mas há diferentes respostas teciduais, decorrentes de variações do tipo muscular estudado, do tempo e da posição de imobilização do membro avaliado.

A imobilização causa perda de massa corporal acentuada - se no tempo final de 45 dias.

O músculo gastrocnêmio no grupo imobilizado perde mais peso e também dimensões celulares (área média de secção transversa, diâmetro médio e o perímetro das fibras musculares) que o sóleo nos períodos finais estudados.

Os miócitos alterados aumentam por campo analisado no tempo final e se associam com os resultados da imunohistoquímica para caspase 3, indicando positividade nuclear para apoptose e/ou autofagocitose nuclear em momentos tardios da atrofia no sóleo e gastrocnêmio.

Os mionúcleos e mionúcleos condensados do gastrocnêmio aumentam por campo analisado progressivamente no tempo final em relação ao sóleo.

O tecido conjuntivo intercelular e fascicular aumenta mais no músculo sóleo que no gastrocnêmico.

As fibras tipo I predominaram no músculo sóleo imobilizado nos momentos de 30 e 45 dias do estudo.

O músculo gastrocnêmio apresenta maior variabilidade e proporções similares de fibras tipo I e II em todos os tempos imobilizados.

As fibras nervosas tornam-se menos contínuas e menos visíveis após a imobilização, persistente em ambos os músculos e em todos os tempos.

Ambos os músculos apresentam marcação nuclear para Caspase 3, porém o sóleo aparentou maior positividade em relação ao gastrocnêmio.

O músculo sóleo é menos sensível à imobilização, porém mais vulnerável a atrofia muscular que o gastrocnêmio no tempo final de 45 dias, devido a sua maior

proporção de fibras tipo I, além de apresentar maior positividade nuclear para apoptose e ou autofagocitose de núcleos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, V.; GIELEN, S.; HAMBRECHT, R.; SCHULER, G. Apoptosis in Skeletal Muscle. **Frontiers Bioscience**, v.6, p.1-11, Jan. 2001.

ADHIHETTY, P. J.; O'LEARY, M. F. N.; HOOD, D. A. Mitochondria in Skeletal Muscle: Adaptable Rheostats of Apoptotic Susceptibility. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.36, n.3, p.116-21, July 2008.

ALLEN, D. L.; MONKE, S. R.; TALMADGE, R. J.; ROY R. R.; EDGERTON, V. R. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**, v.78, p.1969-76, 1995.

ALLEN D. L.; YASUI, W.; TANAKA, T.; OHIRA, Y.; NAGAOKA, S.; SEKIGUCHI, C. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. **Journal of Applied Physiology**, v.81, n.1, p.145-151, 1996.

AHTIKOSKI, A. M.; KOSKINEN, S. O.; VIRTANEM, P.; KOVANEN, V.; RISTELI, J.; TAKALA, T. E S. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.177, p.473-81, 2003.

APPELL, H. J. Morphology of immobilized skeletal muscle and the effects of the pre and post immobilization training program. **International of Journal Sports Medicine**, v.7, n.1, p.6-12, 1986.

APPELL, H. J. Muscular Atrophy Following Immobilization - **A Review**. **Sports Medicine**, v.10, n.1, p.42-58, 1990.

ARENDS, M. J.; WYLLIE, H. A. Apoptosis: Mechanisms and Roles in Pathology. **International Review of Experimental Pathology**, v.32, p.223-254, 1991.

ASHMORE, C. R. Phenotypic Expression of Muscle Fiber Types and Some Implications to Meat Quality. **Journal of Animal Science**, v.38, n.5, p.1158-63, 1974.

BARTON, E.; MORRIS, C. Mechanisms and Strategies to Counter Muscle Atrophy. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**, v.58a, n.10, p.923-26, 2003.

BATISTA, J. J. **Análise morfométrica e da expressão de genes na apoptose induzida pelo vírus da doença de gumboro**. Tese de Doutorado em Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 233p.

BERTOLINI, S. M. M. G.; CARARO, D.C.; OLIVEIRA, P.D. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem wistar pós-imobilização articular. **Acta Scientiarum Health Sciences**, Maringá, v.32, n.1, p.23-27, 2010.

BOOTH, F.W. Time course of molecular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. **Journal of Applied. Physiology**. v.43, n.5, p.656-61, 1977.

BRITO, M. K. M.; FILHO, J. C. S. C.; VANDERLEI, L. C. M.; TARUMOTO, M. H.; DAL PAI, V.; GIACOMETTI, J. A. Dimensões Geométricas das Fibras do Músculo Sóleo de Ratos Exercitados em Esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12, n.2, Mar/Abr, 2006.

BRUUSGAARD, J. C.; GUNDERSEN, K. In Vivo Time-Lapse Microscopy Reveals no loss of Murine Myonuclear during weeks of Muscle Atrophy. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, n.4, p.1450-57, 2008.

CAIOZZO, V. J. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.81, n.1, p.123-32, 1996.

CALIARI, M. V. **Princípios de morfometria digital: KS 300 para iniciantes**. Belo Horizonte: UFMG, 1997.

CHIKWENDU, I.; JEEVENDRA, M. J. A. Fiber Atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization. **Critical Care Medicine**, v.27, n.2, p. 275-85, 1999.

CLOSE, R. I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscle. **Physiological Reviews**, v.52, p.129-197, 1972.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v.326, p.1-16, 1997.

COHEN, I.; BOGIN, E.; CHECHICK, A.; RZETELNY, V.; Biochemical alterations secondary to disuse atrophy in the rat's serum and limb tissues. **Archives of Orthopedic and Trauma Surgery**, v.119, p.410-17, 1999.

COHEN, J.J.; DUKE, R.C. Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annual Veterinarian Immunology**, v.10, p.267-93, 1992.

COUTINHO E, L.; GOMES, A. R. S.; FRANÇA, C. N.; OISHI, J.; SALVINI, T.F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.37, n.12, p.1853-61, 2004.

DIRKS, A.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.282, p.519-27, 2002.

DURIGAN, J. L. Q.; CANCELLIERO, K. M.; DIAS, C. N. K.; SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O. Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfométrica. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.13, n.2, p.38-45, 2006.

EDGERTON, V. R.; ROY, R. R.; ALLEN, D. L.; MONTI, R. J. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. **American Journal of Physical Medicine Rehabilitation**, v. 81, n.11,p.S127- 47, 2002.

ELLIS, H. M; HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**, v.44, p.817, 1991.

ENDO, C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; FAZAN, V. S. A Laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.16, n.5, 2008.

FADOK, V. A.; HENSON, P. M. Apoptosis: getting rid of the bodies. **Current Biology**, v.8, p.R693-95, 1998.

FAVIER F. B.; BENOIT, H.; FREYSSINET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**. v.456, n.3, p. 587-600, 2008.

FERRAZ, M. E. M. R.; ZANOTELI, E.; OLIVEIRA, A. S. B.; GABBAI, A. A. Atrofia muscular progressiva: estudo clínico e laboratorial em 11 pessoas. **Arquivo de Neuro- Psiquiatria**, v.66, n.1, 2004.

FERREIRA, R.; NEUPARTH, M. J.; ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; DUARTE, J.; AMADO, F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.4, n.3, p. 94–111, 2004.

FESUS, L.; THOMAZY, V.; FALUS, A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. **FEBES Lett.**, v.224, n.15, p.104-08, 1987.

FILHO, B. T. E. P.; OLIVEIRA, R. P.; SILVA, J. S.; KAJITANI, E. T. Estudo do uso da membrana de politetrafluoroetileno inerte expandido para a prevenção de fibrose pós laminectomia em ratos Wistar. **Acta Ortopedia Brasileira**, v.11, n.2, p.110-17, abr./jun. 2003.

FILHO, J. C. S.; VANDERLEI, L. C. M.; CAMARGO, R. C. T.; OLIVEIRA, D. A. R.; JÚNIOR, S. A. O.; DAL PAI, V. William D. Belangero⁵. Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. **Arquivo Ciência da Saúde**, v.12, n.3, p.196-99, 2005.

FITTS, R.H.; RILEY D.R.; WIDRICK, J.J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. **Journal of Experimental Biology**, v.204, p.3201-08, 2001.

FOURNIER, M.; ROY, R. R.; PERHAM, H.; SIMARD, C. P.; EDGERTON, V. R. Is limb immobilization a model of muscle disuse? **Experimental Neurology**, v.80, p.147-56, 1983.

GARCIA-MARTINEZ, V., MACIAS, D.; GANAN, Y.; GARCIA-LOBO, J. M.; FRANCA, M. V., FERNANDEZ-TERAN, M. A.; HURLE, J. M. Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of embryonic chick leg bud. **Journal of Cell Science**, v.106, p.201-208, 1993.

GONÇALVES-ARANTES, F.; COLEHO, R. Depressão e tratamento: Apoptose, Neuroplasticidade e Antidepressivos. **Acta Medicina Portuguesa**, v.19, p.9-20, 2006.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The central executioners of a apoptosis: Caspases or mitochondria? **Trends in Cell Biology**, v.8, p.267-71, 1998.

GUNDERSEN, K.; BRUUSGAARD, J. C. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? **Journal of Physiology**, v.586, n.11, p. 2675-81, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. N. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 67- 78p.

HADDAD, F.; ROY, R. R.; ZHONG, H.; EDGERTON, V. R.; BALDWIN, K. M. Atrophy responses to muscle inactivity.II. Molecular markers of protein deficits. **Journal of Applied Physiology**, v.95, p.791-802, 2003.

HARR, M. W.; DISTELHORST, C. W. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. **Cold Spring Harbour Perspectives in Biology**. v.2, n.10, p.a005579, 2010.

HIBINO, I.; OKITA, M.; INOUE, T.; BANNO, Y.; HOSO, M. Effect Of Immobilization on Collagen of Rat Soleus Muscle. **Journal of the Japanese Physical Therapy Association**, v.11, n.1-6, 2008.

IIDA, R. H.; KANKO, S.; SUGA, T.; MORITO, M.; YAMANE, A. Autophagic-lysosomal pathway functions in the masseter and tongue muscles in the klotho mouse, a mouse model for aging. **Molecular Cell Biochemistry**. v.348, n.1-2, p.89-98. 2011.

JOKL, P.; KONSTADT, S. The Effect of Limb Immobilization on Muscle Function and Protein Composition. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v.3, p.222-29, April 1983.

JÓZSA, L.; THORING,J.; JARVINEN, M.; KANNUS,P.; LEHTO, M.; KVIST, M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. **Experimental and Molecular Pathology**, v.49, n.2, p.267-278, 1988.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; JARVINEN, T. L. N.; KVIST, M.; VIENO, T.; JARVINEN, T. A. H. *et al.* Free mobilization and low-to-high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology**, v.84, p.1418-24, 1998.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. **Journal of Pathology**, v.107, p.41-44, 1972.

KIM, J.W.; KWON, O.Y.; KIM, M.H. Differentially expressed genes and morphological changes during lengthened immobilization in rat soleus muscle. **Differentiation**, v.75, p.147-57, 2007.

KIM, J.; KIM, B. Differential Regulation of MAPK Isoforms during Cast-Immobilization- Induced Atrophy in rat Gastrocnemius muscle. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 22, p. 217-22, 2010.

KONDO, H.; KODAMA, J.; KISHIBE, T.; ITOKAWA, Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. **American Journal of Physiology**, v.265, p.839-44, 1993.

KOURTIDOU-PAPADELI, C. KYPAROS, A.; ALBANI, M.; FROSSINIS, A.; PAPADELIS, C. L.; BAMIDIS, P. *et al.* Electrophysiological, histochemical, and hormonal adaptation of rat muscle after prolonged hindlimb suspension. **Acta Astronautica**, v.54, p.737-47, 2004.

LIEBER, R. L. **Skeletal muscle structure, function, and plasticity: the physiological basis of rehabilitation**. Ed San Diego, 3.ed. Philadelphia: Lippincott, 2002.

LUNA, L. G. **Manual of the histological staining methods of the armed forces institute of pathologic**. 3^a ed. New York: McGraw Hill, p.258, 1968.

MALLAT, Z.; TEDGUI, A. Apoptosis in vasculature: mechanism and functional importance. **British Journal of Pharmacology**, v.130, p.947-962, 2000.

MARSLAND, T, GLESS, P; ERIKSON, L. Modification of the Gleys, silver impregnation for paraffin sections. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.13, p.587, 1954.

MATHEUS, J. P. C.; GOMIDE, L. B.; GOULART, J.; MILANI, P. O.; SHIMANO, A. C. A imobilização gessada por um curto período de tempo pode influenciar nas propriedades biomecânicas do músculo esquelético? **Brazilian Journal of Biomotricity**, v. 1, p. 28-33, 2007.

MINAMOTO, B.V. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.12, n.3, p.50-55, 2005.

MORO, L.; VASCONCELOS, A. C.; SANTOS, F. G. A.; ALVES, C. M.; NUNES, J. E. S. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n. 3, p.408-410, 2004.

OKITA, M.; YOSHIMURA, T.; NAKANO, J. Effects of short duration stretching on disuse muscle atrophy in immobilized rat soleus muscle. **Journal of the Japanese Physical Therapy Association**, v.4, p.1-5, 2001.

O'LEARY, M. F.; HOOD, D. A. Effect of prior chronic contractile activity on mitochondrial function and apoptotic protein expression in denervated muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.105, n.1, p.114-20, 2008.

PEITSCH, M. C.; MANNHERZ, H. G.; TSCHOPP, J.; Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). **EMBO Journal**, v.12, p.371-77, 1993.

PELIZZARI, C.; MAZZANTI, A.; RAISER, A. G.; LOPES, S. T. A.; GRAÇA, D. L.; SALBEGO, F. Z. *et al.* Estimulação elétrica neuromuscular de média frequência (rusa) em cães com atrofia muscular induzida. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.736-742, may/jun. 2008.

PEREIRA, N. B. **Apoptose na patogenia do Loxoscelismo cutâneo experimental em coelho - abordagem morfológica e imunoistoquímica**. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

PETER, J. B.; BARNARD, R.; EDGERTON, R.; GILLESPIE, C.; STEMPEL, K. Metabolic profiles of the three types of skeletal muscle fibers in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v.11, p.2627-33, 1972.

PLOUG, T.; HANDBERG, A.; PETERSEN, L. N.; LARSEN, J. J.; MIKINES, K. J.; GALBO, H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolical**, v.268, p.980-86, 1995.

PORTO, C, D. **Caracterização Histoquímica do Colágeno e Expressão de Mmp-2, Mmp-9 E Timp-1 nas Endometrites Crônicas das Éguas**. 2006. 89 p.

Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2006.

ROUND, J. M.; MATTHEWS, Y.; JONES, D. A. A quick, simple and reliable histochemical method for ATPase in human muscle preparations. **Histochemical Journal**, v.12, p.707-10, 1980.

SAAD, P. C. B.; GUIMARÃES, G.; DAL PAI, V.; KROLL, L. B. Análise histológica e histoquímica das fibras dos músculos reto do abdome e intercostal paraesternal de ratos submetidos ao exercício da natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.8, n.4, Jul/Ago, 2002.

SAKAKIMA, H.; YOSHIDA, Y.; MORIMOTO, N. The effect of denervation and subsequent reinnervation on the morphology of rat soleus muscle. **Journal of Physical Therapy Science**, v.14, p.21-26. 2002.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. FEPMVZ, 2002. 265p.

SANTOS, N. B.; ANDREO, J. C.; MORAIS, L. H. R.; ANDREO, M. B.; ANDREO, T. B. Morfometria dos tipos histoenzimológicos de fibras musculares do músculo reto abdominal de ratos alcoolizados. **Salusvita**, Bauru, v.23, n.2, p.183-195, 2004.

SAVILL, J.; FADOK, V.; HENSON, P.; HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunology Today**, v.14, p.131-36, 1993.

SILVA, C. A.; GUIRRO, R. R. J.; POLACOW, M. L. O.; CANCELLIERO, K. M.; DURIGAN, J. L. Q. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n.7, p.979-85, 2006.

SMITH, H. K.; MAXWELL, L.; MARTYN, J. A.; BASS, J. J. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. **Cell Tissue Research**, v.302, p.235-41, 2000.

ST-AMAND, J.; OKAMURA, K.; MATSUMOTO, K.; SHIMIZU, S.; SOGAWA, Y. Characterization of control and immobilized skeletal muscle: an overview from genetic engineering. **The FASEB Journal**, v.15, p.791-802, March 2001.

TENG, B.T.; PEI, X.M.; TAM, E. W.; BENZIE I. F.; SIU, P. M. Opposing responses of apoptosis and autophagy to moderate compression in skeletal muscle. **Acta Physiologica (Oxford)**. v.201, n.2, p.239-54. 2011.

TENNISWOOD, M.; TAILLEFER, D.; LAKINS, J. Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues. In: TOMEI, L. D.; COPE, F. O. **Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease**. New York: Springer, 1994. p. 283-311.

TEWS, D. S. Apoptosis and fibre loss in neuromuscular disorders. **Neuromuscular Disorders**, v.12, p.613-622, 2002.

THORNBERRY, N. A.; RANO, T.A.; PETERSON, E. P.; RASPER, D. M.; TIMKEY, T.; GARCIA-CALVO, M. *et al.* A combinatorial approach defines specificities of members of the caspases family and granzyme B: Function relationships for key mediator of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.17907-911, 1997.

TOLKOVSKY, A. M. Autophagy thwarts muscle disease. **Nature Medicine**. v.16, n.11, p.1188-90, 2010.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. VDAC Regulation by the Bcl-2 family of proteins. **Cell Death Differentiation**, v.71, n.2, p.1174-81, 2000.

VASCONCELOS, A. C.; LAM, K. M. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus. **Journal of Comparative Pathology**, v.112, p.327-38, 1995.

VAZEILLE, E.; CODRAN, A. The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.295, n.5, p.E1181-90, 2008.

VIALLE L. R. G.; FISCHER, S.; MARCON, J. C.; VIALLE, E.; LUZZI, R.; BLEGGI-TORRES, L. F. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, n.2, fev. 1999.

VOLPI, F. S.; CASAROLL, L. M.; PUDELL, C.; MENON, T.; CIENA, A. P.; ALVES, E. P. B. *et al.* Efeitos da Remobilização em Duas Semanas com Natação Sobre o Músculo Sóleo de Ratos Submetidos à Imobilização. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.14, n. 3, Mai/Jun., 2008

VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R.; DUARTE, J. A. R. Atrofia muscular esquelética e modelos experimentais: Apoptose e alterações histológicas, bioquímicas e metabólicas. **Revista de Educação Física**, v.18, n.1, p.85-95, 2007.

WILLIAMS, P. E.; CATANESE, T.; LUCEY, E. G.; GOLDSPINK, G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. **Journal of Anatomy**, v.158, p.109-14, 1988.

WILLIAMS, P. E.; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**, v.138, p.343-50, 1984.

WILLS, C. A.; CAIOZZO, V. J.; YASUKAWA, D. I.; PRIETTO, C. A.; MCMASTER, W. C. Effects of immobilization of human skeletal muscle. **Orthopaedic Review**. v.11, p.57-64, 1982.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CUMI, A. R. Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v.284, n.5756, p.555-56, 1980.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Medical Hypotheses**, v. 69, p. 310-321, 2006.

ZHAO, J.; BRAULT, J. J.; SCHILD, A.; GOLDBERG, A. L. Coordinate activation of autophagy and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. **Autophagy** v.4, p.378-380, 2008.

ANEXOS

Anexo 1- Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 251/2008**, relativo ao projeto intitulado "*Estudo das alterações morfométricas do tecido muscular estriado esquelético pela imobilização na posição alongada do membro posterior em ratos, durante 30, 60 e 90 dias*", que tem como responsável(is) **Anilton César Vasconcelos**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **18/ 03/2009**.

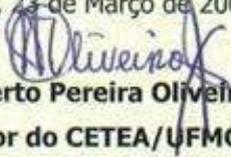
Este certificado expira-se em **18/ 03/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 251/2008**, related to the project entitled "*The study of the morphometrical modifications of the skeletal striated muscle tissue through the immobilization on the stretched position of the hind limb in rats, during 30, 60 and 90 days*", under the supervisors of **Anilton César Vasconcelos**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 18, 2009**.

This certificate expires in **March 18, 2014**.

Belo Horizonte, 23 de Março de 2009.



Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo 2- Artigo: Padronização da técnica de imobilização do membro pélvico para estudo da atrofia muscular esquelética em ratos

Figura 1: Rato anestesiado em decúbito lateral esquerdo com o membro pélvico direito imobilizado

Figura 2: Músculo sóleo e gastrocnêmio respectivamente dispostos longitudinalmente

Figura 3: Micrografias do músculo sóleo corados em HE

Figura 4: Micrografias do músculo gastrocnêmio corados em HE

Tabela 1: Médias e desvios padrões dos pesos musculares, áreas das fibras musculares e área do tecido conjuntivo dos músculos gastrocnêmio e sóleo

1 ***Ana Paula de Sousa Paixão**. Departamento de Patologia Geral. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Mestre em Patologia Geral. anapaulasouzap@yahoo.com.br

2 **Endrigo Gabellini Leonel Alves**. Departamento de clínica e cirurgia veterinária. Escola de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Doutorando em Ciência Animal. endrigo gabellini@yahoo.com.br

3 **Aline Cristina Vita Bitencourt**. Departamento de Patologia Geral. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Graduanda em Biomedicina. alinevitta@hotmail.com

4 **José Dias Corrêa Junior**. Departamento de Morfologia. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Professor adjunto. correajr@icb.ufmg.br

5 **Anilton Cesar Vasconcelos**. Departamento de Patologia Geral. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Professor titular. anilton@icb.ufmg.br

*Autor para contato: **Ana Paula de Sousa Paixão**

Mestre em patologia geral - laboratório de apoptose

Departamento de Patologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

31270-010 Belo Horizonte, MG, Brasil

Fone: 03134902881

Resumo

Trinta ratos Wistar, machos, adultos jovens com peso médio de 400 gramas foram utilizados para modelo experimental visando padronizar uma técnica de imobilização do membro pélvico para estudo da atrofia muscular esquelética em ratos. Os animais foram divididos em seis grupos, sendo 6 ratos em cada grupo imobilizado (Grupo I, durante 15 dias; Grupo II, durante 30 dias; Grupo III, durante 45 dias); e 4 ratos em cada grupo controle (Grupo IV, 15 dias; Grupo V, 30 dias e Grupo VI, 45 dias). Os animais foram anestesiados com anestesiados com Pentobarbital Sódico para a imobilização. Após os períodos padronizados os animais foram eutanasiados e os músculos gastrocnêmios e sóleos direitos foram dissecados, retirados e pesados, posteriormente os ventres musculares foram seccionados transversalmente para serem analisados morfológica e morfometricamente. As imobilizações causaram uma atrofia muscular esquelética com consequente diminuição significativa da área média do músculo sóleo e gastrocnêmio, do peso muscular dos músculos, e aumento da área média do tecido conjuntivo muscular nos intervalos de tempo proposto. Concluindo que imobilização através de atadura gessada é eficiente para manter o membro imóvel e provocar atrofia muscular por desuso do membro em distintos períodos.

Abstract:

Thirty male young adults Wistar rats, weighting around 400 grams, were used to standardize an experimental model on immobilization for the study of hind limb atrophy skeletal muscle in rats. The animals were divided into six groups, with 6 rats in each group immobilized (Group I, for 15 days, Group II, for 30 days, Group III, for 45 days) and four rats in each group control (Group IV, 15 days, Group V, 30 days and Group VI, 45 days). The Animals were anesthetized with sodium pentobarbital for immobilization. After the standardized periods, animals were euthanized and the right gastrocnemius and soleus muscles were dissected, removed and weighed. Medium third of muscle (bellies) were subsequently sectioned to morphological and morphometrical analysis. Immobilizations caused muscle atrophy with consequent significant decrease of the muscular area and weight in gastrocnemius and soleus muscles, and increased the area of connective tissue within the time proposed. Concluding that immobilization by plaster cast is effective to keep the limb immobile and cause muscle atrophy by disuse of the limb in different periods.

Palavras-chave / key-words / palabras chave: atrofia muscular esquelética, imobilização / atrofia del músculo esquelético, la inmovilización / skeletal muscle atrophy, immobilization

Introdução:

Cerca de 40% do corpo dos mamíferos é composto por músculos esqueléticos, e sua massa e composição são cruciais para a função e regulação de respostas motoras, atividades físicas diárias, manutenção e execução dos movimentos, comunicação e respiração. Alterações nas atividades musculares podem causar atrofia muscular^{1,2,3,4}. As unidades celulares do músculo esquelético voluntário e estriado são as fibras musculares, cada qual uma estrutura cilíndrica longa, limitada pelo sarcolema, envolvendo numerosos núcleos e uma quantidade grande do sarcoplasma^{2,5}.

Todos os músculos do corpo estão constantemente em processo de remodelagem, para se adaptarem às funções impostas, podendo ocorrer alterações em seu comprimento e diâmetro⁶. Essas dependem de vários fatores, como atividade proprioceptiva, inervação motora, carga mecânica, ciclo de estiramento/encurtamento, e mobilidade das articulações^{7,8}. Como respostas adaptativas às condições adversas ocorrem, muitas vezes, atrofia muscular esquelética⁹.

A atrofia muscular esquelética é um fenômeno clínico comum associado a diversas entidades nosológicas⁸, como alterações neuromusculares^{10,11,12}, imobilização^{3,13,14,15,16}, e a deficiência de nutrientes tais como o selênio e a vitamina E¹⁷. Essas alterações que induzem o desuso resultam em atrofia de forma imediata e drástica⁸.

O desuso produz perturbações morfológicas, funcionais e biomecânicas no músculo¹³, como diminuição da área de secção transversa da fibra muscular, conteúdo protéico, atividade contrátil, força, aumento da fatigabilidade, e diminuição do comprimento e da extensibilidade muscular^{3,18}. Essas perturbações causam uma deteriorização da qualidade de vida⁸.

A atrofia muscular associada à imobilização aparece de maneira rápida e reversível¹⁹. A partir de quatro a seis dias de imobilização já ocorrem perdas estruturais no tecido muscular²⁰, promovendo a atrofia^{21,22,23}. A imobilização tem um grande efeito na função muscular, aumentando a vulnerabilidade à lesões musculares²⁴, anquilose e fibrose¹³. A posição da imobilização influencia significativamente o grau de atrofia muscular esquelética, sendo a posição encurtada a causadora do rápido aumento de atrofia^{5,26,27,28}, em relação à posição alongada e neutra²⁶. Mesmo conhecendo todos os efeitos lesivos da imobilização, ela é um tratamento frequentemente utilizado para lesões do sistema músculo-esquelético.

Devido à escassez de estudos sobre a imobilização gessada, e sendo este um procedimento clínico relevante e comum na prática clínica, existe uma necessidade de padronizar uma técnica adequada para melhor avaliar e estudar a atrofia muscular em modelos animais.

Com o entendimento morfológico das alterações musculares que estão associadas à atrofia esse estudo oferecerá embasamento teórico para melhor intervenção clínica das patologias que necessitam de imobilização do membro.

Material e Métodos:

O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG, protocolo 251/2008).

Trinta ratos Wistar, machos, adultos jovens (17 semanas de idade) e com cerca de 400 gramas foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação da UFMG. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, no biotério do Departamento de Morfologia, com temperatura ambiente controlada (22°C) e iluminação artificial, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro (7:00 às 19:00 hs) e 12 horas escuro (19:00 às 7:00 hs), com alimentação e água a vontade.

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos, sendo 6 ratos em cada grupo imobilizado (Grupo I, durante 15 dias; Grupo II, durante 30 dias; Grupo III, durante 45 dias); e 4 ratos em cada grupo controle (Grupo IV, 15 dias; Grupo V, 30 dias e Grupo VI, 45 dias).

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50-75mg/ kg) via intra-peritoneal para proceder-se a imobilização²⁹; durante o procedimento foi administrada a dose mínima, sendo aumentada quando necessário. Após anestesia os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e os membros pélvicos direitos foram imobilizados com a articulação femorotibiopatelar em flexão máxima e a articulação tibiotársica em extensão máxima.

As imobilizações foram realizadas com bandagem gessada. Inicialmente o membro foi protegido por um malha tubular, em seguida realizou-se o acolchoamento do membro com três camadas de atadura ortopédica de algodão hidrofóbico com 2,0 cm de largura até a altura da articulação femorotibiopatelar.

Na etapa seguinte realizou-se a imobilização da articulação tibiotársica em completa extensão, para isso foi utilizada uma atadura de crepom com 2,0 cm de largura, exercendo-se a pressão no sentido horário sempre na direção distal para proximal.

Procedeu-se então a completa flexão da articulação femorotibiopatelar que foi mantida nessa posição por meio de uma atadura de crepom a qual foi enrolada no membro e no abdômen do animal, foram realizadas 10 voltas da atadura no abdômen do animal.

Após a adequada fixação do membro na posição desejada a imobilização recebeu uma camada protetora de atadura gessada (Figura 1). Todos os animais imobilizados receberam um colar elizabetano confeccionado com chapas radiográficas (Figura 1).

Transcorridos os períodos programados para cada grupo, os animais foram eutanasiados por inalação por CO₂ e os músculos gastrocnêmios e sóleos direitos foram dissecados por acesso longitudinal caudal, estendendo-se do joelho aos metatarsos. Os ventres musculares foram retirados, com aproximadamente 3,0 cm de comprimento, tomando-se o cuidado de manter as suas fibras longitudinais dispostas no maior eixo do comprimento (Figura 2).

Os músculos retirados foram pesados separadamente em uma balança digital. Em seguida os músculos foram seccionados transversalmente em maior extensão do ventre muscular e os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e encaminhados para processamento de rotina e inclusão em parafina³⁰, visando as avaliações histológicas e morfométricas. Cortes de 5 µm foram corados em Hematoxilina – Eosina (HE) e com Pricosírius Red (PSR) para avaliação do tecido conjuntivo intercelular e fascicular³¹.

Para a captura das imagens digitais utilizou-se microscópio óptico modelo Olympus BX 41, com objetiva de 10x e projetiva 3,3 acoplado a uma câmara digital Olympus Q Color 3, no laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG. Tais Imagens foram submetidas à morfometria

computadorizada, utilizando-se o programa Media Cybernetics Image Pró-Pus, versão 4.5.

Quantificou-se a área média das fibras musculares, sendo mensuradas 100 fibras do músculo sóleo e gastrocnêmio de cada animal, para a avaliação da atrofia da fibra muscular³². De maneira similar, imagens obtidas com objetiva de 10x capturadas de lâminas coradas em PSR, foram utilizadas para quantificar a área média do tecido conjuntivo muscular. Utilizou-se 10 campos por animal para a quantificação da área do tecido conjuntivo.

O presente estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Para testar as normalidades dos dados foram utilizados o teste de Lilliefors e a homocedasticidade, o teste de Bartlett. Empregou-se análise de variância (ANOVA) e SNK (Newmann-Keuls) para comparação das médias dos vários grupos com um nível de 5 % de significância³³.

Resultados e Discussão

A técnica de imobilização com atadura gessada aqui descrita foi eficiente para manter o membro na posição desejada durante todos os tempos estudados, mesmo aos 45 dias quando a atrofia já era avançada e havia grande perda na massa muscular. Não foi encontrada na literatura, descrição da técnica de imobilização de membro em ratos eficiente durante tanto tempo.

O ponto crítico na imobilização é a padronização da força aplicada na atadura durante a confecção das imobilizações. A imobilização menos apertada ficava mais confortável, mas era mais susceptível a ser deslocada com facilidade. Por outro lado, imobilizações muito apertadas prejudicavam a circulação tornando a extremidade do membro cianótica. Assim, a força aplicada na atadura durante a confecção da imobilização deve ser a maior possível que não torne o membro cianótico.

A colocação do colar de contensão após a imobilização foi importante para o sucesso, pois sem ele os animais facilmente danificavam a imobilização e a retiravam. Além disso, o treinamento dos animais para se manterem no posicionamento quadrupedal após a colocação das imobilizações também merece ser citado. No pré-experimento percebeu-se que após a imobilização os animais permaneciam a maior parte do tempo com os membros pélvicos lateralizados. Então optou-se por reposicioná-los na posição quadrupedal três vezes ao dia durante a primeira semana. Após esse período, os animais não necessitavam mais do reposicionamento.

Histologicamente os músculos sóleo (Figura 3A) e gastrocnêmio (Figura 4A) no grupo controle mostravam fibras seccionadas transversalmente de contorno arredondados, volumosas, com coloração róseo homogênea e boa preservação da estrutura. Já nos grupos imobilizados, os músculos sóleo (Figura 3B, C e D) e gastrocnêmio (Figura 4B, C e D) apresentavam contornos irregulares, com área de secção transversal visivelmente diminuída, com coloração mais pálida, além de fragmentação com fendas citoplasmáticas evidentes (Figura 3D).

O presente estudo mostrou que a imobilização do membro pélvico direito nos três intervalos de tempos (15, 30 e 45 dias) gerou uma atrofia muscular esquelética significativa em relação aos respectivos controles. No entanto, o peso muscular diminuiu significativamente e progressivamente apenas no músculo gastrocnêmio, que já foi detectável no tempo de 15 dias de imobilização e mais intenso aos 45 dias

($p < 0,001$) (Tabela 1). Tais resultados são similares aos obtidos por Jokl & Konstad (1983), Kourtidou-Papadeli et al. (2004) e Gomes et al. (2004).

Morfometricamente houve diminuição significativa da área média da secção transversal das fibras em ambos os músculos estudados evidentes já aos 15 dias de imobilização e mais pronunciada aos 45 dias ($p < 0,01$) em relação aos seus respectivos controles (Tabela 1). Entretanto, a área média da secção transversa diminuiu significativamente e progressivamente apenas no músculo gastrocnêmio, que já foi detectável no tempo de 15 dias de imobilização e mais intenso aos 45 dias; estes resultados corroboram com a literatura^{16,34}.

O tecido conjuntivo intercelular e interfascicular nos grupos imobilizados nos três tempos estudados aumentou significativamente em relação aos seus respectivos controles no músculo sóleo (Tabela 1) já no músculo gastrocnêmio houve aumento a partir do tempo de 30 dias aos 45 dias ($p < 0,01$) imobilizados com seus respectivos controles. No entanto, a área do conjuntivo aumentou significativamente e progressivamente apenas no músculo sóleo, que foi detectável no tempo inicial de 15 dias de imobilização e mais intenso aos 45 dias, resultados estes similares ao estudo de Coutinho e colaboradores (2004). No estudo de Kannus e colaboradores (1998) viram que no tempo de duas a três semanas de imobilização já ocorre a proliferação do tecido conjuntivo muscular.

Os resultados obtidos neste estudo de imobilização gessada adaptada confirmados pela avaliação histológica e morfométrica condizem com a atrofia muscular vista nos mamíferos, incluindo os seres humanos. De maneira geral, a imobilização por diferentes períodos resulta em atrofia muscular, variando de 15% a 70%, dependendo dos animais utilizados, das fibras e dos músculos avaliados³⁴. Este estudo, no entanto, inova por descrever um modelo de fácil utilização, permitindo estudos longitudinais de maiores durações, além de inserir parâmetros morfométricos de fácil obtenção e análise, que permitem quantificar melhor e graduar a intensidade do processo de atrofia secundária à imobilização.

Conclusão:

A imobilização através de atadura gessada é eficiente para manter o membro imóvel e provocar atrofia muscular por desuso do membro em distintos períodos e mais evidentes em períodos prolongados, sendo um prático e eficiente modelo para estudar os mecanismos responsáveis pela atrofia em animais experimentais. Assim, pode-se concluir que, em um mesmo modelo, há diferentes respostas teciduais, decorrentes das variações do tempo de desuso do membro avaliado.

Agradecimentos:

A todos que participaram da confecção deste artigo e em especial ao amigo Endrigo Gabellini pela disponibilidade, paciência e dedicação nos dias de imobilização dos animais. À CAPES, pela bolsa concedida. À FAPEMIG e ao CNPq, pelo financiamento.

Referências:

1- St- Amand J. et al. (2001). Characterization of control and immobilized skeletal muscle: an overview from genetic engineering. The Journal of the Federation of American societies for Experimental Biology, 15: 684-692.

- 2- Watras J. Fisiologia do músculo esquelético. In: Berne R. et al (2004). Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier., 230-546.
- 3- Zhang P, Chen X, Fan M (2006). Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical Hypotheses*, 69: 310-321.
- 4- Pellizari C et al. (2008). Estimulação elétrica neuromuscular de média frequência (rusa) em cães com atrofia muscular induzida. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38: 736-742.
- 5- Smith L et al. Aspecto de Fisiologia muscular e neurofisiologia. In: Smith L et al. (1997). *Cinesiologia Clínica de Brunnstrom*. 5. ed. São Paulo: Ed. Manole., 81-87.
- 6- Guyton A, Hall J. Contração do músculo esquelético. In: Guyton A, Hall J (2006). *Tratado de fisiologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan., 72-77.
- 7- Appell H. et al. (1990). Muscular Atrophy Following Immobilization - A Review. *Sports Medicine*, 10: 42-58.
- 8- Voltarelli F, Mello M, Duarte J (2007). Atrofia muscular esquelética e modelos experimentais: Apoptose e alterações histológicas, bioquímicas e metabólicas. *Revista de Educação Física*, 18: 85-95.
- 9- Matheus J. et al. (2007). A imobilização gessada por um curto período de tempo pode influenciar nas propriedades biomecânicas do músculo esquelético? *Brazilian Journal of Biomotricity*, 1: 28-33.
- 10- Borisov A, Carlson, B (2000). Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. *The Anatomical Record*, 258: 305-318.
- 11-Tews D (2002). Apoptosis and fibre loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders*, 12: 613-622.
- 12- Ferraz M. et al. (2004). Atrofia muscular progressiva: estudo clínico e laboratorial em 11 pessoas. *Arquivos de Neuro- psiquiatria*, 62: 119-126.
- 13- Chikwendu I, Jeevendra M (1999). Fiber Atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization. *Critical Care Medicine*, 27: 275-285.
- 14- Wills C. et al. (1982). Effects of immobilization of human skeletal muscle. *Orthopaedical Review*, 11: 57-64.
- 15- Dirks A, Leeuwenburgh C (2002). Apoptosis in skeletal muscle with aging. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative Comparative Physiology*, 282: 519- 527.
- 16- Ferreira R. et al. (2006). Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 4: 94-111.
- 17- Caiozzo V. et al. (1996). Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 81: 123-132.
- 18- Volpi F. et al. (2008). Efeitos da Remobilização em Duas Semanas com Natação Sobre o Músculo Sóleo de Ratos Submetidos à Imobilização. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 14:168-170.
- 19- Haddad F. et al. (2003). Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *Journal of Applied Physiology*, 95: 791-802.
- 20- Booth F (1977). Time course of molecular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. *Journal of Applied Physiology*, 43: 656-661.
- 21- Appell H (1986). Morphology of immobilized skeletal muscle and the effects of a pre and post immobilization training program. *International Journal of Sports Medicine*, 7: 6-12.

- 22- Williams F. et al. (1988). The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. *Journal of Anatomy*, 158: 109-114.
- 23- Vazzeille V, Codran A (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295: 1181-90.
- 24- Fitts R, Riley D, Widrick J (2001). Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *Journal of Experimental Biology*, 204: 3201-3208.
- 25- Smith H. et al. (2000). Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell and Tissue Research*, 302: 235-241.
- 26- Jokl P, Konstadt S (1983). The effect of limb immobilization on muscle function and protein composition. *Clinical orthopedics and related research*, 3: 222-229.
- 27- Kim J. et al. (2007). Differentially expressed genes and morphological changes during lengthened immobilization in rat soleus muscle. *Differentiation*, 75: 147-157.
- 28- Williams P, Goldspink G (1984). Connective tissue changes in immobilized muscle. *Journal of Anatomy*, 138: 343-50.
- 29- Flecknell P (2009). *Laboratory Animal Anesthesia*. San Diego: Ed.Elsevier. 3.ed., 300 p.
- 30- Luna L (1968). *Manual of the histology staining methods of the armed forces institute of pathology*. New York: Ed. Mcgraw Hill. 3. ed., 560 p.
- 31- Marsland T, Gless P, Erikson L (1954). Modification of the Gless, silver impregnation for paraffin sections. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 13: 587.
- 32- Brito M. et al. (2006). Dimensões geométricas das fibras do músculo sóleo de ratos exercitados em esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 12: 103-107.
- 33- Sampaio I (2002). *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Ed. FEPMVZ. 2. ed., 265 p.
- 34- Durigan J. et al. (2006). Efeitos da imobilização articular aguda nos músculos do membro posterior de ratos: análise metabólica e morfométrica. *Fisioterapia e pesquisa*, 13: 38-45.
- 35- Kannus P. et al. (1998). Effects of immobilization and subsequent low and high intensity exercise on morphology of rat calf muscles. *Scandinavian Journal of Medicine & Science Sports*, 8: 160-171.

Ilustrações:



Figura 1: Rato anestesiado em decúbito lateral esquerdo com o membro pélvico direito imobilizado: A- Animal em decúbito lateral antes de imobilização concluída, já com o colar de contenção; B- Observar as três camadas da imobilização: malha tubular mais interna, algodão ortopédico na camada média e atadura de crepom na camada mais externa; C- Notar o arremate da extremidade da imobilização e a robusta fixação abdominal; D – Extremidade distal do membro imobilizado com coloração normal, E – Conclusão da imobilização envolvendo a camada externa com atadura gessada.



Figura 2: Músculo sóleo e gastrocnêmio respectivamente dispostos longitudinalmente.

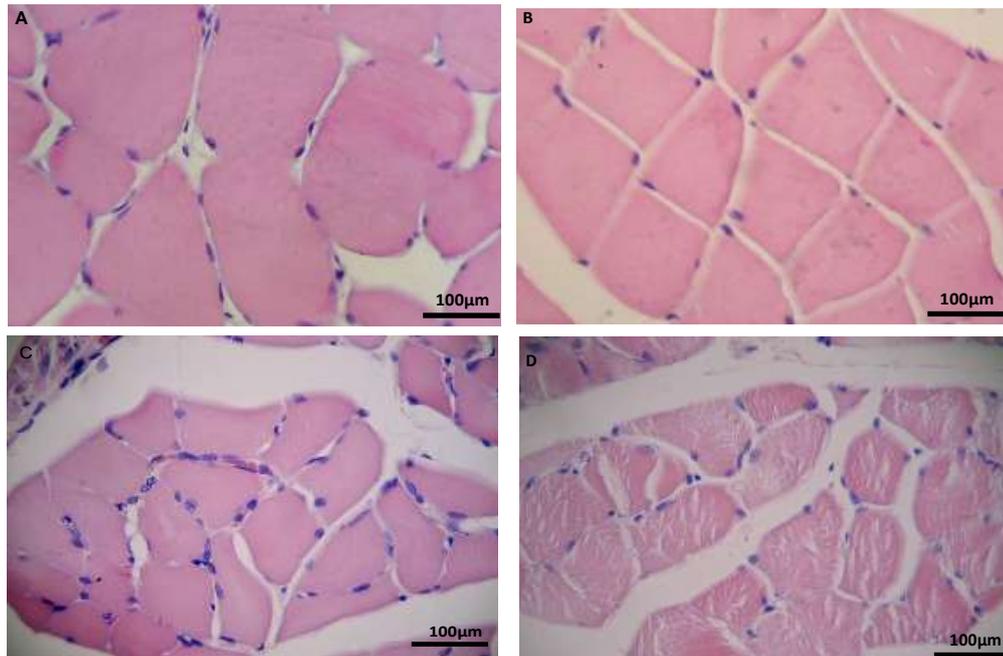


Figura 3: Fotomicrografia do músculo sóleo corados em HE: (A). Controle, sem lesões aparentes; (B, C e D) Grupos imobilizados aos 15, 30 e 45 dias, respectivamente, mostrando diminuição da área e de contorno transversal das fibras, descoloração e desestruturação histológica. Barra= 100µm

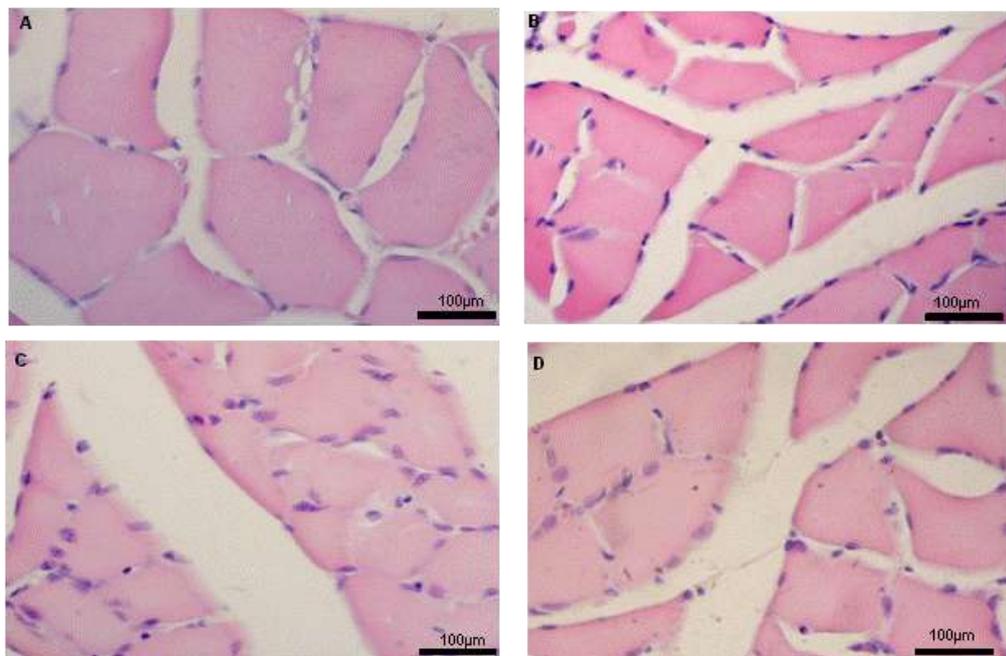


Figura 4: Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio corados em HE: (A). Controle, sem lesões aparentes; (B, C e D) Grupos imobilizados aos 15, 30 e 45 dias, respectivamente, mostrando diminuição da área e de contorno transversal das fibras, descoloração e desestruturação histológica. Barra= 100µm

Tabelas

Tabela 1. Médias e desvios padrões dos pesos musculares, áreas das fibras musculares e área do tecido conjuntivo dos músculos gastrocnêmio e sóleo, dos grupos controles e imobilizados, avaliados nos tempos de 15,30 e 45 dias.

Grupos	Peso (g)		Área fibras musculares (μm^2)		Área conjuntivo (%)	
	Sóleo	Gastrocnêmio	Sóleo	Gastrocnêmio	Sóleo	Gastrocnêmio
Controle 15 dias	0,20 \pm 0,01*	2,48 \pm 0,092*	237.796 \pm 42.333*	320.321 \pm 90.411*	101,9 \pm 5,6*	109,5 \pm 32,5
Imobilizado 15 dias	0,12 \pm 0,02 ^A	1,89 \pm 0,26 ^B	148.423 \pm 19.019 ^A	152.805 \pm 15.322 ^{AB}	142,7 \pm 24,6 ^{AB}	98,5 \pm 9,5 ^A
Controle 30 dias	0,20 \pm 0,01*	2,63 \pm 0,29*	238.950 \pm 46.970*	315.019 \pm 60.370*	102,7 \pm 27,2*	59,2 \pm 26,6*
Imobilizado 30 dias	0,12 \pm 0,04 ^A	1,39 \pm 0,27 ^C	124.081 \pm 21.427 ^A	142.473 \pm 36.999 ^A	209,1 \pm 54,0 ^A	124,1 \pm 18,0 ^A
Controle 45 dias	0,29 \pm 0,04*	3,16 \pm 0,06*	271.191 \pm 106.735*	247.311 \pm 58.297*	98,0 \pm 33,3*	84,2 \pm 31,4*
Imobilizado 45 dias	0,09 \pm 0,05 ^A	0,99 \pm 0,31 ^D	136.644 \pm 31.201 ^A	106.462 \pm 32.597 ^C	265,2 \pm 79,7 ^C	178,8 \pm 59,7 ^A

Nota: * valores estatisticamente significativos nas colunas. $P < 0,05$

Letras maiúsculas iguais nas colunas representam valores não significativos.

Letras maiúsculas distintas nas colunas representam valores estatisticamente significativos. $p < 0,05$